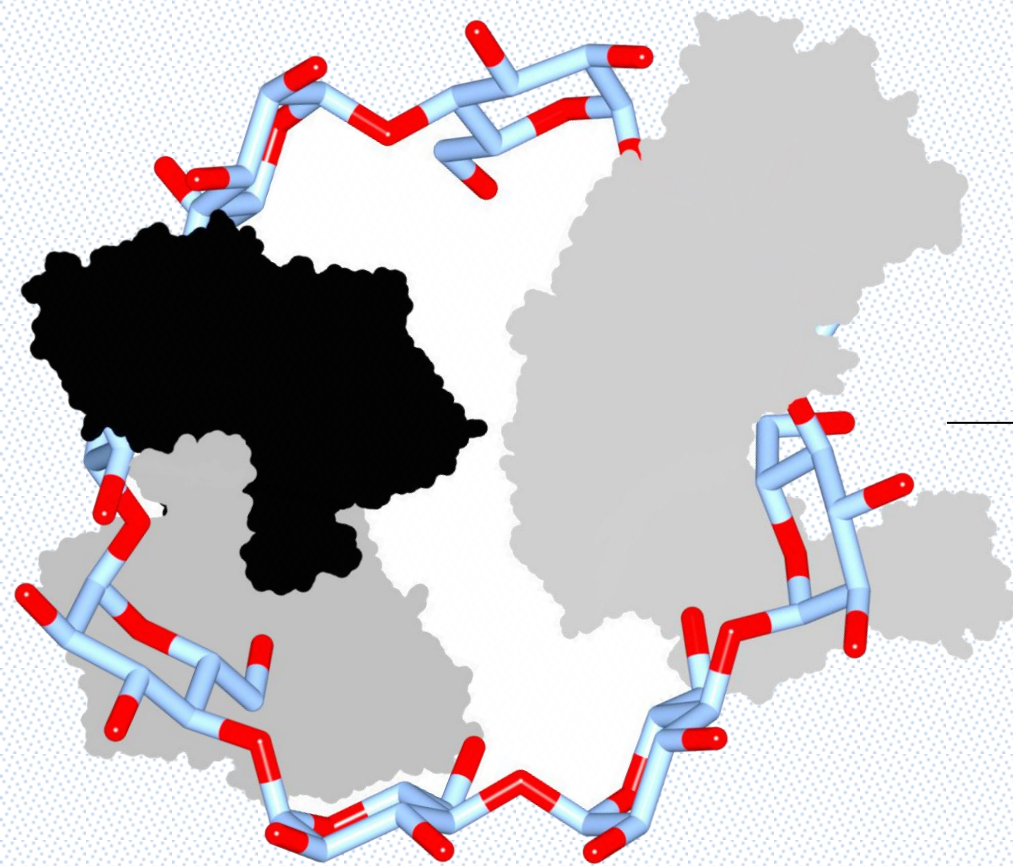




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

ΕΥΘΥΜΙΟΣ ΚΥΡΙΑΚΗΣ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ



Λάρισα
2020



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Δημήτριος Λεωνίδας (επιβλέπων):

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Βασιλική Σκαμνάκη:

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας-μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Μαρία Κοντού:

Επίκουρος καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Δημήτριος Λεωνίδας (επιβλέπων):

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Βασιλική Σκαμνάκη:

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας-μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Μαρία Κοντού:

Επίκουρος καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Γεώργιος Κοντοπίδης:

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα, Ελλάδα.

Σπυρίδων Ζωγράφος:

Ερευνητής Α', Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, Ελλάδα.

Νικόλαος Μπαλατσός:

Επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Παναγιώτης Λιάκος:

Αναπληρωτής καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

ΕΥΘΥΜΙΟΣ ΚΥΡΙΑΚΗΣ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

ΕΥΘΥΜΙΟΣ ΚΥΡΙΑΚΗΣ

2020

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 11

Συνολικός αριθμός σελίδων: 262

Αριθμός πινάκων: 47

Αριθμός εικόνων: 85

Αριθμός διαγραμμάτων: 7

Αριθμός παραρτημάτων: 1

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 291

Μέρος της διδακτορικής διατριβής έχει παρουσιαστεί στις παρακάτω δημοσιεύσεις

- Chetter, B.A.*; **Kyriakis, E.***; Barr, D.; Karra, A.G.; Koulas, S.M.; Skamnaki, V.T.; Snape, T.J.; Psarra, A-M.G.; Leonidas, D.D.; Hayes, J.M., Synthetic flavonoid derivatives targeting the glycogen phosphorylase inhibitor site: QM/MM-PBSA motivated synthesis of substituted 5,7-dihydroxyflavones, crystallography, in vitro kinetics and ex-vivo cellular experiments reveal novel potent inhibitors. [Submitted](#) (*equally contributed)
- Kyriakis, E.**; Karra, A.G.; Papaioannou, O.; Solovou, T.G.A.; Skamnaki, V.T.; Liggri, P.G.V.; Zographos, S.E.; Szennyés, E.; Bokor, E.; Kun, S.; Psarra A-M.G.; Somsák, L.; Leonidas, D.D., The architecture of hydrogen and sulfur σ -hole interactions explain differences in the inhibitory potency of C- β -D-glucopyranosyl thiazoles, imidazoles and an N- β -D glucopyranosyl tetrazole for human liver glycogen phosphorylase. (2020) [J. Bioorg. & Med. Chem.28, 115196](#)
- Szabó, K.E.*; **Kyriakis, E.***; Psarra, A-M.G.; Karra, A.G.; Sipos, Á.; Docsa, T.; Stravodimos, G.A.; Katsidou, E.; Skamnaki, V.T.; Liggri, P.G.V.; Zographos, S.E.; Mándi, A.; Király, S.B.; Kurtán, T.; Leonidas, D.D.; Somsák, L., Glucopyranosylidene-spiro-imidazolinones, a new ring system: Synthesis and evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors by enzyme kinetics and X-ray crystallography. (2019) [J.Med.Chem. 62\(13\) 6116-6136](#) (*equally contributed)
- Kyriakis, E.***; Solovou, T.G.A.*; Kun, S.; Czifrák, K.; Szócs, B.; Juhász, L.; Bokor, E.; Stravodimos, G. A.; Kantsadi, A. L.; Chatzileontiadou, D. S. M.; Somsák, L.; Leonidas, D. D., Probing the β -pocket of the active site of human liver glycogen phosphorylase with 3-(C- β -D-glucopyranosyl)-5-(4-substituted-phenyl)-1,2,4-triazole inhibitors. (2018) [Bioorg. Chem 77, 485-493](#). (* equally contributed).
- Bokor, E.*; **Kyriakis, E.***; Solovou, T. G.; Koppány, C.; Kantsadi, A. L.; Szabo, K. E.; Szakacs, A.; Stravodimos, G. A.; Docsa, T.; Skamnaki, V. T.; Zographos, S. E.; Gergely, P.; Leonidas, D. D.; Somsak, L., Nanomolar inhibitors of glycogen phosphorylase based on β -D-glucosaminyl heterocycles: a combined synthetic, enzyme kinetic and protein crystallography study. (2017) [J.Med.Chem. 60\(22\):9251-9262](#)(* equally contributed).

Δημοσιεύσεις σε συναφές αντικείμενο

- Fischer, T.*; Koulas, S.M.*; Tsagkarakou, A.S.*; **Kyriakis, E.**; Stravodimos, G.A.; Skamnaki, V.T.; Liggri, P.G.V.; Zographos, S.E.; Riedl, R.; Leonidas, D.D., High Consistency of Structure-Based Design and X-Ray Crystallography: Design, Synthesis, Kinetic Evaluation and Crystallographic Binding Mode Determination of Biphenyl-N-acyl- β -D-Glucopyranosylamines as Glycogen Phosphorylase Inhibitors. (2019) [Molecules, 24, 1322](#) (* equally contributed)
- Kun, S.*; Begum, J.*; **Kyriakis, E.***; Stamati, E.; Barkas, T.; Szennyes, E.; Bokor, E.; Szabo, K.; Stravodimos, G.; Sipos, Á.; Docsa, T.; Gergely, P.; Moffatt, C.; Patraskaki, M.; Kokolaki, M.; Gkerdi, A.; Skamnaki, V.; Leonidas, D.; Somsák, L.; Hayes, J., A multidisciplinary study of 3-(β -D-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazole derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors: computation, synthesis, crystallography and kinetics reveal new potent inhibitors. (2018) [Eur. J. Med. Chem 147, 266-278](#). (* equally contributed)
- Stravodimos, G. A.; Chetter, B. A.; **Kyriakis, E.**; Kantsadi, A.L.; Chatzileontiadiou, D.S.; Skamnaki, V. T.; Kato, A.; Hayes, J. M.; Leonidas, D. D., Phytogetic Polyphenols as Glycogen Phosphorylase Inhibitors: The Potential of Triterpenes and Flavonoids for Glycaemic Control in Type 2 Diabetes. (2017) [Cur. Med. Chem., 24, 384-403](#). (Front cover presentation)
- Stravodimos, G. A.; Kantsadi, A. L.; Apostolou, A.; **Kyriakis, E.**; Kafaski-Kanelli, V. N.; Solovou, T. G. A.; Gatzona, P.; Liggri, P. C.; Theofanous, S.; Gorgogietas, V. A.; Kissa, A.; Psachoula, C.; Chatzileontiadiou, D. S. M.; Lemonakis, A.; Psarra, A. G.; Skamnaki, V. T.; Haroutounian, S.; Leonidas, D. D., Affinity crystallography reveals the bioactive compounds of industrial juicing byproducts of *Punica granatum* for glycogen phosphorylase. (2017) [Curr. Drug Discov. Technol. 15\(1\):41-53](#).
- Kantsadi, A. L.; Stravodimos, G. A.; **Kyriakis, E.**; Chatzileontiadiou, D. S. M.; Solovou, T. G. A.; Kun, S.; Bokor, E.; Somsak, L.; Leonidas, D. D., van der Waals interactions govern C- β -D-glucopyranosyltriazoles' nM inhibitory potency in human liver glycogen phosphorylase. (2017) [J.Struct. Biol. 199,57-67](#).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ξεκίνησα να συμμετέχω στις εργασίες του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας το 2012 εκπονώντας την πτυχιακή μου εργασία. Το συγκεκριμένο εργαστήριο το επέλεξα γιατί από το πρώτο έτος, στο μάθημα της βιοχημείας, μου είχε εντυπωθεί η εικόνα μιας δομής πρωτεΐνης να στρέφεται στο χώρο και τελικά ήμουν τυχερός που μετά από μερικά χρόνια μπόρεσα να αποτελώ μέλος αυτής της ομάδας. Η αρχική μου διστακτικότητα ως προς τους κρυστάλλους και τις δομές των μακρομορίων έχει πλέον μετατραπεί σε ενθουσιασμό και δέος για αυτή την ομορφιά που υπάρχει στην επιστήμη. Είμαι ιδιαίτερα χαρούμενος που παρακολούθησα από κοντά την πρόοδο αυτού του εργαστηρίου το οποίο μέσα σε λίγα χρόνια έχει αυξηθεί σε μέγεθος, σε προσωπικό και σε εξοπλισμό ενώ έχει μετακινηθεί σε νέες εγκαταστάσεις εφάμιλλες του έργου που διεξάγεται. Εύχομαι αυτή η ανοδική πορεία να συνεχιστεί με ακόμα μεγαλύτερους ρυθμούς μέσα στα επόμενα χρόνια.

Ευχαριστώ θερμά τον διευθυντή του εργαστηρίου και επιβλέπων της διδακτορικής διατριβής, Καθ. Δημήτριο Λεωνίδα γιατί με τη δική του βοήθεια βρήκα αυτό με το οποίο θέλω να ασχοληθώ στην έρευνα. Τον ευχαριστώ επίσης γιατί με έμαθε ότι η έρευνα χρειάζεται μεράκι και δεν μπορείς να την αντιμετωπίσεις απλά ως ένα επάγγελμα που συμπληρώνεις το ωράριο σου και γυρνάς σπίτι σου. Οι χαρές αλλά κυρίως οι λύπες και οι σκέψεις σε ακολουθούν πολλές φορές εκτός του εργαστηρίου. Ο ίδιος δεν έχει ωράριο στην εργασία του καθώς πολλές φορές (σχεδόν όλες) έφτανε στο εργαστήριο νωρίτερα από εμένα και καθόταν μέχρι αργά το απόγευμα. Τον ευχαριστώ επίσης για την εμπιστοσύνη του όλα αυτά τα χρόνια γιατί μου έμαθε να μη τα παρατάω και ελπίζω τελικά η επιλογή του να συνεργαστούμε στο πλαίσιο της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής να τον δικαίωσε.

Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η συνεισφορά της Επικ. Καθ. Βασιλικής Σκαμνάκη για την εκπόνηση της διατριβής. Την ευχαριστώ θερμά γιατί εκτός από τις πολλές προτάσεις που είχε να μου κάνει για επίλυση προβλημάτων πάντα με ενθάρρυνε μέσα από διάφορες συζητήσεις και με βοηθούσε. Την ευχαριστώ επίσης γιατί μαζί με τον Ερευνητή Α' Δρ. Σπύρο Ζωγράφο (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών) με ώθησαν να ασχοληθώ με τη δημιουργία της ομάδας των νέων ερευνητών της Ελληνικής Κρυσταλλογραφικής Εταιρείας (ΕΚΕ) και μαζί με άλλους συναδέλφους να διοργανώνουμε ετήσια μια διεθνή συνάντηση που σκοπό είχε την γνωριμία των νέων

επιστημόνων αλλά και την εύρεση πειραματικών λύσεων και προσεγγίσεων μέσω προφορικών ομιλιών. Ευχαριστώ επίσης τον Δρ. Σπύρο Ζωγράφο για τη φιλοξενία και τη βοήθεια κατά τη συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Ευχαριστώ επίσης την Επικ. Καθ. Μαρία Κοντού για την συνεργασία της κατά τη διδακτορική διατριβή. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής Καθ. Γεώργιο Κοντοπίδη, Αν. Καθ. Παναγιώτη Λιάκο, Επικ. Καθ. Νικόλαο Μπαλατσό για το χρόνο που διέθεσαν να διαβάσουν και να κρίνουν τη διδακτορική διατριβή, καθώς επίσης και για τα σχόλια τους. Ευχαριστώ τον Καθ. Γεώργιο Κοντοπίδη για την ευγενική προσφορά των πλασμιδίων που κωδικοποιούν τις μοριακές συνοδούς αλλά και για το κιτ σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης *PEG4000-Malonate*.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου, την Επικ. Καθ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, και τον Επικ. Καθ. Γεώργιο Παπαδόπουλο για τη συνεργασία τους. Εκτός από τα μέλη του εργαστηρίου, θέλω να ευχαριστήσω τις Δρ. Κατερίνα Τσιτσάνου και Παναγιώτα Λίγγρη από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών για την φιλοξενία τους και την συμβολή τους κατά τη συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X. Ευχαριστώ τους συνεργάτες μας, τον καθηγητή *László Somsák (University of Debrecen)*, τον καθηγητή *Timothy Snape (University of Central Lancashire)* για την σύνθεση των χημικών ενώσεων και τον καθηγητή *Joe Hayes (University of Central Lancashire)*, για τις *in silico* μελέτες. Επίσης, ευχαριστώ τον καθηγητή *Song Xiang (Shanghai Jiaotong University Medical School)* για την ευγενική προσφορά του γονιδίου που κωδικοποιεί το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου από *Candida glabrata*.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στους συναδέλφους: Θεοδώρα Σολοβού, Γεώργιο Στραβοδήμο, Συμεών Κούλα, Αναστασία Τσαγκαράκου, Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου, Χριστίνα Δράκου, Όλγα Παπαϊωάννου, Αναστασία Καντσάδη, Αναστασία Γκούσκου, Ιωάννη Τσιάλτα, Κατερίνα Καρρά, Φωτεινή Καλούση, Διονύση Αντωνόπουλο, Αθανάσιο Κυρίτση, Ειρήνη Παπαναστάση, και Ζωή Αρσενοπούλου, ο καθένας τους συνέβαλε στην ομαλή λειτουργία του εργαστηρίου και όλοι μαζί δημιουργήσαμε ένα οικογενειακό κλίμα. Ευχαριστώ επίσης τους φίλους μου εκτός εργαστηρίου, τους Ελισάβετ Αρβανίτη, Βασίλη Ντόλκο, Αλέξανδρο Γραμματικόπουλο, Μαρία Χαραλάμπους, Ιωάννα-Μαρία Γκοτινάκου, Κωνσταντίνο Τσιλαφάκη, Νίκο Γκουρνέλο, Παρασκευή Κυλινδρή. Τέλος, άφησα την Ραφαηλία Μπέτα, που ήταν πάντα εκεί για εμένα, κυρίως στα δύσκολα αλλά φυσικά και στα εύκολα.

Ευχαριστώ θερμά το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για τη χορήγηση υποτροφίας για την υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής.

Τέλος, το πιθανότερο είναι πως δεν θα τα είχα καταφέρει μέχρι τώρα χωρίς την στήριξη των γονιών μου, Μελέτη και Άννα και του αδελφού μου Γιάννη που με εμπιστεύτηκαν και με βοήθησαν να ασχοληθώ με την έρευνα. Χωρίς την δική τους στήριξη αλλά και των παππούδων μου, Πόπη, Θύμιο, Κωνσταντίνα και Γιάννη δεν θα έγραφα τώρα αυτές τις γραμμές. Θα είμαι για πάντα ευγνώμων.

Αφιερώνω τη διδακτορική διατριβή στη μνήμη της φίλης μου
Μαρίας Κυρίτση.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	VIII
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1. Το γλυκογόνο	11
1.1.1. Η δομή του γλυκογόνου	11
1.1.2. Ορμονική ρύθμιση του γλυκογόνου	13
1.1.3. Σύνθεση του γλυκογόνου	14
1.1.4. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου	15
1.1.5. Ασθένειες αποθήκευσης του γλυκογόνου	16
1.1.6. Η γλυκογονόλυση στον σακχαρώδη διαβήτη	17
1.1.7. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I	18
1.1.8. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II	18
1.1.9. Ένζυμα του μεταβολισμού του γλυκογόνου ως στόχοι αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων	18
1.2. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου	20
1.2.1. Η κρυσταλλική δομή της GP	22
1.2.2. Ο καταλυτικός μηχανισμός της GP	23
1.2.3. Αλλοστερικά φαινόμενα και αλλοστερική μετάπτωση στη GP	24
1.2.4. Ρύθμιση της δράσης της GP	27
1.2.4.1. Το πεπτίδιο φωσφορυλίωσης	27
1.2.4.2. Τα κέντρα σύνδεσης μικρών μορίων στην GP	27
1.2.4.2.1. Το καταλυτικό κέντρο	28
1.2.4.2.2. Το κέντρο αναστολής	31
1.2.4.2.3. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης	33

1.2.4.2.4.	Το αλλοστερικό κέντρο	34
1.2.4.2.4.1.	Το αλλοστερικό κέντρο στην <i>mGP</i> και <i>IGP</i>	36
1.2.4.2.5.	Το νέο αλλοστερικό κέντρο	38
1.2.4.2.6.	Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου	39
1.3.	Το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου	40
1.3.1.	Δομικές μελέτες στο <i>GDE</i>	43
1.3.1.1.	Μελέτες ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας στο <i>rmGDE</i>	43
1.3.1.2.	Η κρυσταλλική δομή του <i>CgGDE</i>	44
1.3.2.	Ο καταλυτικός μηχανισμός του <i>GDE</i>	47
1.3.3.	Η εμπλοκή του <i>GDE</i> στον καρκίνο	48
1.3.4.	Αναστολείς του <i>GDE</i>	50
1.4.	Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων κατευθυνόμενος από τη δομή (<i>Structure Based Drug Design, SBDD</i>)	52
2.	ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	58
3.	ΥΛΙΚΑ	61
3.1.	Όργανα.....	61
3.2.	Βακτηριακές κυτταρικές σειρές.....	61
3.3.	Γονίδια κλωνοποιημένα σε πλασμιδιακούς φορείς	61
3.4.	Στήλες/υλικά χρωματογραφίας	61
3.5.	Αντιδραστήρια.....	62
3.6.	Λοιπά υλικά	63
3.7.	Διαλύματα.....	63
4.	ΜΕΘΟΔΟΙ	64
4.1.	ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΩΝ.....	64
4.1.1.	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΕΤΕΡΟΛΟΓΟ ΣΥΣΤΗΜΑ <i>E. coli</i>	64

4.1.1.1.	Αντιμετώπιση προβλημάτων παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο σύστημα <i>E. coli</i>	65
4.1.1.1.1.	Χαμηλά επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης	65
4.1.1.1.2.	Δημιουργία συσσωματωμάτων και έγκλειστων σωμάτων	66
4.1.2.	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	72
4.1.3.	Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (<i>FPLC</i>).....	72
4.1.3.1.	Χρωματογραφία συγγένειας (<i>AC</i>).....	73
4.1.3.2.	Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής	74
4.1.3.3.	Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (<i>SEC</i>)	74
4.1.4.	Αποκοπή της ετικέτας συγγένειας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	74
4.1.4.1.	Οι πρωτεάσες <i>3C</i> και <i>TEV</i>	75
4.1.5.	ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ.....	75
4.1.5.1.	Το μοντέλο των <i>Michaelis-Menten</i>	75
4.1.5.2.	Κινητική αλλοστερικών ενζύμων	77
4.1.5.3.	Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων	78
4.1.5.3.1.	Κινητικές μελέτες με δύο αναστολείς.....	79
4.1.6.	ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ.....	80
4.1.6.1.	Μια σύντομη ανασκόπηση στην ιστορία της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών με χρήση ακτίνων-Χ.....	80
4.1.6.2.	Ανάπτυξη κρυστάλλων πρωτεΐνης.....	82
4.1.6.3.	Ιδιότητες πρωτεϊνικών κρυστάλλων.....	85
4.1.6.4.	Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων-Χ.....	88
4.1.6.5.	Το πρόβλημα της φάσης.....	90
4.1.6.6.	Ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	91
4.1.6.7.	Δείκτες <i>Miller</i>	91
4.1.6.8.	Ο νόμος του <i>Bragg</i>	92
4.1.6.9.	Μετασχηματισμοί <i>Fourier</i>	93

4.1.6.10.	Ενσωμάτωση κρυσταλλογραφικών δεδομένων (<i>Integration</i>).....	95
4.1.6.11.	Ρύθμιση κλίμακας & συγχώνευση (<i>Scaling & merging</i>)	95
4.1.6.12.	Αξιολόγηση των δεδομένων περίθλασης σε σχέση με την ευκρίνεια	96
4.1.6.13.	Χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας - Βελτιστοποίηση και αξιολόγηση του τελικού μοντέλου.....	98
4.2.	Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση <i>A308L CgGDE</i>	103
4.3.	Παρασκευή υλικού β- <i>CD sepharose 6B</i> για χρωματογραφία συγγένειας.....	104
4.4.	Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	105
4.4.1.	Χημικός μετασηματισμός	105
4.4.2.	Ηλεκτρικός μετασηματισμός (ηλεκτροδιάτρηση)	106
4.5.	ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ α-1,4 ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΩΝ.....	106
4.5.1.	<i>rmGPb</i> : Απομόνωση της <i>rmGPb</i> από σκελετικούς μύες κονίκλων.	106
4.5.2.	<i>hlGPb</i> : Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης <i>hlGPb</i> στο <i>E. coli</i>	108
4.5.2.1.	Παραγωγή της ανασυνδυασμένης <i>hlGPb</i> στο <i>E. coli</i>	109
4.5.2.2.	Καθαρισμός και απομόνωση της ανασυνδυασμένης <i>hlGPb</i>	109
4.6.	ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΠΟΔΙΑΚΛΑΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	111
4.6.1.	<i>hGDE</i> : Δοκιμές έκφρασης και παραγωγής διαλυτής πρωτεΐνης. Απομόνωση και καθαρισμός του <i>hGDE</i>	111
4.6.1.1.	Δοκιμές έκφρασης και διαλυτότητας στο <i>hGDE</i> για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης	111
4.6.1.1.1.	Βελτιστοποίηση της διαλυτότητας του <i>hGDE</i>	113
4.6.1.1.2.	Συν-έκφραση με μοριακές συνοδούς.....	114
4.6.1.1.3.	Παραγωγή του ανασυνδυασμένου <i>hGDE</i> στον περιπλασματικό χώρο του <i>E. coli</i>	115
4.6.1.2.	Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ανασυνδυασμένου <i>hGDE</i> στο κυτταρόπλασμα των βακτηριακών κυττάρων.....	116

4.6.1.2.1.	Παραγωγή του ανασυνδυασμένου <i>hGDE</i> στο κυτταρόπλασμα των βακτηριακών κυττάρων.....	116
4.6.1.2.2.	Καθαρισμός και απομόνωση του <i>hGDE</i>	117
4.6.2.	<i>CgGDE</i> : Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ανασυνδυασμένου <i>CgGDE</i> στο <i>E. coli</i>	119
4.6.2.1.	Παραγωγή, του ανασυνδυασμένου <i>CgGDE</i> στο <i>E. coli</i>	119
4.6.2.2.	Καθαρισμός και απομόνωση του ανασυνδυασμένου <i>CgGDE</i> σε τρία βήματα (<i>IMAC, IEC, SEC</i>).....	120
4.6.2.3.	Καθαρισμός και απομόνωση του <i>CgGDE</i> σε δύο βήματα (<i>AC, SEC</i>).....	121
4.7.	ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	122
4.7.1.	Κινητικές μελέτες στη <i>GP</i>	122
4.7.1.1.	Φωσφορυλίωση των <i>GPs</i> από την <i>rmPhK-γ-trunc</i>	122
4.7.1.2.	Παρασκευή γλυκογόνου ελεύθερο νουκλεοτιδίων	123
4.7.1.3.	Ποσοτικός προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ομάδων.....	124
4.7.1.4.	Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων των <i>GP's</i>	124
4.7.1.4.1.	Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού κινητικών παραμέτρων (K_M , V_{max} , K_i) .	126
4.7.1.4.2.	Ανάλυση κινητικών δεδομένων	127
4.7.1.5.	Κινητικές μελέτες με δύο αναστολείς.....	128
4.7.2.	Κινητικές μελέτες στο <i>hGDE</i>	129
4.7.2.1.	Παρασκευή <i>GPa limit rate dextrin</i> (φ - <i>dextrin</i>)	129
4.7.2.2.	Μεθοδολογία προσδιορισμού α - <i>D</i> -γλυκόζης.....	130
4.7.2.3.	Πρότυπες καμπύλες γλυκόζης.....	131
4.7.2.4.	Δοκιμές δραστηριότητας στα στάδια απομόνωσης και καθαρισμού του <i>hGDE</i>	131
4.7.2.5.	Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης για το <i>hGDE</i>	132
4.7.2.5.1.	Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής <i>pH</i> δράσης του <i>hGDE</i>	132
4.7.2.5.2.	Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του <i>hGDE</i>	133
4.7.2.6.	Εκτίμηση της κινητικής συμπεριφοράς του <i>hGDE</i>	134

4.8.	ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ENZYMΩΝ-ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	135
4.8.1.	Κρυστάλλωση <i>rmGPb</i>	135
4.8.2.	Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων για την <i>rmGPb</i> σε σύμπλοκο με αναστολείς.....	136
4.8.3.	Κρυστάλλωση του <i>CgGDE</i>	138
4.8.4.	Κρυστάλλωση <i>hGDE</i>	139
5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	140
5.1.	Απομόνωση και καθαρισμός και κρυστάλλωση της <i>rmGPb</i>	140
5.2.	Απομόνωση και καθαρισμός της <i>hlGPb</i>	140
5.3.	ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗ <i>GP</i>	142
5.3.1.	Γλυκοπυρανοσιλιδενο-σπείρο-ιμιδαζολινόνες ως αναστολείς της <i>hlGP</i>	142
5.3.2.	Μελέτες C-β-D-γλυκοπυρανόσυλο -θειαζολών, -ιμιδαζολών και μιας N-β-D γλυκοπυρανόσυλο -τετραζόλης ως αναστολείς της <i>hlGP</i>	157
5.3.3.	β-γλυκοσάμινιλ-τριαζόλες ως αναστολείς της <i>hlGPa</i>	170
5.3.4.	Εξερεύνηση των ιδιοτήτων της β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου της <i>GP</i> με C-β-D-γλυκοπυρανόσυλο-τριαζολικές ενώσεις.....	177
5.3.5.	Στόχευση του κέντρου αναστολής της <i>GP</i> με ανάλογα χρυσίνης.....	187
5.4.	ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ENZYMO ΑΠΟΔΙΑΚΛΑΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ (<i>hGDE</i>).....	196
5.4.1.	Δοκιμές έκφρασης – Διαρρέον πλασμίδιο.....	197
5.4.2.	Αναδίπλωση του <i>hGDE</i> στον περιπλασματικό χώρο του βακτηρίου.....	199
5.4.3.	Αύξηση της ποσότητας διαλυτού <i>hGDE</i> σου κυτταρόπλασμα του <i>E. coli</i>	200
5.4.4.	Απομόνωση και καθαρισμός του <i>hGDE</i>	202
5.4.5.	Κρυστάλλωση του <i>hGDE</i>	205
5.4.6.	Κινητικές μελέτες έναντι του <i>hGDE</i>	206
5.5.	ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ENZYMO ΑΠΟΔΙΑΚΛΑΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ <i>Candida glabrata</i> (<i>CgGDE</i>)	207

5.5.1.	1 ^η μεθοδολογία απομόνωσης και καθαρισμού του ανασυνδυασμένου <i>CgGDE</i> με χρήση <i>IMAC</i> , <i>IEX</i> και <i>SEC</i>	207
5.5.2.	2 ^η μεθοδολογία απομόνωσης και καθαρισμού του ανασυνδυασμένου <i>CgGDE</i> με χρήση β - <i>CD sepharose 6B</i> και <i>SEC</i>	209
5.5.3.	Κρυστάλλωση του <i>CgGDE</i>	210
ΕΠΙΛΟΓΟΣ	212
SUMMARY	214
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	216
Αμινοξικές αλληλουχίες πρωτεϊνών		216
<i>rmGP</i> (<i>UniProtKB - P00489</i>)		216
<i>hlGPb</i> (<i>UniProtKB - P06737</i>).....		217
<i>CgGDE</i> (<i>UniProtKB - Q6FSK0</i>)		219
<i>hGDE</i> (<i>UniProtKB - P35573</i>)		221
<i>ScGDE</i> (<i>UniProtKB - Q06625</i>)		223
Στοιχίση αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ <i>rmGP/hlGP</i>		226
Στοιχίση αμινοξικών αλληλουχιών μεταξύ ευκαρυωτικών <i>GDE</i>		227
Βελτιστοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του <i>GDE</i> για έκφραση στο σύστημα έκφρασης <i>E. coli</i>		228
Φωσφορυλίωση <i>rmGPb</i> \rightarrow <i>a</i>		232
Πρότυπες καμπύλες για τον ποσοτικό προσδιορισμό γλυκόζης με τη μέθοδο <i>GOD-POD</i>		232
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....		233
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		235

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης το οποίο αποτελεί μια αποθήκη ενέργειας για τον οργανισμό. Σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (ΣΔ2) έχει βρεθεί ότι η ρύθμιση της γλυκογονόλυσης είναι ανεπαρκής με συνέπεια την αύξηση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα. Έτσι, έχει προταθεί τα ένζυμα του μεταβολισμού του γλυκογόνου να αποτελέσουν μοριακούς στόχους για την εύρεση φαρμάκων για τον ΣΔ2. Ο καταβολισμός του γλυκογόνου γίνεται με τη συντονισμένη δράση δύο ενζύμων, της φωσφοφυλάξης του γλυκογόνου (*GP*) και του ενζύμου αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου (*GDE*). Η *GP* καταλύει τη σταδιακή απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από το μακρομόριο του γλυκογόνου μέχρι ένα σημείο διακλάδωσης, το οποίο διασπά το *GDE* ώστε να μπορέσει η *GP* να συνεχίσει τη δράση της.

Η *GP* βρίσκεται στο κέντρο του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού ενώσεων οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την φαρμακευτική αντιμετώπιση του ΣΔ2. Ανάμεσα στα κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου, το καταλυτικό είναι αυτό που έχει μελετηθεί περισσότερο, κυρίως με ανάλογα γλυκόζης, ενώ λίγα είναι γνωστά για τις ιδιότητες του κέντρου αναστολής. Στη διδακτορική διατριβή μελετήσαμε 4 διαφορετικές κατηγορίες αναλόγων γλυκόζης στοχεύοντας το καταλυτικό κέντρο και μια κατηγορία αναλόγων χρυσίνης στοχεύοντας το κέντρο αναστολής. Στην πρώτη κατηγορία αναλόγων γλυκόζης, μελετήσαμε τα (*S*) και (*R*) επιμερή γλυκοπυρανοσιλιδενο-σπείρο-ιμιδαζολινονών ως αναστολείς της *hIGP*. Βρέθηκε ότι τα (*R*) σπείρο-επιμερή ήταν πιο ισχυροί αναστολείς από τα αντίστοιχα (*S*) και ο πιο ισχυρός αναστολέας ήταν ο **30** ($K_i = 1.72 \mu M$) ο οποίος διέθετε μια ομάδα 2-ναφθαλενίου. Κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων-Χ έδειξαν ότι μόνο τα (*R*) επιμερή προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο της *GP*. Επιπλέον, οι πληροφορίες από τις δομές έδωσαν μια εξήγηση για τις διαφορές στην ισχύ της αναστολής συγκριτικά με άλλες σπείρο-κυκλικές ενώσεις. Στη δεύτερη κατηγορία αναλόγων γλυκόζης, μελετήσαμε ανάλογα *C*- β -*D*-γλυκοπυρανόσυλο -θειαζολών, -ιμιδαζολών και μιας *N*- β -*D* γλυκοπυρανόσυλο-τετραζόλης ως αναστολείς της *hIGP*. Ο πιο ισχυρός αναστολέας ήταν η *C*- β -*D*-γλυκοπυρανόσυλο-ιμιδαζόλη **9** ($K_i = 3.2 \mu M$) η οποία είχε ως υποκαταστάτη στον ιμιδαζολικό δακτύλιο μια 2-ναφθαλενομάδα. Οι γλυκοπυρανόσυλο-θειαζόλες βρέθηκαν να είναι ασθενέστεροι αναστολείς από τις αντίστοιχες γλυκοπυρανόσυλο-ιμιδαζόλες ενώ η *N*- β -*D* γλυκοπυρανόσυλο-τετραζόλη ήταν ο πλέον ασθενέστερος αναστολέας από αυτή τη κατηγορία ενώσεων. Η εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ ανέδειξε τη σημασία του δεσμού υδρογόνου μεταξύ του

δακτυλίου του ιμιδαζολίου και του οξυγόνου του καρβονυλίου της κύριας αλυσίδας της *His377*. Στην τρίτη κατηγορία ενώσεων, μελετήθηκαν ανάλογα C-β-γλυκοσάμινιλ-τριαζόλης ως αναστολείς της *hIGPa*. Οι ενώσεις αυτές είχαν τροποποιημένο το δακτύλιο της γλυκοπυρανόζης καθώς η ομάδα -OH στη θέση 2' είχε αντικατασταθεί από μια ομάδα -NH₂ (γλυκοζαμίνες). Ο πιο ισχυρός αναστολέας ήταν ο **29b** ($K_i = 7.6 \mu M$) ο οποίος έφερε ως υποκαταστάτη μια ομάδα 2-ναφθαλενίου και κατατάσσεται μέσα στις πέντε πιο ισχυρές ενώσεις ως προς την GP με τροποποιημένο δακτύλιο γλυκοπυρανόζης που προσδένονται στο καταλυτικό της κέντρο. Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι η αντικατάσταση της ομάδας 2' -OH της γλυκοπυρανόζης από -NH₂ αν και έχει μια αρνητική επίδραση στη σταθερά αναστολής, οι νέες ενώσεις εξακολουθούσαν να είναι αρκετά ισχυροί αναστολείς της GP, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες. Στην τέταρτη κατηγορία ενώσεων, μελετήσαμε τις ιδιότητες της β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου της GP μέσω της σύνδεσης C-β-D-γλυκοπυρανόσουλ-τριαζολικών ενώσεων. Ο πιο ισχυρός αναστολέας ήταν ο **CK900** ($K_i = 427 nM$) και η εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X έδειξε ότι οι ενώσεις βρέθηκαν προσδεμένες στο καταλυτικό κέντρο της GP. Η ανάλυση των δομών των συμπλόκων ανέδειξε τις υδρόφοβες και υδρόφιλες περιοχές, των οποίων οι αλληλεπιδράσεις με τους αναστολείς μπορούν να αυξήσουν ή να εξασθενίσουν την ισχύ τους. Τέλος, μελετήσαμε το κέντρο αναστολής της GP μέσα από τη σύνδεση σε αυτό αναλόγων χρυσίνης. ($K_i = 7.6 \mu M$). Κινητικές μελέτες έδειξαν ο πιο ισχυρός αναστολέας ήταν ο **43** ($K_i = 1.0 \mu M$) ο οποίος εμφανίζεται σχεδόν ισοδύναμος με τη φλαβοπιριδόλη, τον πιο ισχυρό αναστολέα για το κέντρο αναστολής της GP. Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν την πρόσδεση των αναστολέων στο κέντρο αναστολής του ενζύμου και προσέφεραν τις πληροφορίες για τα επόμενα βήματα στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων.

Εκτός από τη GP μελετήσαμε και το ανθρώπινο GDE (*hGDE*) για το οποίο δεν υπάρχει αναφορά στη βιβλιογραφία για παραγωγή του στο *E. coli*. Η μόνη διαθέσιμη κρυσταλλική δομή για ευκαρυωτικό GDE προέρχεται από τον οργανισμό *Candida glabrata* (*CgGDE*). Έγιναν δοκιμές παραγωγής και αναδίπλωσης της πρωτεΐνης στο περίπλασμα και στο κυτταρόπλασμα του *E. coli*. Σε ό,τι αφορά το περίπλασμα, έγιναν προσπάθειες αναδίπλωσης του *hGDE* σε αυτό το χώρο αλλά οι ποσότητες που παρήχθησαν δεν ήταν επαρκής για δομικές μελέτες. Σε ό,τι αφορά το κυτταρόπλασμα, έγιναν δοκιμές παραγωγής του *hGDE* σε διαφορετικά στελέχη *E. coli* με χρήση διαφορετικών διαλυμάτων λύσης, χωρίς να παρατηρηθεί παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης. Συν-έκφραση με μοριακές συνοδούς οδήγησε σε παραγωγή ικανοποιητικών

ποσοτήτων διαλυτού *hGDE* το οποίο απομονώθηκε σε υψηλή βιοχημική καθαρότητα. Επιπλέον, επετεύχθη ο διαχωρισμός της δραστικής από τη μη δραστική πρωτεΐνη μέσω ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών. Η χρήση της μοριακής συνοδού *trigger factor* οδήγησε σε μεγάλη παραγωγή διαλυτού *hGDE*, αλλά η χρήση των μοριακών συνοδών *GroES/EL* οδήγησε σε παραγωγή λιγότερης αλλά πιο δραστικής πρωτεΐνης. Κινητικές μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο ακολουθεί κινητική *Michaelis-Menten* και παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία 37 °C σε pH 6.0. Τέλος, κρύσταλλοι του *hGDE* φαίνεται να αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 16 °C σε δύο συνθήκες (0.1 M *Tris-HCl* pH 8.8, 10 % w/v *PEG4000* και 0.1 M *Hepes-NaOH* pH 7.5, 12 % w/v *PEG8000*). Εκτός από το *hGDE*, απομονώσαμε το *CgGDE* με χρήση στήλης συγγένειας β-*CD sepharose 6B* και το κρυσταλλώσαμε σε μια καινούρια συνθήκη που δεν έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία. Σε περίπτωση που οι κρύσταλλοι του *hGDE* δεν περιθλούν ικανοποιητικά τις ακτίνες-X, τότε κρύσταλλοι του *CgGDE* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση του τρόπου πρόσδεσης αναστολέων στο ένζυμο εφαρμόζοντας κινητικές μελέτες και στα δύο ένζυμα για λόγους σύγκρισης.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

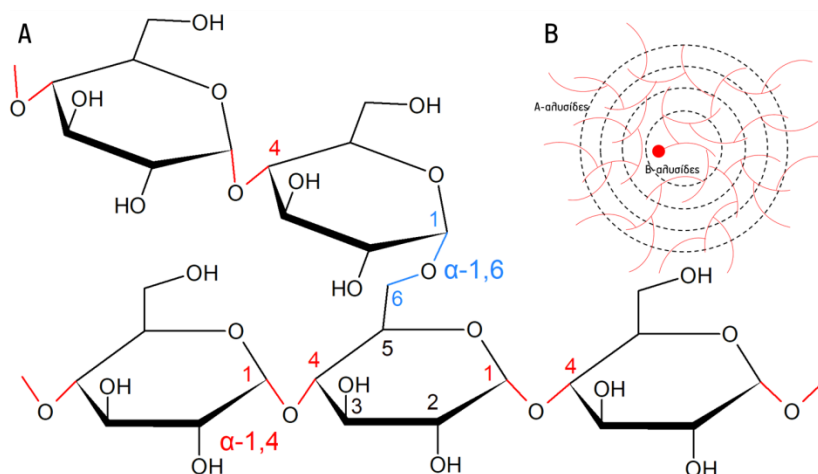
1.1. Το γλυκογόνο

Πριν από περίπου 165 χρόνια ελάχιστα ήταν γνωστά για την μεταβολική τύχη της προσλαμβανόμενης από τη τροφή γλυκόζης. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανασκόπηση του *Young F. G. (1957)* [1] όπου εξιστορεί αναλυτικά τη συνεισφορά κυρίως του *Claude Bernard* αλλά και άλλων ερευνητών στην εύρεση του γλυκογόνου. Μέσα σε αυτά τα χρόνια, το γλυκογόνο αναδείχθηκε από ένα υλικό με άγνωστη σύσταση και προέλευση που έμοιαζε με άμυλο και θεωρούταν πρόγονος του σακχάρου στο αίμα σε ένα υλικό, το οποίο έχει συγκεκριμένη σύσταση, μπορεί να συντεθεί, να αποθηκευθεί αλλά και να καταβολιστεί ενζυμικά στο ήπαρ παράγοντας γλυκόζη [1]. Οι βιοχημικοί *Carl & Gerty Cori* ασχολήθηκαν με το μεταβολισμό του γλυκογόνου και τιμήθηκαν με το βραβείο Νόμπελ φυσιολογίας ή ιατρικής το 1947 για τις ανακαλύψεις τους στη διαδοχή των γεγονότων κατά την καταλυτική αποικοδόμηση του γλυκογόνου [2]. Τα πειράματα των *Cori*, τα οποία έγιναν σε μύες βατράχων, έδειξαν ότι το γλυκογόνο αποικοδομείται παρουσία φωσφορικών ιόντων σε *G1P* η οποία μετατρέπεται σε *G6P*, μια μετατροπή η οποία ευνοείται παρουσία της *AMP* [3, 4]. Σήμερα, γνωρίζουμε ότι το γλυκογόνο είναι ένα έντονα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης όπου μόρια της γλυκόζης συνδέονται γραμμικά με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ κάθε 6-10 μόρια γλυκόζης σχηματίζονται διακλαδώσεις από α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Εικόνα 1A). Οι διακλαδώσεις στο γλυκογόνο κατανέμονται ομοιόμορφα και ως εκ τούτου το γλυκογόνο αποκτά ένα σφαιρικό σχήμα [5].

1.1.1. Η δομή του γλυκογόνου

Το μακρομόριο του γλυκογόνου διαφέρει σε μέγεθος μεταξύ του πληθυσμού και οι διακλαδώσεις δεν βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις. Το γλυκογόνο αποτελείται από εξωτερικές A-αλυσίδες που δεν φέρουν κάποια διακλάδωση και από εσωτερικές B-αλυσίδες που διαθέτουν κατά μέσο όρο δύο διακλαδώσεις, με την κάθε αλυσίδα να αποτελείται από ~ 12 κατάλοιπα γλυκόζης (Εικόνα 1B). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, το γλυκογόνο μπορεί να οργανωθεί σε 12 επίπεδα περιλαμβάνοντας 55000 μόρια γλυκόζης με αποτέλεσμα να έχει μοριακή μάζα ~ 107 *kDa* και διάμετρο ~ 44 *nm*. Μελέτες ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας έχουν δείξει ότι τα σωμάτια του γλυκογόνου στους μύες αποτελούνται κατά μέσο όρο από 7 επίπεδα με διάμετρο 25 *nm*. Το μοντέλο με τις εσωτερικές και εξωτερικές αλυσίδες δεν ανταποκρίνεται πλήρως στην πραγματικότητα καθώς το ακριβές μήκος των αλυσίδων, ιδιαίτερα των

εξωτερικών, δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια κάτι το οποίο μπορεί να επηρεάσει τη δομή και τη συμμετρία του μοντέλου. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου μπορεί να γίνει από τα μη-αναγωγικά του άκρα (εξωτερικές Α-αλυσίδες) από το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) μέχρι τέσσερα κατάλοιπα πριν από ένα σημείο διακλάδωσης [6].



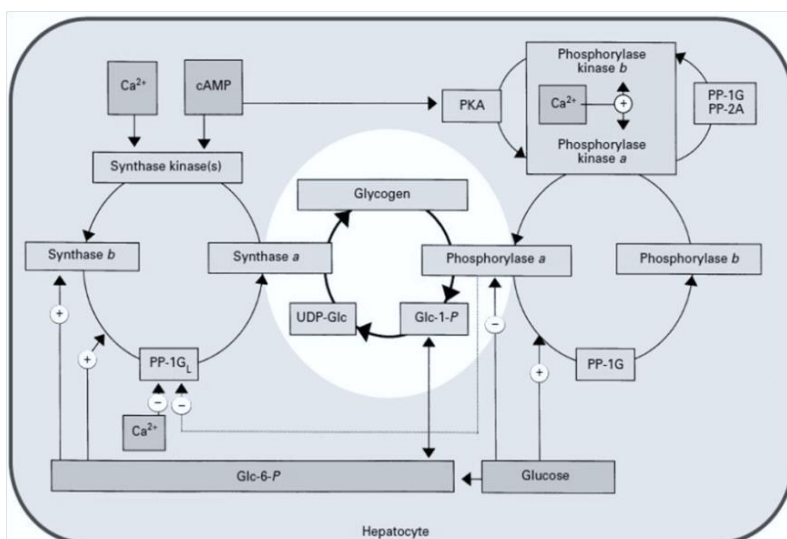
Εικόνα 1: Η δομή του γλυκογόνου. **A)** Παρουσιάζονται οι α-1,4 γλυκοζιτικοί δεσμοί που συνδέουν τα μόρια γλυκόζης καθώς και οι α-1,6 γλυκοζιτικοί δεσμοί που δημιουργούν τις διακλαδώσεις **B)** Μία απλή απεικόνιση του μοντέλου του γλυκογόνου το οποίο οργανώνεται σε εξωτερικές Α-αλυσίδες, χωρίς διακλαδώσεις, και σε εσωτερικές Β-αλυσίδες που έχουν κατά μέσο όρο δύο σημεία διακλάδωσης. Οι διακεκομμένοι κύκλοι αναφέρονται στα επίπεδα που οργανώνεται το γλυκογόνο ενώ η κόκκινη σφαίρα αντιπροσωπεύει την γλυκογενίνη. Η εικόνα αποτελεί ανακατασκευή της εικόνας 1 (Figure 1) της εργασίας των Roach J., και συνεργατών [6].

Τα μόρια του γλυκογόνου έχει παρατηρηθεί ότι συσσωρεύονται στο ήπαρ δημιουργώντας β-σωμάτια και μεγαλύτερα α-σωμάτια. Τα β-σωμάτια αντιστοιχούν στο μοντέλο του γλυκογόνου που αναφέρθηκε παραπάνω ενώ τα α-σωμάτια φαίνεται να δημιουργούνται από συσσωματώματα των β-σωματίων αν και η χημική βάση για τη δημιουργία των συσσωματωμάτων δεν είναι εντελώς κατανοητή [6]. Έχει παρατηρηθεί ότι στα μεγάλα α-σωμάτια η αποικοδόμηση του γλυκογόνου γίνεται σε μικρότερο ρυθμό συγκριτικά με τα β-σωμάτια όπου ο ρυθμός της αποικοδόμησης είναι μεγαλύτερος [7]. Αυτό υποδηλώνει πως η αφθονία των α-σωματιδίων στο ήπαρ χρησιμεύει στο να υπάρχει χαμηλός ρυθμός παραγωγής γλυκόζης, όπως χρειάζεται κατά τον ύπνο, ενώ η παρουσία κυρίως β-σωματίων και μικρών α-στούς μύες βοηθάει στη ταχεία παραγωγή γλυκόζης όταν είναι απαραίτητο, όπως κατά την κίνηση. Το 2018 βρέθηκε ότι η γλυκογενίνη είναι ο συνδετικός κρίκος που ενώνει τα β-σωματίδια (~ 20 nm διάμετρο) ώστε να δημιουργηθούν τα α-σωματίδια (έως 300 nm διάμετρο) [8]. Η γλυκογενίνη, για την σύνθεση του γλυκογόνου, αυτογλυκοζιλιώνεται και σχηματίζει ένα εναρκτήριο ολιγομερές γλυκόζης το οποίο στη συνέχεια επεκτείνει η συνθάση του γλυκογόνου. Επομένως, η γλυκογενίνη εντοπίζεται στο κέντρο των β-σωματιδίων αλλά σε κατάλληλες φυσιολογικές συνθήκες, μη γλυκοζυλιωμένα διμερή γλυκογενίνης προσδένονται

μη ομοιοπολικά σε τερματικά μόρια (1→4)-α γλυκόζης στην επιφάνεια των β-σωματιδίων. Με αυτή τη αλληλεπίδραση συνδέονται μεταξύ τους γειτονικά β-σωματίδια δημιουργώντας τελικά τα α-σωματίδια [8].

1.1.2. Ορμονική ρύθμιση του γλυκογόνου

Το ήπαρ έχει ομοιοστατικό ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα σε σταθερά επίπεδα. Το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα ρυθμίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγονται ανεπιθύμητες ενέργειες όπως η υπογλυκαιμία και η υπεργλυκαιμία. Για να γίνει αποφυγή της υπεργλυκαιμίας, μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες, ένα ποσοστό της γλυκόζης οξειδώνεται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του οργανισμού και το υπόλοιπο αποθηκεύεται με τη μορφή γλυκογόνου ώστε να χρησιμοποιηθεί ως πηγή γλυκόζης σε καταστάσεις νηστείας. Σε συνθήκες νηστείας, σηματοδοτείται η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ώστε τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα. Η ομοιοστασία της γλυκόζης στο αίμα μέσω της αποικοδόμησης ή της σύνθεσης του γλυκογόνου έγκειται στη δράση κυρίως δύο ορμονών με αντίθετη δράση, της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης. Η ινσουλίνη είναι η μόνη ορμόνη που οδηγεί σε μείωση της γλυκόζης στο αίμα και σύνθεση γλυκογόνου, ενώ η γλυκαγόνη αλλά και άλλες ορμόνες όπως η αδρεναλίνη, ανταγωνίζονται τη δράση της ινσουλίνης οδηγώντας σε παραγωγή γλυκόζης μέσω της αποικοδόμησης του γλυκογόνου [9]. Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται μια σύνοψη του μεταβολισμού του γλυκογόνου και πως αυτός ρυθμίζεται από τη δράση της γλυκαγόνης [10].



Εικόνα 2: Επισκόπηση του μεταβολισμού του γλυκογόνου [10]

Ινσουλίνη:

Η ινσουλίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που παράγεται αρχικά ως ανενεργό μόριο, (προϊνσουλίνη) το οποίο μετά από πρωτεολυτική διάσπαση αποδίδει την ινσουλίνη που

εκκρίνεται από τα β-παγκρεατικά κύτταρα. Η ινσουλίνη αποτελείται από δύο αλυσίδες οι οποίες μένουν συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω τριών δισουλφιδικών δεσμών. Για να μπορέσει η ινσουλίνη να ασκήσει τη μεταβολική της δράση, πρέπει να συνδεθεί στον διαμεμβρανικό της υποδοχέα (υποδοχέας της ινσουλίνης) στα κύτταρα στόχους. Στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα προσδένεται η ινσουλίνη, ενώ στο ενδοκυττάριο τμήμα υπάρχει μια επικράτεια με δράση κινάσης τυροσίνης. Όταν η ινσουλίνη συνδεθεί στον υποδοχέα της, τότε επάγεται η φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης του ενδοκυτταρικού τμήματος με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η κινάση τυροσίνης. Έπειτα, ακολουθεί ο καταρράκτης του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης που οδηγεί σε μεταφορά των υποδοχέων της γλυκόζης (*GLUT4*) στη μεμβράνη του κυττάρου ώστε η γλυκόζη να εισέλθει στο κύτταρο [11]. Μία γνωστή νόσος που σχετίζεται με ανεπαρκή δράση της ινσουλίνης και αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα αποτελεί ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ).

Γλυκαγόνη

Ως ορμόνη με αντίθετη δράση από αυτή της ινσουλίνης, η γλυκαγόνη εκκρίνεται από τα ακύτταρα του παγκρέατος. Η έκκριση της γλυκαγόνης επάγεται από τα χαμηλά επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, όπως σε καταστάσεις νηστείας, ενώ η ινσουλίνη επάγεται σε κατάσταση σιτιστικής επάρκειας. Η δράση της γλυκαγόνης οδηγεί στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου για παραγωγή ενέργειας και για τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων σακχάρου στο αίμα [12]. Η σύνδεση της γλυκαγόνης στον υποδοχέα της στην κυτταρική μεμβράνη οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που ξεκινάει με την παραγωγή της *cAMP* και οδηγεί σε διαδοχική ενεργοποίηση των ενζύμων, *PKA*, *PhK* και *GP*, με την *GP* να αποτελεί το ένζυμο που ξεκινάει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου από τα μη αναγωγικά του άκρα (Εικόνα 2). Παράλληλα, η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της γλυκαγόνης οδηγεί σε απενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου με αποτέλεσμα να επάγεται μόνο η γλυκογονόλυση και όχι η σύνθεση του γλυκογόνου (Εικόνα 2) [12].

1.1.3. Σύνθεση του γλυκογόνου

Για τη σύνθεση του γλυκογόνου, η παροχή των μορίων γλυκόζης μπορεί να γίνει άμεσα από την προσλαμβανόμενη τροφή ή έμμεσα από πρόδρομα μόρια της γλυκονεογένεσης. Η σύνθεση του γλυκογόνου γίνεται σε καταστάσεις αφθονίας της γλυκόζης στο αίμα και αφού πρώτα εισαχθεί στα κύτταρα από τους μεταφορείς της. Στους μύες υπάρχουν οι μεταφορείς *GLUT4* και *GLUT1*. Οι *GLUT1* βρίσκονται διαρκώς στη μεμβράνη του κυττάρου ενώ οι *GLUT4* μεταφέρονται στη μεμβράνη μετά τη δράση της ορμόνης ινσουλίνη ή μετά τη μυϊκή σύσπαση.

Στο ήπαρ και στα β- κύτταρα του παγκρέατος η εισαγωγή της γλυκόζης γίνεται από τους μεταφορείς *GLUT2* οι οποίοι επιτρέπουν στη γλυκόζη να εισέλθει στο κύτταρα λόγω διαβάθμισης συγκέντρωσης μεταξύ του αίματος και του ιστού [5]. Η σύνθεση του γλυκογόνου γίνεται κυρίως με τη δράση των παρακάτω πρωτεϊνών:

- Γλυκογενίνη: Διμερή γλυκογενίνης αυτογλυκοσυλιώνονται και σχηματίζουν μια εναρκτήρια αλυσίδα μορίων γλυκόζης συνδεδεμένα με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς [5].
- Συνθάση του γλυκογόνου: Αλληλεπιδρά με τη γλυκογενίνη και επεκτείνει το νεοσυντιθέμενο ολιγοσακχαρίτη σχηματίζοντας α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς [5].
- Ένζυμο διακλάδωσης: Σχηματίζει τις α-1,6 διακλαδώσεις με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διαλυτότητα του γλυκογόνου αλλά ταυτόχρονα να υπάρχουν και πολλά κατάλοιπα γλυκόζης από τα οποία μπορεί να ξεκινήσει η αποικοδόμηση του [5].

1.1.4. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου συντελείται στο κυτταρόπλασμα και στα λυσοσώματα, ενώ λίγα είναι γνωστά για την γλυκογονόλυση στον πυρήνα. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι διαταραχές της γλυκογονόλυσης στον πυρήνα σχετίζονται με την εξέλιξη του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα θέτοντας το μεταβολισμό του γλυκογόνου στον πυρήνα ως μια εν δυνάμει θεραπευτική προσέγγιση για την νόσο [13]. Το μεγαλύτερο μέρος της γλυκογονόλυσης συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνο για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου αλλά και τον εφοδιασμό του οργανισμού με γλυκόζη. Στην αποικοδόμηση συμμετέχουν κυρίως δύο ένζυμα:

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου: Καταλύει τη φωσφορολυτική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του γλυκογόνου με αποτέλεσμα τη παραγωγή *G1P* και γλυκογόνου με ένα λιγότερο κατάλοιπο γλυκόζης. Η φωσφορυλάση διασπά α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς και η δράση της σταματάει τέσσερα κατάλοιπα από μια διακλάδωση (Εικόνα 4) [5].

Το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου: Στους ευκαρυώτες είναι ένα ένζυμο με δύο διαφορετικές δραστηριότητες. Μεταφέρει τρία κατάλοιπα γλυκόζης από μια διακλάδωση σε ένα άλλο άκρο (μεταφοράση) και στη συνέχεια καταλύει την υδρόλυση του α-1,6 γλυκοζιτικού δεσμού του εναπομείναντος μορίου γλυκόζης (α-1,6 γλυκοζιτάση).

Υπάρχει μια σημαντική διαφορά μεταξύ της ρύθμισης της γλυκογονόλυσης στο ήπαρ και στους μύες. Τόσο στο ήπαρ όσο και στους μύες η *G1P* μετατρέπεται σε *G6P* αλλά η τύχη του τελευταίου μορίου διαφέρει. Στους μύες, η *G6P* εισέρχεται στη γλυκολυτική πορεία με σκοπό την παραγωγή της *ATP* ενώ στο ήπαρ μετατρέπεται σε ελεύθερη γλυκόζη ύστερα από τη δράση του ενζύμου φωσφατάση της *G6P*, ένα ένζυμο το οποίο απουσιάζει από τους μύες. Επομένως, το ήπαρ είναι το υπεύθυνο όργανο για τη διατήρηση της ομοιοστασίας της γλυκόζης στο αίμα [12]. Επιπλέον, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στους μύες και στο ήπαρ, καθώς το ηπατικό ένζυμο δεν επηρεάζεται από νουκλεοτίδια (*AMP, ATP*), σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο (Βλ. παράγραφο: 1.2.4.2.4.1) [14].

1.1.5. Ασθένειες αποθήκευσης του γλυκογόνου

Οι ασθένειες αποθήκευσης του γλυκογόνου (*Glycogen Storage Diseases, GSD*) σχετίζονται με μη φυσιολογική ποιότητα ή ποσότητα του γλυκογόνου στα κύτταρα. Ο όρος μη «φυσιολογική ποσότητα» αναφέρεται συνήθως σε ποσοστά μεγαλύτερα από τα φυσιολογικά αλλά βλάβες στην σύνθεση του γλυκογόνου μπορούν να οδηγήσουν και σε ποσοστά χαμηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα. Ο όρος μη «φυσιολογική ποιότητα» αναφέρεται στο γεγονός ότι σε μερικές *GSDs* η διακλαδισμένη μορφή του γλυκογόνου βρίσκεται διαταραγμένη, κάτι το οποίο σημαίνει ότι παρεμποδίζεται ο ρόλος του γλυκογόνου ως μιας πηγής άμεσης παραγωγής γλυκόζης. Εκτός από τα ένζυμα που συμμετέχουν άμεσα στο μεταβολισμό του γλυκογόνου, έλλειψη ενζύμων που συμμετέχουν σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια (όπως η γλυκόλυση) μπορούν να επηρεάσουν τον μεταβολισμό του γλυκογόνου και την αποθήκευση του (Πίνακας 1) [15]. Σε ότι αφορά τις ασθένειες που σχετίζονται με τα ένζυμα καταβολισμού του γλυκογόνου, στη *GSD-III*, όπου επηρεάζεται το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου, οι ασθενείς εμφανίζουν συσσώρευση ανώμαλης μορφής γλυκογόνου με κοντές εξωτερικές αλυσίδες. Οι ασθενείς με *GSD-III* μπορούν να εμφανίσουν ένα εύρος συμπτωμάτων ανάλογα με το ποιος ιστός επηρεάζεται (κυρίως ήπαρ και μύες). Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν ηπατομεγαλία, υπογλυκαιμία, υπερλιπιδαιμία, αργή ανάπτυξη και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί κίρρωση του ήπατος. Στην *GSD-V*, όπου επηρεάζεται η μυϊκή *GP (mGP)*, οι ασθενείς παρουσιάζουν αδυναμία στην άσκηση, μυϊκή αδυναμία, κράμπες και πόνο στους μύες. Τα άτομα με *GSD-V* μπορούν να συνεχίσουν την άσκηση μετά από μια μικρή παύση. Περίπου οι μισοί ασθενείς εμφανίζουν μυογλοβινουρία και σε ένα μικρό ποσοστό καρδιαγγειακά προβλήματα. Στην *GSD-VI*, όπου επηρεάζεται η ηπατική *GP (IGP)*, οι ασθενείς

εμφανίζουν συμπτώματα τα οποία είναι εντελώς διαφορετικά από αυτά της *GSD-V* όπως, καθυστέρηση της ανάπτυξης, ηπατομεγαλία, κετονική υπογλυκαιμία και υπερλιπιδαιμία.

Πίνακας 1: Λίστα με τις *GSDs* με τα ένζυμα των οποίων η λειτουργία επηρεάζεται [16].

Τύπος	Εναλλακτικό όνομα ή υποτύπος	Ένζυμο ή μονοπάτι που επηρεάζεται	Γονίδιο
0	0a	Ηπατική συνθάση του γλυκογόνου	GYS2
	0b	Μυϊκή συνθάση του γλυκογόνου	GYS1
I	Ia (von Gierker)	Φωσφατάση της G6P	G6PC
	Ib (von Gierker)	Μεταφορέας της G6P	SLC37A4
II	Pompe	α-γλυκοζιτάση	GAA
III	Cori/Forbes	Ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου	AGL
IV	Andersen	Ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου	GBE1
V	McArdle	Μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου	PYGM
VI	Hers	Ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου	PYGL
VII	Tarui	Κινάση της μυϊκής φωσφοφρουκτόζης	PFKM
IX	IXa	Κινάση της φωσφορυλάσης (υπομονάδα α2)	PHKA2
	IXb	Κινάση της φωσφορυλάσης (υπομονάδα β)	PHKB
	IXc	Κινάση της φωσφορυλάσης (υπομονάδα γ)	PHKG2
	IXd	Κινάση της φωσφορυλάσης (υπομονάδα α1)	PHKA1
X	-	Μυϊκή μουτάση του φωσφογλυκερικού	PGAM2
XI	Fanconi-Bickel	Μεταφορέας της γλυκόζης 2	SLC2A2
XII	-	Αλδολάση A	ALDOA
XIII	-	B-Ενολάση	ENO3
XV	-	Γλυκογενίνη 1	GYG1

Επιπλέον, ασθενείς με *GSD-IX*, εμφανίζουν αρκετά παρόμοιο φαινότυπο με την *GSD-VI* καθώς επηρεάζεται η ηπατική κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την *IGP* [16]. Η διαχείριση των συμπτωμάτων των *GSDs* ελέγχεται κυρίως με την διατροφή, συγκεκριμένη άσκηση ανάλογα την περίπτωση ενώ υπό διερεύνηση βρίσκεται η εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας για την θεραπεία των *GSDs* [17].

1.1.6. Η γλυκογονόλυση στον σακχαρώδη διαβήτη

Τα πρώτα κείμενα που αναφέρονται με λεπτομέρεια στο σακχαρώδη διαβήτη (*ΣΔ*) προέρχονται από τον Αρεταίο της Καππαδοκίας, καθώς ήταν ο πρώτος που εισήγαγε τον όρο «διαβήτης» από το ρήμα «διαβαίνω». Το σώμα περιγράφεται ως ένα δοχείο από το οποίο τα προσλαμβανόμενα υγρά λόγω της πολυδιψίας δεν μένουν στο σώμα αλλά διαφεύγουν λόγω της πολουρίας [18]. Εκτιμάται ότι το 2019 νοσούσαν από διαβήτη 463 εκατομμύρια άνθρωποι (9.3 % του παγκόσμιου πληθυσμού), ένας αριθμός ο οποίος υπολογίζεται ότι θα ανέλθει σε 578 (10.2 %) και 700 εκατομμύρια (10.9 %) το 2030 και 2045 αντίστοιχα. Τα νούμερα είναι εξαιρετικά ανησυχητικά και υπολογίζεται ότι οι μισοί ασθενείς που νοσούν δεν έχουν ακόμα διαγνωσθεί [19]. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες διαβήτη, ο *ΣΔ* τύπου I (*ΣΔ1*) και ο *ΣΔ* τύπου II (*ΣΔ2*).

1.1.7. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I

Ο ΣΔ1 χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων από τα οποία παράγεται η ορμόνη ινσουλίνη. Η ένταση των συμπτωμάτων αλλά και η εξέλιξη της νόσου διαφέρει από άτομο σε άτομο και η χορήγηση ινσουλίνης είναι απαραίτητη για την επιβίωση τους (ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης) [20].

1.1.8. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II

Ο ΣΔ2 σε αντίθεση με τον ΣΔ1, είναι μια επίκτητη μη ινσουλινοεξαρτώμενη νόσος και οφείλεται σε μείωση της ευαισθησίας των ιστών στις μεταβολικές δράσεις της ορμόνης ινσουλίνη, ένα φαινόμενο που αναφέρεται ως ανοχή στην ινσουλίνη. Κατά τη χρόνια ανοχή στην ινσουλίνη, ακόμα και τα αυξημένα επίπεδα της στο αίμα (υπερινσουλιναίμια) δεν είναι αρκετά για τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα. Στα αρχικά στάδια του ΣΔ2 παρατηρείται μια μέτριου βαθμού υπεργλυκαιμία ύστερα από τα γεύματα αλλά στα επόμενα στάδια της νόσου, όπου τα β-κύτταρα του παγκρέατος «εξαντλούνται», δεν υπάρχει αρκετή παραγωγή ινσουλίνης με αποτέλεσμα να εμφανίζεται υπεργλυκαιμία [21]. Η χρόνια δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος οδηγεί τελικά σε κυτταρικό θάνατο χωρίς όμως να είναι απόλυτα γνωστοί και κατανοητοί οι μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει αυτό. Η δυσλειτουργία των β-κυττάρων μπορεί να επάγεται από χρόνια υπεργλυκαιμία, υπερλιπιδαιμία και την παρουσία κυτοκινών, οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση. Επιπλέον, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ινσουλίνης, μπορεί να οδηγήσει σε δημιουργία αμυλοειδών πλακών κάτι το οποίο επηρεάζει την λειτουργία των παγκρεατικών κυττάρων και οδηγεί στη καταστροφή τους [22, 23]. Η πιο συνήθης φαρμακευτική αγωγή για τη διαχείριση του ΣΔ2 αποτελεί η χορήγηση μετφορμίνης, μια χημική ένωση που επάγει την ινσουλινο-επαγόμενη πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα [24].

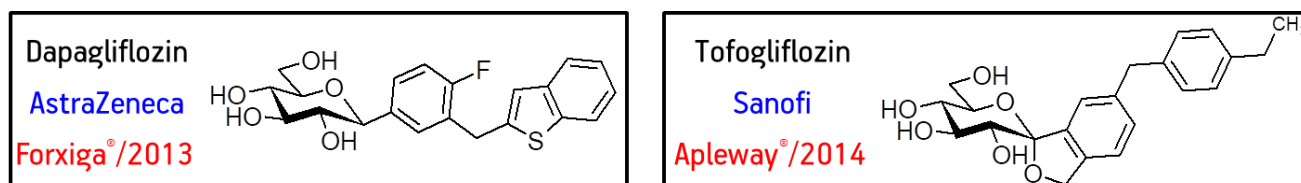
1.1.9. Ένζυμα του μεταβολισμού του γλυκογόνου ως στόχοι αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων

Σε υγιή άτομα, όπου η γλυκογονόλυση επάγεται από τη γλυκαγόνη, έχει βρεθεί ότι το ~ 90 % της παραγμένης γλυκόζης οφείλεται στη γλυκογονόλυση [25]. Στον ΣΔ2 παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδα γλυκογονόλυσης με αποτέλεσμα τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα να αυξάνονται ακόμα περισσότερο [26]. Ο έλεγχος του μεταβολισμού του γλυκογόνου στον ΣΔ2 αποτελεί μια υποσχόμενη προσέγγιση για τον ΣΔ2 με σκοπό τη μείωση της υπεργλυκαιμίας [27, 28]. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην *IGP* η οποία καταλύει το πρώτο βήμα του καταβολισμού του γλυκογόνου για παραγωγή γλυκόζης [28] και αποτελεί έναν

έγκυρο φαρμακευτικό στόχο για τον σχεδιασμό νέων αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων [29, 30].

Αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της *hIGP* μπορούν να αναστείλουν το ένζυμο *in-vitro*, *ex-novo* και *in-vivo* σε διαβητικά ποντίκια. Πιο συγκεκριμένα, η 1,4-*dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol* (*DAB*) προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου [31] και αναστέλλει το ένζυμο ισχυρά, *in-vitro*, με K_i 390 nM (Πίνακας 2, ένωση 6) [32]. Η *DAB* αναστέλλει ισχυρά την παραγωγή γλυκόζης μέσω γλυκογονόλυσης ($IC_{50} \sim 1 \mu M$) χωρίς να επηρεάζει την σύνθεση του γλυκογόνου σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων αρουραίων [33]. Επιπλέον, μπορεί να αναστείλει τη γλυκογονόλυση *in-vivo* σε ποντίκια *C57BL/6J (ob/ob)* [33], τα οποία είναι κατάλληλα για τη μελέτη του διαβήτη [34], εκδηλώνοντας αντι-υπεργλυκαιμική δράση αλλά φαίνεται πως σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί επίσης να αναστέλλει και το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου [33]. Η ένωση *DAB* φαίνεται να είναι ο πιο καλά μελετημένος και ο δεύτερος πιο ισχυρός αναστολέας της γλυκογονόλυσης μέχρι σήμερα σε μελέτες *in-vivo* και *ex-novo*, παρότι έχουν μελετηθεί και πολλές άλλες [35-39]. Πολύ πρόσφατα βρέθηκε ότι ένα ανάλογο γλυκόζης, η σπειρο-οξαθειαζόλη που φέρει μια ομάδα ναφθαλενίου ως υποκαταστάτη στον άνθρακα της οξαθειαζόλης (K_i 160 nM, Πίνακας 2, ένωση 2), αποτελεί ένα υποψήφιο αντι-υπεργλυκαιμικό φάρμακο που εμφανίζεται ελαφρά πιο δραστικό από την *DAB* σε μελέτες ηπατοκυττάρων αρουραίων. Επιπλέον, η ένωση αυτή μείωσε σημαντικά τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα αρουραίων *Zucker fa/fa* [40]. Μελέτη του 2018 έδειξε ότι αναστολείς της *GP* βελτιώνουν την εκκριτική λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος, με ένα μηχανισμό που δεν είναι εντελώς κατανοητός, προτείνοντας ότι αναστολείς της *GP* μπορεί να στοχεύουν εκτός από το ήπαρ και το πάγκρεας [41].

Ανάλογα γλυκόζης που στοχεύουν ισχυρά τη *GP* (Πίνακας 2, ενώσεις 1, 2, και 8) μοιάζουν δομικά με αναστολείς της *SGLT2* (Εικόνα 3), οι οποίοι κυκλοφορούν στην αγορά για τη διαχείριση της υπεργλυκαιμίας, υποδεικνύοντας ότι ενδεχομένως αναστολείς της *GP* με στόχο το καταλυτικό κέντρο θα μπορούσαν να περάσουν ομοίως επιτυχώς τις κλινικές μελέτες [42].



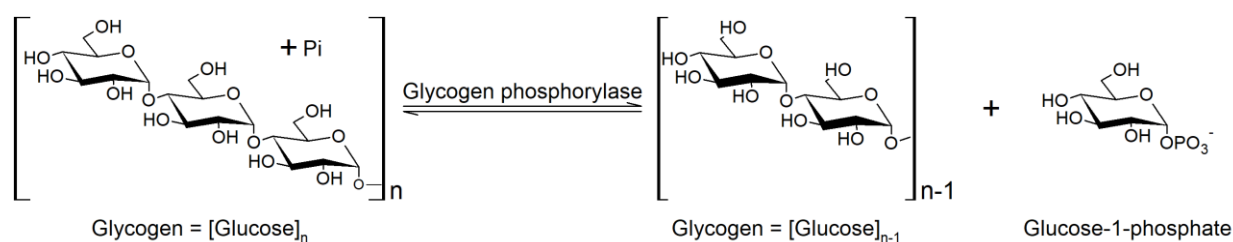
Εικόνα 3: Αναστολείς της *SGLT2* που κυκλοφορούν στην αγορά μαζί με την εταιρεία, την εμπορική ονομασία και το έτος της έγκρισης-χορήγησης σε ασθενείς. Η δομική ομοιότητα με τα ανάλογα γλυκόζης που έχουν μελετηθεί ως προς την *GP* είναι μεγάλη ειδικά αν εστιάσουμε στις ενώσεις 1, 2, και 8 του Πίνακας 2 [42].

Αναστολείς έχουν σχεδιαστεί επίσης για την κινάση της φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία ενεργοποιείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι της γλυκαγόνης και από Ca^{2+} ενεργοποιώντας την *GP* φωσφορυλιώνοντας την στη *Ser14*. Οι αναστολείς της κινάσης της *GP* έχουν ως αποτέλεσμα την μη ενεργοποίηση της *GP* και τη μείωση της γλυκογονόλυσης. Ανάλογα ινδουβίνης μπορούν να αναστείλουν ισχυρά την *PhK* με τον πιο ισχυρό αναστολέα να έχει τιμή IC_{50} 170 nM [43]. Το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου δεν έχει μελετηθεί σε βάθος ως στόχος για τον ΣΔ2 καθώς δεν υπήρχε διαθέσιμη κρυσταλλική δομή του ευκαρυωτικού ενζύμου. Πρόσφατα προσδιορίστηκε η δομή του ενζύμου από τον οργανισμό *Candida glabrata* [44]. Ωστόσο, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω (βλ. παράγραφο 1.3.4), υπάρχουν κάποιες μελέτες με αναστολείς α-γλυκοζιτασών με μια από τις πιο ισχυρές ενώσεις να αποτελεί φάρμακο (*Miglitol*) το οποίο χρησιμοποιείται σήμερα για τη διαχείριση του ΣΔ2 [45].

1.2. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*EC 2.4.1.1*, *MW 97.4 kDa*), ένα ομοδιμερές αλλοστερικό ένζυμο, ανακαλύφθηκε ότι καταλύει το πρώτο βήμα του καταβολισμού του γλυκογόνου παρουσία ορθοφωσφορικών ιόντων προς απόδοση *G1P* από τους *Carl & Gerty Cori* [3, 4]. Οι ίδιοι, περιέγραψαν την απομόνωση, την κρυστάλλωση καθώς και την ύπαρξη των μορφών α και β του ενζύμου [2, 46, 47]. Οι *Cori* μελέτησαν σε βάθος το πώς η ενέργεια καταναλώνεται από τους μύες και το ήπαρ, κάτι το οποίο οδήγησε στη βράβευση τους με το βραβείο Νόμπελ το 1947 με την *Gerty Cori* να γίνεται η πρώτη γυναίκα Αμερικανίδα στην οποία απονεμήθηκε αυτό το βραβείο. Οι εργασίες των *Cori* έθεσαν μερικές από τις θεμελιώδεις αρχές της βιοχημείας όπως τη γνωρίζουμε σήμερα [48].

Η αντίδραση που καταλύει η *GP* είναι αντιστρεπτή (Εικόνα 4), *in vitro*, και ο λόγος των συγκεντρώσεων $[G1P]/[Pi]$ στην ισορροπία, σε *pH* 6.8, ισούται με 0.28. *In vivo*, η αντίδραση μπορεί να προχωρήσει μόνο ως προς τη διάσπαση του γλυκογόνου καθώς μέσα στο κύτταρο η ποσότητα των ορθοφωσφορικών ιόντων είναι υψηλότερη από αυτήν της *G1P* [49].



Εικόνα 4: Η αντίδραση φωσφορύλωσης που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

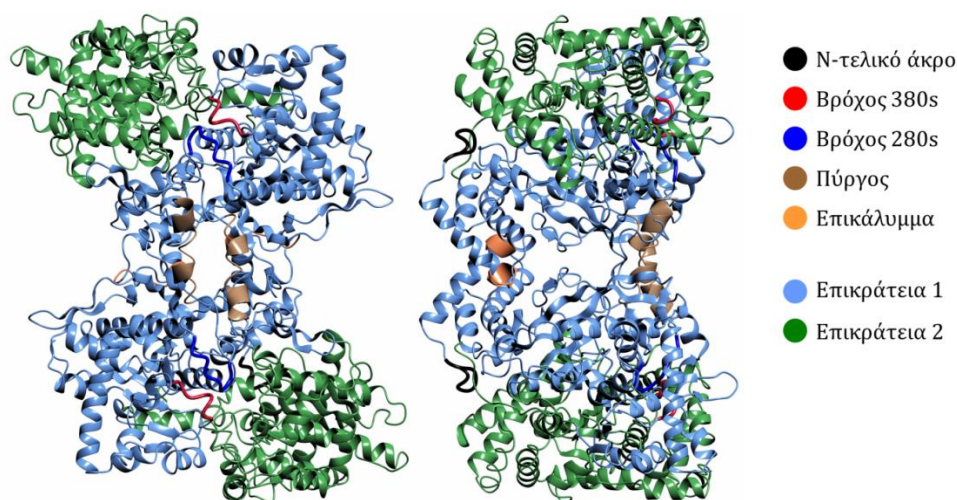
Η *GP*, στα θηλαστικά, υπάρχει σε τρεις ισομορφές, τη μυϊκή (*mGP*), του εγκεφάλου (*bGP*) και την ηπατική (*IGP*). Η *GP* ως αλλοστερικό ένζυμο ακολουθεί το μοντέλο *MWC* [50] και ως εκ τούτου το ένζυμο ισορροπεί μεταξύ μιας ανενεργής διαμόρφωσης *T* με χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα και μιας δραστικής διαμόρφωσης *R* με υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα [50]. Η μυϊκή *GP* βρίσκεται κυρίως στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή *b* και στην κατάσταση *T*. Κατά τη μυϊκή σύσπαση παράγεται *AMP* η οποία προσδένεται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου και το ενεργοποιεί μετατοπίζοντας την ισορροπία από την *T* στην *R* διαμόρφωση. Η ηπατική *GP*, η οποία υπάρχει σε όλους τους ιστούς εκτός από τους μύες, τα μυοκύτταρα και τον εγκέφαλο βρίσκεται κυρίως στην μορφή *a* και στην κατάσταση *R*. Η πρόσδεση της *AMP* στο ηπατικό ένζυμο δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του συγκριτικά με το μυϊκό ένζυμο στο οποίο η πρόσδεση της *AMP* στη μορφή *a* οδηγεί σε μια επιπλέον αύξηση της δραστηριότητας κατά 10 - 20 % [14]. Η μη ενεργοποίηση της ηπατικής *GP* από την *AMP* έχει φυσιολογική σημασία καθώς το ηπατοκύτταρο δεν εμφανίζει τόσο μεγάλες διαφορές στο ενεργειακό του φορτίο συγκριτικά με το μυοκύτταρο (για τη δομική βάση βλ. παράγραφο 1.2.4.2.4.1) [12, 51]. Η ηπατική *GP* έχει κυρίως ομοιοστατικό ρόλο καθώς είναι αυτή που διατηρεί τα επίπεδα της γλυκόζης στα φυσιολογικά επίπεδα και αποτελεί έναν αισθητήρα γλυκόζης για το ηπατοκύτταρο. Σε συνθήκες περίσσειας γλυκόζης, αυτή προσδένεται το καταλυτικό κέντρο της *GP* και την αναστέλλει με σταθερά αναστολής 1.7 mM [52]. Αφού συνδεθεί η γλυκόζη το ένζυμο μεταπίπτει από την κατάσταση *R* στην *T* και πλέον η *GP* μπορεί να αναγνωριστεί από την *PP1* ώστε να αποφωσφορυλιωθεί και να απενεργοποιηθεί. Η δομική βάση που εξηγεί το λόγο για τον οποίο χρειάζεται η πρόσδεση της γλυκόζης στη *GP* έτσι ώστε η *PP1* να αναγνωρίσει και να αποφωσφορυλιώσει το ένζυμο αναλύεται παρακάτω (βλ. παράγραφο 1.2.4.1) [53]. Η *GP* του εγκεφάλου (*bGP*), της οποίας η κρυσταλλική δομή ανακαλύφθηκε το 2016 [54], υπάρχει και στα μυοκύτταρα και έχει χαρακτηριστεί ως πιθανός διαγνωστικός δείκτης για τη διάγνωση ισχαιμικού επεισοδίου [55].

Τα τρία ισοένζυμα της *GP* παρουσιάζουν ομολογία 80-83 % στην αμινοξική τους αλληλουχία ενώ δεν εμφανίζονται μεγάλες διαφορές στο καταλυτικό κέντρο. Επιπλέον, η *GP* από σκελετικούς μύες κονίκλων εμφανίζει 98 % αμινοξική ομολογία με την ανθρώπινη ηπατική *GP* στο καταλυτικό κέντρο (βλ. Παράρτημα, Στοιχίση 1) και ως εκ τούτου οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει ως προς την *rmGPb* μπορούν να συσχετιστούν με το ανθρώπινο ένζυμο. Συγκριτικές μελέτες μεταξύ αυτών των ενζύμων έχουν δείξει ότι αναστολείς που

αναστέλλουν ισχυρά την *rmGPb*, *rmGPa* αναστέλλουν το ίδιο ισχυρά ή και πιο ισχυρά την *hlGPa* [56-58]

1.2.1. Η κρυσταλλική δομή της GP

Η GP είναι μια ομοδιμερής α-β πρωτεΐνη με το κάθε μονομερές να αποτελείται από 842 κατάλοιπα και να έχει μοριακό βάρος 97.4 kDa. Μεγάλο μέρος της μελέτης της κρυσταλλικής δομής της GP έγινε από τους Johnson & Barford [59]. Οι εργασίες τους έδειξαν ότι οι κρύσταλλοι της *rmGP* περιέχουν υψηλό ποσό ύδατος (~ 48 %) εγκλωβισμένο σε επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Από αυτά τα κανάλια μπορούν να διαχέονται μικρά μόρια στον κρύσταλλο τα οποία τελικά φτάνουν και προσδένονται στα κέντρα πρόσδεσης τους. Το κάθε μονομερές της GP έχει διαστάσεις 60 x 60 x 55 Å και αποτελείται από 52 % α-έλικες, 20 % β-πτυχωτά φύλλα, δύο έλικες 3₁₀ 6 και 12 καταλοίπων καθώς επίσης και μία έλικα π, 8 καταλοίπων. Οι έλικες της αποτελούνται από 7-32 κατάλοιπα και υπάρχει μια περιοχή 112 καταλοίπων (714-825) που αποτελείται από έλικες α ενώ υπάρχει και μια περιοχή 95 καταλοίπων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα. Η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου έχει μια συμπαγή δομή με ακτίνα 30 Å και υπάρχουν περιοχές που προεξέχουν αλλά και κανάλια που βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης καθώς και τη διέλευση μικρών μορίων στα κέντρα αυτά. Κάποιες χαρακτηριστικές δομικές περιοχές της GP εκτός από τα κέντρα πρόσδεσης είναι το επικάλυμμα (*cap*, κατάλοιπα 36-45), ο πύργος (*tower*, κατάλοιπα 260-276), ο βρόχος 280s (*loop 280s*, κατάλοιπα 282-289), ο βρόχος 380s (*loop 380s*, κατάλοιπα 380-390) και το N-τελικό άκρο (κατάλοιπα 1-18), στο οποίο βρίσκεται η θέση φωσφορυλίωσης στη *Ser14* (Εικόνα 5) [29].



Εικόνα 5: Η κρυσταλλική δομή της GP με επισήμανση στις επικράτειες 1 και 2 και στις χαρακτηριστικές δομικές περιοχές του ενζύμου: βρόχος 380s, βρόχος 280s, πύργος, επικάλυμμα, N-τελικό άκρο.

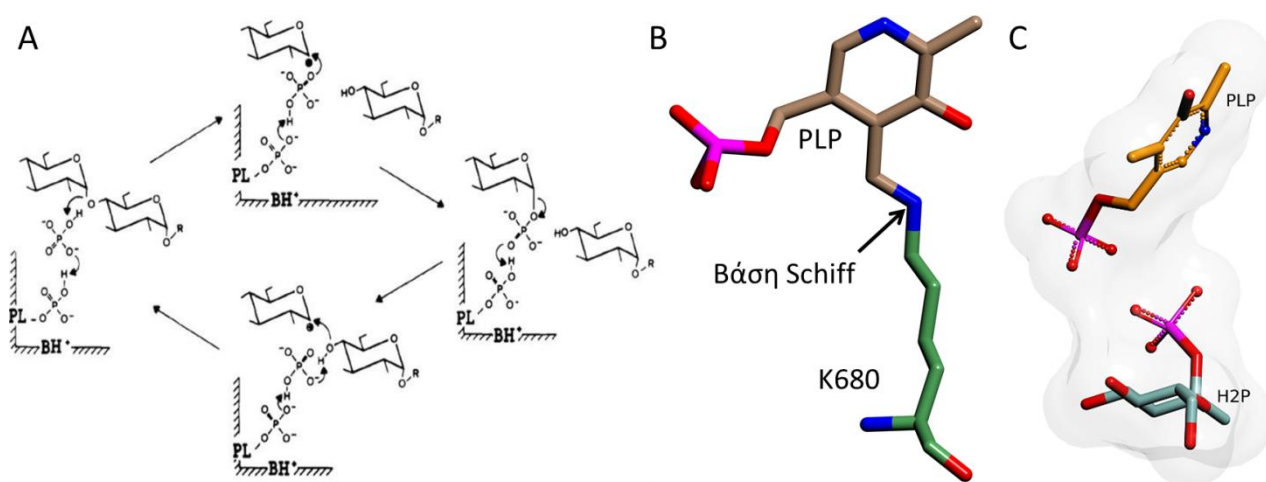
Η *GP* αποτελείται κυρίως από δύο επικράτειες: την επικράτεια 1 που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 1-484 και την επικράτεια 2 που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 485-842 [60]. Η επικράτεια 2 περιλαμβάνει ένα μέρος του καταλυτικού κέντρου όπου βρίσκεται προσδεσμένη ομοιοπολικά το συνένζυμο της, η *PLP*. Η επικράτεια 1 περιλαμβάνει το αλλοστερικό κέντρο, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, την *Ser14*, ένα μέρος του καταλυτικού κέντρου και σχηματίζει την περιοχή της διεπαφής μεταξύ των δύο υπομονάδων. Τέλος, το κέντρο αναστολής και το κέντρο σύνδεσης της κερσετίνης μοιράζονται μεταξύ των δύο επικρατειών [61, 62].

1.2.2. Ο καταλυτικός μηχανισμός της *GP*

Όπως αναφέρθηκε, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου απομακρύνει κατάλοιπα γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του γλυκογόνου με φωσφορόλυση του α -1,4 γλυκοζιτικού δεσμού (Εικόνα 4). Το προϊόν που προκύπτει είναι φωσφορυλιωμένο με αποτέλεσμα να μη χρειάζεται φωσφορυλίωση ώστε η φωσφορική γλυκόζη να εισαχθεί στη γλυκολυτική πορεία για παραγωγή ενέργειας. Επομένως, η φωσφορόλυση για παραγωγή *G1P* πλεονεκτεί ενεργειακά έναντι απλής υδρόλυσης για παραγωγή γλυκόζης καθώς δεν καταναλώνεται *ATP*. Η *GP* επιτυγχάνει την φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου με τη βοήθεια την φωσφορικής πυριδοξάλης (*PLP*) η οποία εδράζεται στο καταλυτικό κέντρο και σχηματίζει μια βάση *Schiff* μέσω της αλδεϋδικής της ομάδας με την λυσίνη 680 του ενζύμου (Εικόνα 6B) [12].

Το γλυκογόνο αλλά και το προϊόν της αντίδρασης της *GP* (*G1P*) έχει α -διαμόρφωση στο άτομο C-1, μια διαμόρφωση απαραίτητη για τον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου. Το συνένζυμο *PLP* βρίσκεται κοντά στη θέση πρόσδεσης του ορθοφωσφορικού ιόντος αλλά και της γλυκόζης (Εικόνα 9). Η αντίδραση που καταλύει η *GP* μπορεί να προχωρήσει είτε προς τα εμπρός, δηλαδή τη φωσφορόλυση α -1,4 γλυκοζιτικού δεσμού, είτε προς την αντίθετη κατεύθυνση, δηλαδή τον σχηματισμό α -1,4 γλυκοζιτικού δεσμού με παραγωγή ορθοφωσφορικού ιόντος κατά την ενσωμάτωση της *G1P* στον μακρομόριο του γλυκογόνου. Η φωσφορική ομάδα της *PLP* λειτουργεί ως δότης/δέκτης πρωτονίων λειτουργώντας με την μορφή διανιόντος σύμφωνα με το σχήμα της οξοβασικής κατάλυσης. Η φωσφορική ομάδα της *PLP* και του υποστρώματος έρχονται κοντά σε απόσταση δεσμού υδρογόνου και ως εκ τούτου είναι δυνατή η μεταφορά πρωτονίων (Εικόνα 6C). Κατά την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, αρχικά, γίνεται η πρωτονίωση του οξυγόνου του γλυκοζιδίου από το ορθοφωσφορικό ιόν το οποίο λειτουργεί σε αυτή τη περίπτωση ως οξύ. Έπειτα, διασπάται ο γλυκοζιτικός δεσμός και το οξοκαρβονικό ιόν σταθεροποιείται από το φωσφορικό διανιόν. Η

αντίδραση εξελίσσεται με νουκλεοφιλική επίθεση του φωσφόρου στο καρβονικό ιόν, κάτι το οποίο μπορεί να ωθεί το ορθοφωσφορικό να επαναπροσαρμόσει τη θέση του σε αυτή πριν τον σχηματισμό του δεσμού. Το προϊόν (*G1P*) απομακρύνεται και τότε ένα νέο φωσφορικό ιόν εισέρχεται στο καταλυτικό κέντρο. Κατά την αντιστρεπτή πορεία, γίνεται η δημιουργία ενός α-1,4 γλυκοζιτικού δεσμού και επέκταση της αλυσίδας του γλυκογόνου. Η αντίδραση ξεκινάει με την πρωτονίωση του φωσφόρου της *G1P*, κάτι το οποίο εξασθενεί τον γλυκοζιτικό δεσμό και οδηγεί στη σταθεροποίηση του συμπλόκου του καρβονικού ιόντος και φωσφορικού ανιόντος. Κατά την απομάκρυνση του, ο φώσφορος, μπορεί να λειτουργεί και ως αποδέκτης δεσμού υδρογόνου από το άτομο 4-OH του τερματικού μορίου γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του γλυκογόνου [49, 63, 64].



Εικόνα 6: **A)** Η ενζυμική αντίδραση που καταλύει η GP με τη συμμετοχή της PLP. Το πάνω μισό αναφέρεται στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου παρουσία ορθοφωσφορικών ιόντων ενώ το κάτω μισό η σύνθεση γλυκογόνου με προσθήκη *G1P*. PL = πυριδοξάλη, BH⁺ = πρωτονιωμένη βάση που παρέχεται από το ένζυμο [63]. **B)** Η PLP η οποία σχηματίζει βάση Schiff με την Lys680. **C)** Η κοντινή απόσταση μεταξύ (σε απόσταση δεσμού υδρογόνου) της PLP και του υποστρώματος (*heptulose-2-phosphate*), PDB-ID: 6GPB [65].

1.2.3. Αλλοστερικά φαινόμενα και αλλοστερική μετάπτωση στη GP

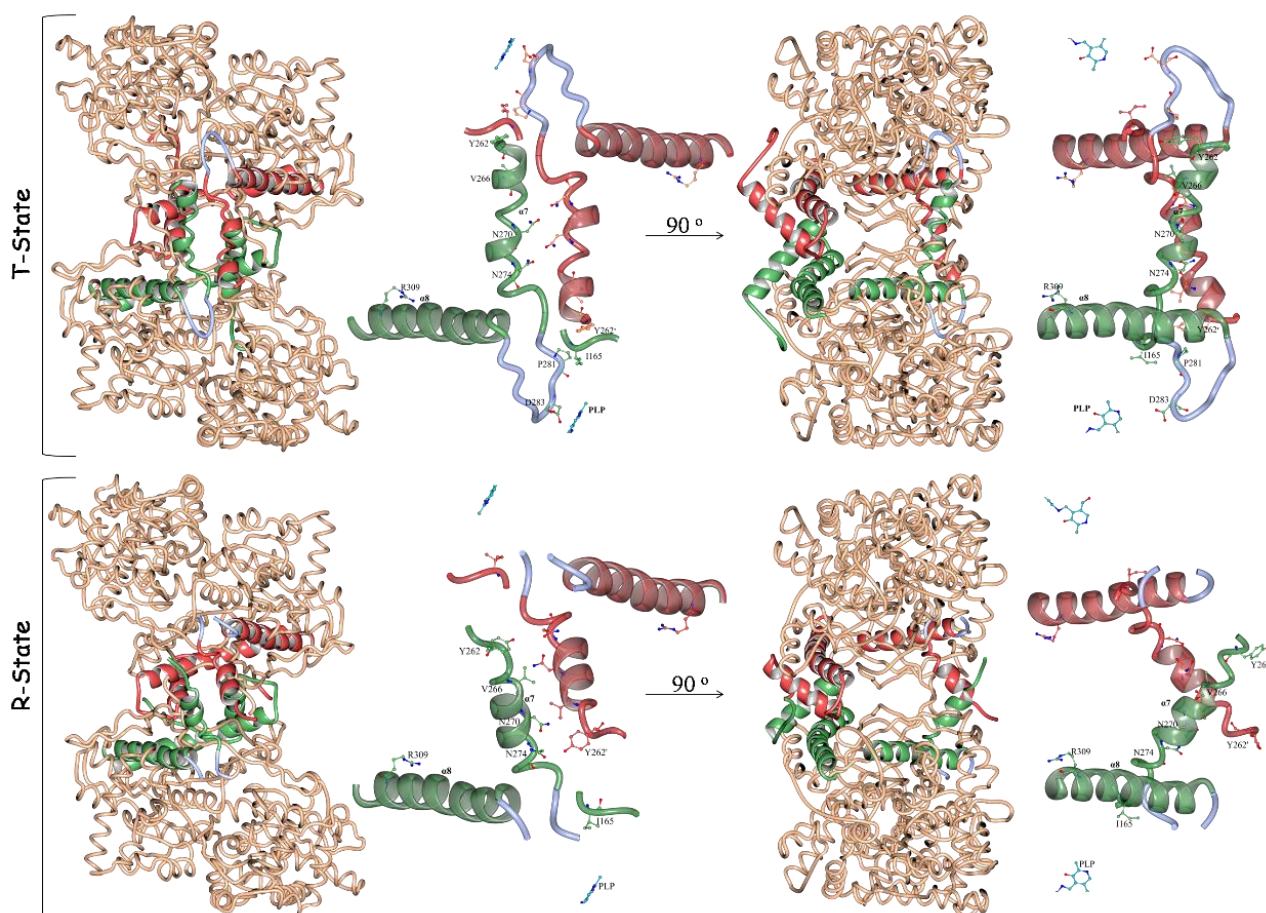
Η GP αποτέλεσε ένα εξαιρετικό μοντέλο για τη μελέτη των αλλοστερικών φαινομένων μιας και φαίνεται να είναι από τα πρώτα αλλοστερικά ένζυμα στο οποίο μελετήθηκαν εις βάθος τα αλλοστερικά φαινόμενα. Τα πειράματα των Cori είχαν δείξει ότι η ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει η GP αυξάνεται παρουσία της AMP μάλλον λειτουργώντας ως πιθανός συμπαράγοντας του ενζύμου [4]. Αργότερα, με την επίλυση της κρυσταλλικής δομής της GP, βρέθηκε ότι η AMP δεν αποτελεί συμπαράγοντα του ενζύμου ούτε συμμετέχει με κάποιο τρόπο στην αντίδραση, όπως η PLP, αλλά λειτουργεί ως αλλοστερικός ενεργοποιητής. Σύμφωνα με το μοντέλο MWC, ο αλλοστερικός ρυθμιστής επιφέρει αλλαγές στην λειτουργία του ενζύμου αλλάζοντας τη δομή του και όχι καταστρέφοντας την [50]. Αλλοστερικοί τροποποιητές μπορούν να επηρεάζουν τη λειτουργία του ενζύμου μέσω μιας αλλοστερικής μετάπτωσης

(αλλαγή στη διαμόρφωση) η οποία επάγεται όταν δεσμευτεί στο ένζυμο κάποιος προσδέτης. Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζονται ως ολιγομερή των οποίων τα μονομερή μπορούν να συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε το τελικό μόριο να έχει έναν τουλάχιστον άξονα συμμετρίας και το κάθε μονομερές να ισορροπεί μεταξύ μιας ενεργούς ή αλλιώς χαλαρής κατάστασης *R* (*Relax*) και μια ανενεργούς ή αλλιώς τεταμένης κατάστασης *T* (*Tense*). Η σύνδεση προσδετών σε ένα αλλοστερικό ένζυμο μπορεί να μετατοπίσει την ισορροπία προς τη μια ή την άλλη διαμόρφωση με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομότροπων και ετερότροπων αλληλεπιδράσεων. Οι ετερότροπες αλληλεπιδράσεις προκαλούνται από μόρια που δεν μοιάζουν με το υπόστρωμα και μπορούν να είναι είτε ενεργοποιητές είτε αναστολείς ενώ οι ομότροπες αλληλεπιδράσεις συνήθως εμφανίζονται από μικρά μόρια όπως το υπόστρωμα και οδηγούν σε ενεργοποίηση του ενζύμου. Στη *GP* παρατηρείται επίσης το φαινόμενο της συνέργειας (*cooperativity*) όπου η πρόσδεση ενός μορίου σε μια περιοχή δέσμευσης επηρεάζει κάποια άλλη περιοχή πρόσδεσης για ένα άλλο μόριο [50, 66, 67].

Η αλλοστερική μετάπτωση στην *GP*

Όταν το ένζυμο βρίσκεται στην στερεοδιαμόρφωση *T*, το καταλυτικό κέντρο δεν είναι προσβάσιμο λόγω του βρόχου 280s (282-287) ο οποίος τοποθετείται με τέτοιο τρόπο ώστε να φράζει την είσοδο στο καταλυτικό κέντρο (Εικόνα 7, Εικόνα 8). Πιο συγκεκριμένα, το κατάλοιπο *Asp283* κατευθύνεται προς το εσωτερικό του καταλυτικού κέντρου δημιουργώντας δεσμό με τη βοήθεια δυο μορίων ύδατος με την φωσφορική ομάδα 5' του συνενζύμου φωσφορική πυριδοξάλη. Ο βρόχος 280s τοποθετείται έναντι του βρόχου 380s (κατάλοιπα 377-384) σταθεροποιώντας το ένζυμο στην ανενεργή μορφή (Εικόνα 5). Όταν το ένζυμο μεταπίπτει από τη στερεοδιαμόρφωση *T*- στην *R*-, τότε ο βρόχος 280s μετατοπίζεται από το καταλυτικό κέντρο, κάτι το οποίο επιφέρει αλλαγή και στη διαμόρφωση του βρόχου 380s. Η *His571* αντικαθιστά το δεσμό υδρογόνου που δημιουργούσε με το κατάλοιπο *Asp283*, δημιουργώντας έναν άλλο δεσμό με την *Tyr613* και η *Arg569* αντικαθιστά την όξινη ομάδα της *Asp283* με αποτέλεσμα το καταλυτικό κέντρο να είναι προσβάσιμο. Αυτή η αλλαγή στην διαμόρφωση της *Arg569* οδηγεί σε διακοπή της αλληλεπίδρασης με τα κατάλοιπα *Asn133*, *Pro281* και *Ile165*, με τα οποία διατηρούσε αλληλεπιδράσεις στην στερεοδιαμόρφωση *T*. Ως αποτέλεσμα, τα κατάλοιπα *Asn133*, *Pro281* και *Ile165* αλλάζουν διαμόρφωση με συνέπεια οι αλλαγές στο καταλυτικό κέντρο να σχετίζονται με τις αλληλεπιδράσεις πύργου/πύργου, αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις στο κέντρο αναγνώρισης της *AMP* και στο κέντρο φωσφορυλίωσης (Εικόνα 5, Εικόνα 7, Εικόνα 8). Στην στερεοδιαμόρφωση *T*, το κατάλοιπο

Glu382 σχηματίζει μια γέφυρα άλατος με το κατάλοιπο *Arg770*. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση διασπάται αυτή η γέφυρα άλατος καθώς το κατάλοιπο *Glu382* μετατοπίζεται κατά 4.5 Å με αποτέλεσμα να μετακινείται η C-τελική περιοχή και η περιοχή αποθήκευσης του γλυκογόνου και τελικά να ελευθερώνεται η πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο. Στην αλλοστερική μετάπτωση από τη στερεοδιαμόρφωση *R* στην *T* εμφανίζονται μεγάλες διαφορές που παρατηρούνται κυρίως στην περιοχή αναγνώρισης των ορθοφωσφορικών ιόντων το οποίο είναι πλήρως διαμορφωμένο στη στερεοδιαμόρφωση *R* [60, 64, 68]. Σημαντικό ρόλο στην κατάλυση της *GP* παίζει επίσης ο ιονισμός της φωσφορικής ομάδας 5' της *PLP* ο οποίος μεταβάλλεται κατά την αλλοστερική μετάπτωση. Όταν το ένζυμο βρίσκεται στη στερεοδιαμόρφωση *T* τότε η φωσφορική ομάδα βρίσκεται ως μονοϊόν και το ένζυμο εμφανίζει χαμηλή αχιστεία για το υπόστρωμα. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση στη στερεοδιαμόρφωση *R*, ο ιονισμός της φωσφορικής ομάδας 5' της *PLP* μεταβάλλεται σε διανιόν και τότε η *GP* εμφανίζει μεγάλη αχιστεία για το υπόστρωμα [64].



Εικόνα 7: Η αλλοστερική μετάπτωση στην *GP*. Το γεγονός εντοπίζεται καλύτερα στις αλλαγές στην διαμόρφωση των πύργων που οδηγεί σε μετατόπιση του βρόχου 280s από το καταλυτικό κέντρο. Στη στερεοδιαμόρφωση *R* ο βρόχος 280s δεν είναι πλήρως ορατός στην κρυσταλλική δομή λόγω της ευκινησίας του.

1.2.4. Ρύθμιση της δράσης της GP

Η GP υπόκειται σε ορμονικό έλεγχο μέσω της δράσης των ορμονών ινσουλίνη και γλυκαγόνη όπως αναλύθηκε προηγουμένως, αλλά και μέσω αλλοστερικών ενεργοποιητών ή αναστολέων οι οποίοι συνδέονται σε διάφορα κέντρα ρύθμισης της GP. Σε ότι αφορά την αναγνώριση ορθοφωσφορικών ιόντων, στη GP υφίστανται τρία κέντρα, α) το καταλυτικό κέντρο (Εικόνα 9), β) το αλλοστερικό κέντρο (κέντρο πρόσδεσης *ATP/AMP*) και γ) το κέντρο φωσφορυλίωσης της *Ser14*. Η φωσφορυλίωση της *Ser14* από την *PhK* μετατρέπει την *GPb* σε *GPa* και την ενεργοποιεί, ενώ αντίθετα η *PP1* αποφωσφορυλιώνει την *GPa* σε *GPb* και την απενεργοποιεί [60].

1.2.4.1. Το πεπτίδιο φωσφορυλίωσης

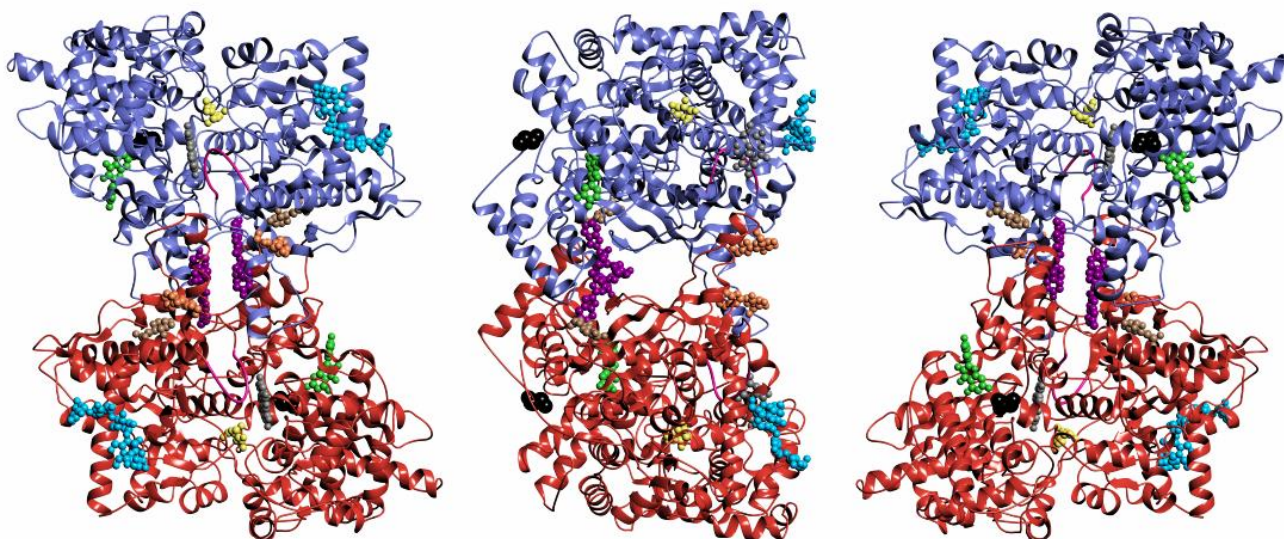
Ως πεπτίδιο φωσφορυλίωσης αναφέρεται η αρχή της N-τελικής περιοχής του ενζύμου (κατάλοιπα 5-22) όπου βρίσκεται η *Ser14*. Για να αποφωσφορυλιωθεί το ένζυμο από την *PP1* και να μετατραπεί ξανά σε *GPb*, πρέπει πρώτα το ένζυμο να βρεθεί στη στερεοδιαμόρφωση *T*, δηλαδή, φυσιολογικά να έχει συνδεθεί η γλυκόζη. Η αιτιολογία για το φαινόμενο αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι όταν η *GPa* βρίσκεται στην ανενεργή στερεοδιαμόρφωση *T* το πεπτίδιο φωσφορυλίωσης είναι αποδιαταγμένο (ευκίνητο) στην κρυσταλλική δομή καθώς δεν παρατηρείται διακριτό περίγραμμα στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας για τα πρώτα 23 κατάλοιπα. Επομένως, στην στερεοδιαμόρφωση *T* το πεπτίδιο φωσφορυλίωσης είναι προσβάσιμο για να φωσφορυλιωθεί από την *PhK*. Όταν το ένζυμο βρίσκεται στην ενεργή φωσφορυλιωμένη στερεοδιαμόρφωση *R (GPa)*, τότε το πεπτίδιο φωσφορυλίωσης βρίσκεται πολύ καλά εντοπισμένο στην επιφάνεια του ενζύμου στην κρυσταλλική δομή και δημιουργεί αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Τα κατάλοιπα αυτά θωρακίζουν την φωσφορική ομάδα με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η δράση της φωσφατάσης. Όταν συνδεθεί η γλυκόζη στο καταλυτικό κέντρο, τότε το ένζυμο μεταπίπτει στη στερεοδιαμόρφωση *T* και η *PP1* μπορεί να αποφωσφορυλιώσει το ένζυμο αφού το πεπτίδιο φωσφορυλίωσης είναι και πάλι προσβάσιμο [53].

1.2.4.2. Τα κέντρα σύνδεσης μικρών μορίων στην GP

Εκτός από φωσφορυλίωση, η δράση της GP ρυθμίζεται από τη δράση μικρών μορίων τα οποία προσδένονται στα κέντρα σύνδεσης και μπορούν είτε να ενεργοποιήσουν είτε να αναστείλουν το ένζυμο. Τα κέντρα αυτά είναι:

- Καταλυτικό κέντρο [69].
- Κέντρο αναστολής [70].

- Αλλοστερικό κέντρο [71].
- Νέο αλλοστερικό κέντρο [72].
- Κέντρο αποθήκης του γλυκογόνου [73].
- Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης [62].
- Κέντρο πρόσδεσης της βενζαμιδαζόλης [74].



Εικόνα 8: Η κρυσταλλική δομή της GP σε σύμπλοκο με διάφορους προσδέτες με στροφή 90° μεταξύ τους ώστε να παρατηρούνται καλύτερα τα κέντρα πρόσδεσης. Αποτυπώνονται το καταλυτικό κέντρο (κίτρινο), το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου (γαλάζιο), το κέντρο αναστολής (γκρι), το αλλοστερικό κέντρο (καφέ), το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης (πράσινο), το νέο αλλοστερικό κέντρο (μωβ), το κέντρο της βενζαμιδαζόλης (πορτοκαλί), η *Ser14* (μαύρο) και ο βρόχος 280s (ροζ).

1.2.4.2.1. Το καταλυτικό κέντρο

Στο κέντρο της κάθε υπομονάδας, μακριά από τη περιοχή της διεπαφής μεταξύ των δυο υπομονάδων, βρίσκεται το καταλυτικό κέντρο το οποίο όμως συνδέεται με την περιοχή της διεπαφής μέσω του βρόχου 280s (Εικόνα 8). Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται θαμμένο, στη βάση μια στενής διόδου που σχηματίζεται στη διεπιφάνεια των δύο περιοχών της κάθε υπομονάδας και περιλαμβάνει το συμπαράγοντα *PLP* [68]. Η *Lys680* η οποία εδράζεται στο καταλυτικό κέντρο της GP περιορίζεται χωρικά λόγω αλληλεπιδράσεων με μια έλικα π (κατάλοιπα 488-494) της GP η οποία βρίσκεται αρκετά κοντά με τη *Lys680*. Η *Trp491* βρίσκεται τοποθετημένη πάνω από την *Lys680* και μέσω αλληλεπιδράσεων *van der Waals* σταθεροποιεί τη διάταξη της *Lys680-PLP* σε τέτοια θέση ώστε να είναι επιτρεπτή η αλληλεπίδραση της φωσφορικής ομάδας 5' της *PLP* με το υπόστρωμα (ορθοφωσφορικό ιόν) [75]. Η θέση αναγνώρισης του ορθοφωσφορικού ανακαλύφθηκε από τους *Oikonomakos, N.G* και συνεργάτες στο σύμπλοκο με *IMP* και γλυκόζη [29]. Η θέση στην οποία προσδένεται το ορθοφωσφορικό ιόν, βρίσκεται κοντά στην περιοχή όπου εδράζεται η φωσφορική ομάδα 5'

της *PLP* και η απόσταση μεταξύ αυτών των δύο ορθοφωσφορικών ιόντων είναι $\sim 1.2 \text{ \AA}$ (Εικόνα 9) [76].

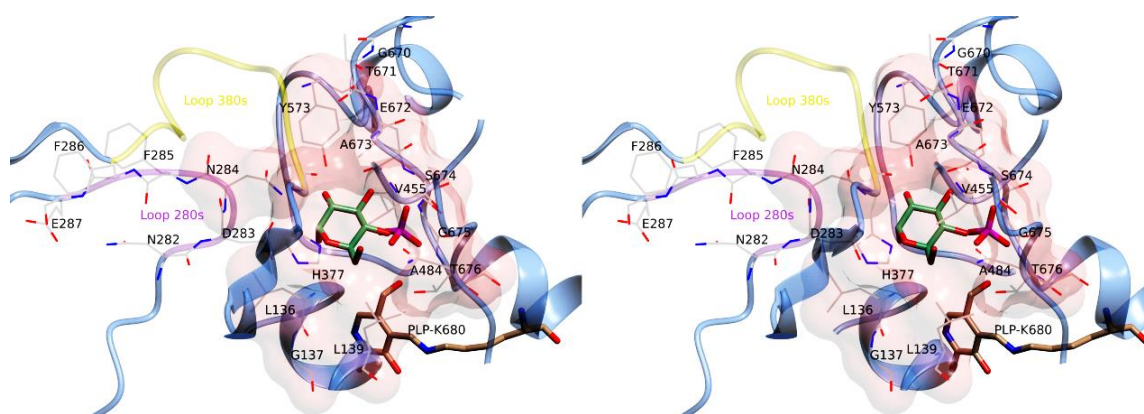
Πίνακας 2: Ενημερωμένος πίνακας από την ανασκόπηση των *Hayes, J.*, και συνεργατών το 2014 για τα πιο ισχυρά ανάλογα γλυκόζης και τροποποιημένης γλυκοκυρανόζης ως προς την *rmGPb* [77].

Αύξων αριθμός	Χημική δομή	K_i (μM)	Αύξων αριθμός	Χημική δομή	K_i (μM)
1		0.031 [78]	10		0.7
2		0.16	11		0.84
3		0.191 [79]	12		1.02
4		0.280 [78]	13		1.19 [80]
5		0.35	14		1.21
6		0.39	15		1.7
7		0.41	16		1.8
8		0.63	17		1.9
9		0.67	18		1.94

Επιπλέον, κοντά στην περιοχή πρόσδεσης του ορθοφωσφορικού ιόντος ($\sim 5 \text{ \AA}$ από την φωσφορική ομάδα 5' της *PLP*), έχει βρεθεί ότι προσδένονται θειικά ιόντα όταν οι κρύσταλλοι έχουν αναπτυχθεί παρουσία 1.2 M θειικού αμμωνίου. Σε αυτούς τους κρυστάλλους η *GP* βρέθηκε ότι σχηματίζει τετραμερές και βρίσκεται στη στερεοδιαμόρφωση *R* καθώς τα θειικά ιόντα προσδένονται στη θέση αναγνώρισης φωσφορικών ιόντων της *Ser14* ενεργοποιώντας

το ένζυμο [81]. Οι ιδιότητες του καταλυτικού κέντρου της *GP* έχουν μελετηθεί κυρίως με την πρόσδεση της γλυκόζης, το φυσιολογικό αναστολέα του ενζύμου, αλλά και με ανάλογα της μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων [52, 69, 77, 82-84]. Η K_i της β-D-γλυκόζης ως προς την *GPb* είναι 7.4 mM [52] ενώ της α-D-γλυκόζης ως προς τις *rmGPb*, *rmGPa* και *hlGPa* είναι 1.7 mM [52], 2 mM [85] και 4.28 mM [57] αντίστοιχα. Η χαμηλή συγγένεια της γλυκόζης προς το ένζυμο, εξασφαλίζει ότι η *GP* θα απενεργοποιηθεί μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης αποτρέποντας την υπογλυκαιμία [12].

Η πρόσδεση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο γίνεται κυρίως μέσω δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων *van der Waals* με τα κατάλοιπα *Gly135*, *Leu136*, *Leu139*, *Asn284*, *His377*, *Val455*, *Asn484*, *Glu672*, *Ala673*, *Ser674*, *Gly675*. Επιπρόσθετα, μόρια ύδατος γεφυρώνουν αλληλεπιδράσεις της γλυκόζης με γειτονικά κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου της *GP*. Κατά κύριο λόγο, η αναστολή των ενώσεων που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις με κατάλοιπα της β-εσοχής της *GP* και τη σταθεροποίηση του βρόχου 280s στην κλειστή διαμόρφωση με αποτέλεσμα το ένζυμο να σταθεροποιείται στη στερεοδιαμόρφωση *T*. Η β-εσοχή του ενζύμου είναι μια περιοχή η οποία αποτελεί επέκταση του καταλυτικού κέντρου και ονομάζεται έτσι γιατί μόνο β-υποκατεστημένα ανάλογα γλυκόζης, όπως αυτά που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, μπορούν να προσδεθούν εκεί. Η εσοχή αυτή του ενζύμου αποτελείται κυρίως από υδρόφοβα αλλά και υδρόφιλα κατάλοιπα. Οι ιδιότητες αυτές της β-εσοχής αναδεικνύονται και αξιοποιούνται κατά τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων [29].



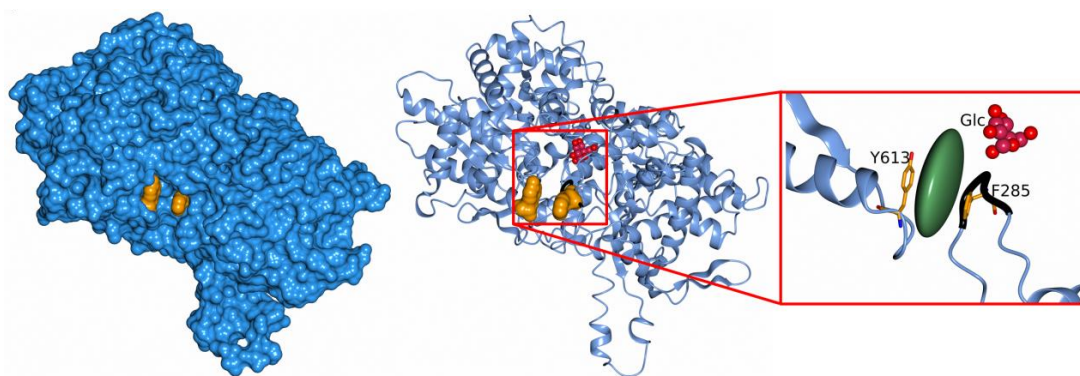
Εικόνα 9: Η αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου της *rmGPb* σε σύμπλοκο με την α-D-γλυκόζη και φωσφορικό ιόν. PDB-ID: 2SKD [76].

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα πιο βιοδραστικά ανάλογα γλυκόζης που έχουν μελετηθεί έναντι της *GP* σε φθίνουσα σειρά με βάση την K_i ως προς την *rmGPb* [57, 77]. Ο πιο βιοδραστικός αναστολέας μέχρι σήμερα, **8b** (Πίνακας 2-ένωση **1**), αναστέλλει την *rmGPb* με K_i

31 nM, την *hIGPa* με 26 nM [57] και διαθέτει έναν δακτύλιο ναφθαλενίου ο οποίος συνδέεται με τη γλυκοπυρανόζη μέσω ενός ιμιδαζολικού δακτυλίου ενώ αρκετά βιοδραστική εμφανίζεται και η αντίστοιχη ένωση με τριαζολικό δακτύλιο (K_i : 0.41 μ M, Πίνακας 2-ένωση 7). Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι γλυκοπυρανόσυλο-σπείρο-ισοξαζολίνες (K_i 0.63 μ M, Πίνακας 2-ένωση 8) και σπείρο-οξαθειαζολίνες (K_i : 0.16 μ M, Πίνακας 2-ένωση 2) οι οποίες αναστέλλουν ισχυρά το ένζυμο και βρίσκονται στις πρώτες οκτώ θέσεις του πίνακα.

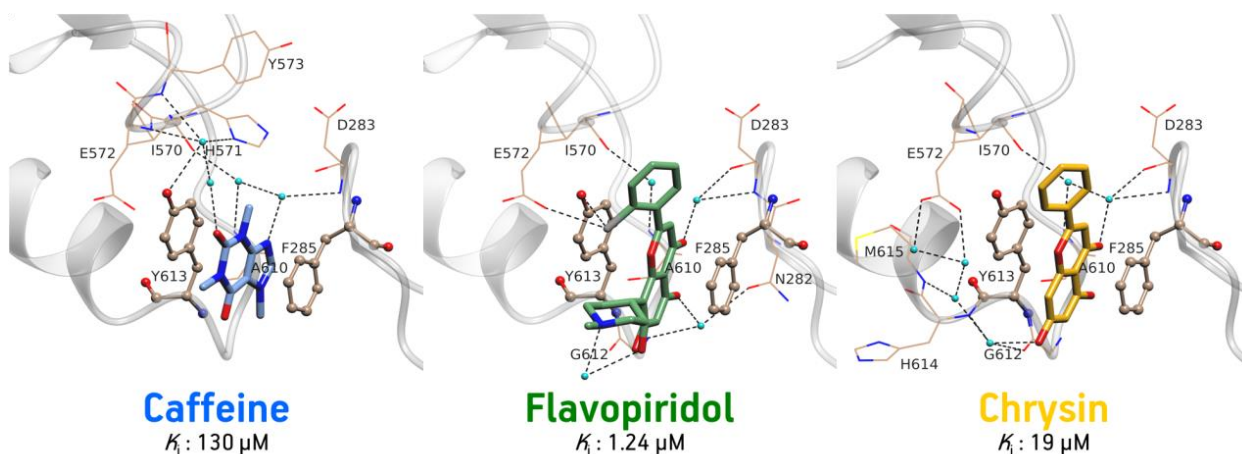
1.2.4.2.2. Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο πρόσδεσης της καφεΐνης ή αλλιώς κέντρο αναστολής, το οποίο δεν έχει μελετηθεί σε τόση έκταση όσο το καταλυτικό κέντρο, βρίσκεται στην επιφάνεια της *GP* σε απόσταση ~ 12 Å από το καταλυτικό κέντρο και αποτελεί μια σχισμή στο ένζυμο που σχηματίζεται από την παράλληλη διάταξη των αρωματικών δακτυλίων των καταλοίπων *Tyr613* και *Phe285* (Εικόνα 10) [86, 87]. Η πιο γνωστή ένωση που προσδένεται σε αυτό το κέντρο είναι η καφεΐνη [70] η οποία εμφανίζει K_i ίση με 130 και 170 μ M για τις *GPb* και *GPa*, αντίστοιχα [86]. Επιπλέον, η καφεΐνη εμφανίζει συνεργατική δράση με τη γλυκόζη, δηλαδή η ανασταλτική της ισχύ αυξάνεται παρουσία γλυκόζης και μειώνεται απουσία της [88]. Αυτό το φαινόμενο έχει ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον διότι αναστολείς που εμφανίζουν συνεργατικότητα με τη γλυκόζη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να αποτραπεί το φαινόμενο της υπογλυκαιμίας το οποίο αποτελεί τη συχνότερη παρενέργεια στους διαβητικούς ασθενείς. Όταν θα υπάρχει αυξημένη γλυκόζη στο αίμα, τότε η αναστολή της *GP* θα είναι ισχυρότερη από όταν τα επίπεδα της θα βρίσκονται στο φυσιολογικό όριο.



Εικόνα 10: Απεικόνιση του κέντρου αναστολής στο μονομέρες της *GP*. Αναστολείς σε αυτό το κέντρο τοποθετούνται μεταξύ των αρωματικών καταλοίπων *Tyr613* και *Phe285* και αποτρέπουν την είσοδο του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο. Με μαύρο αποτυπώνεται ο βρόχος 280s, με κόκκινες σφαίρες η γλυκόζη που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο της *GP* και με πράσινο η θέση πρόσδεσης του αναστολέα.

Η πρόσδεση των αναστολέων στο κέντρο αναστολής γίνεται κυρίως μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των αναστολέων και των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων *Tyr613* και *Phe285* (Εικόνα 11).

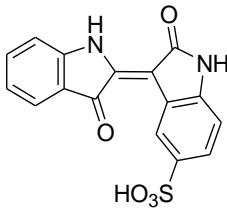
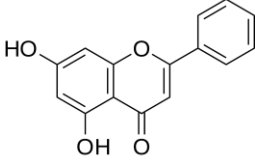
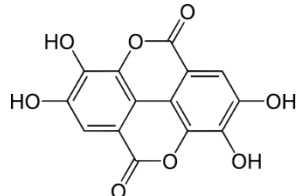


Εικόνα 11: Η πρόσδεση στο κέντρο αναστολής της καφεΐνης [70, 86], φλαβοπιριδόλης [70] και της χρυσίνης [89]. Τα μόρια ύδατος απεικονίζονται με γαλάζιο χρώμα και οι δεσμοί υδρογόνου με διακεκομμένες μαύρες γραμμές.

Επιπλέον, μόρια ύδατος γεφυρώνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναστολέα και των γειτονικών καταλοίπων του κέντρου αναστολής της GP. Είναι γνωστό ότι στο κέντρο αυτό προσδένεται επίσης η φλαβοπιριδόλη (K_i 1.24 μM , [89]), ένα συνθετικό φλαβονοειδές και αντικαρκινικό φάρμακο (αναστολέας της CDK2) η οποία δρα συνεργατικά με τη γλυκόζη [70]. Όπως και στο καταλυτικό κέντρο, έτσι και στο κέντρο αναστολής, η σύνδεση ενώσεων οδηγεί στη σταθεροποίηση του βρόχου 280s σε μια διαμόρφωση η οποία αποτρέπει την πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο GP.

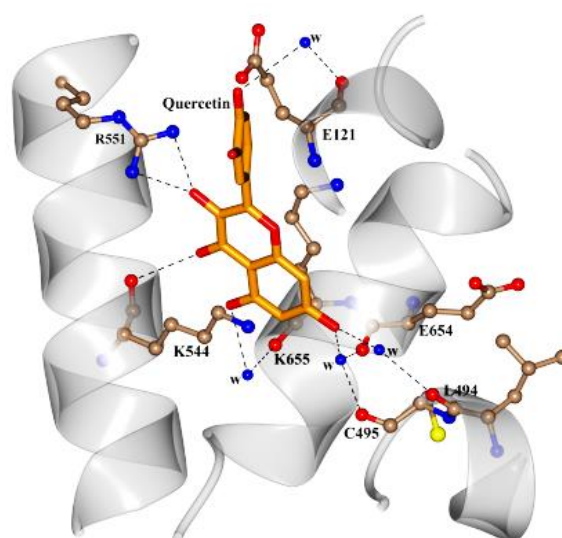
Πίνακας 3: Ενώσεις που προσδένονται στο κέντρο αναστολής της GP μαζί με τις τιμές των K_i ως προς την gmGPb [77].

Χημική ένωση	Χημική δομή	K_i [μM]																
Καφεΐνη		130 [86]																
Φλαβοπιριδόλη		1.16 [70] 1.24 [89]																
Ανάλογα φλαβοπιριδόλης		<table border="1"> <thead> <tr> <th>R</th> <th>K_i [μM]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>H</td> <td>1.28</td> </tr> <tr> <td>2-Cl</td> <td>0.99</td> </tr> <tr> <td>3-Cl</td> <td>0.83</td> </tr> <tr> <td>4-Cl</td> <td>1.89</td> </tr> <tr> <td>2-F</td> <td>2.75</td> </tr> <tr> <td>2-Br</td> <td>1.50</td> </tr> <tr> <td>3,5-diCl</td> <td>2.50</td> </tr> </tbody> </table>	R	K_i [μM]	H	1.28	2-Cl	0.99	3-Cl	0.83	4-Cl	1.89	2-F	2.75	2-Br	1.50	3,5-diCl	2.50
R	K_i [μM]																	
H	1.28																	
2-Cl	0.99																	
3-Cl	0.83																	
4-Cl	1.89																	
2-F	2.75																	
2-Br	1.50																	
3,5-diCl	2.50																	

5'-σουλφονική ινδουβίνη (E226)		13.8 [91]
Χρυσίνη		19.01 [89]
Ελλαγακό οξύ		13.4 [92] (7.5 μM, rmGPa [92])

1.2.4.2.3. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Το 2014 οι *Kantsadi A.L* και συνεργάτες πραγματοποίησαν μια μελέτη για την αξιολόγηση εκχυλισμάτων παραπροϊόντων οινοποίησης με μια μέθοδο η οποία αργότερα ονομάστηκε κρυσταλλογραφία συγγένειας (βλ. παράγραφο 1.4). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε μια ένωση η οποία προσδεόταν σε ένα κέντρο της *GP* το οποίο δεν είχε ανακαλυφθεί προηγουμένως. Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι από όλα τα συστατικά του εκχυλίσματος, η κερσετίνη ήταν αυτή που ταίριαζε καλύτερα στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκε και ως εκ τούτου το κέντρο αυτό ονομάστηκε κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης. PDB-ID: 4MRA.

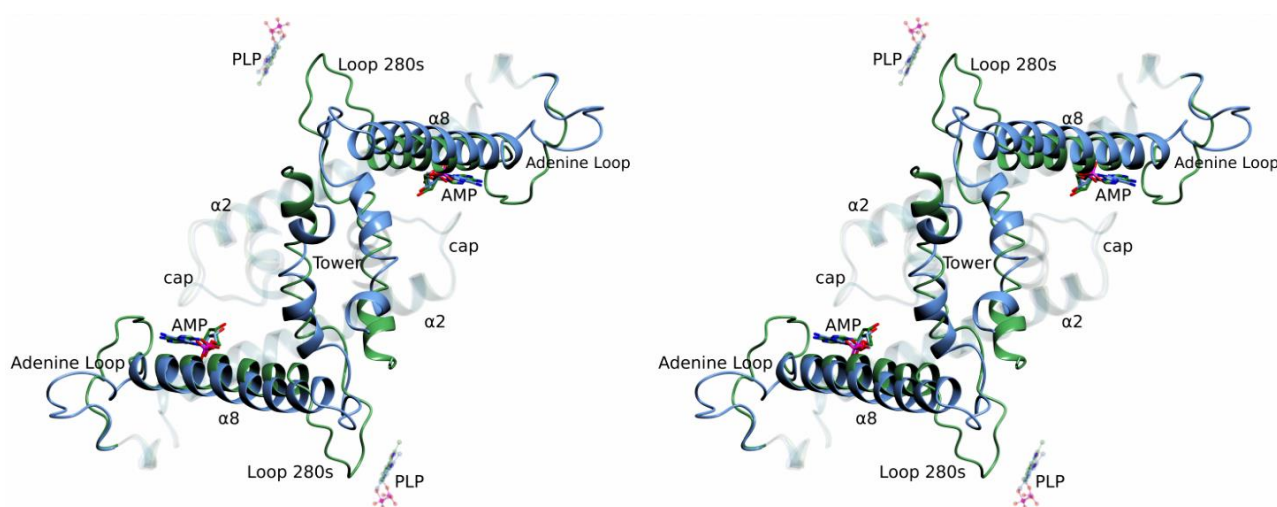
Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι η κερσετίνη αναστέλλει την *GP* με IC_{50} 4.8 μM για την *GPa* και 20.9 μM για την *GPb* αλλά δεν είχε ταυτοποιηθεί το κέντρο πρόσδεσης της [93]. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου σε απόσταση 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 15 Å από το καταλυτικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής και αποτελείται τόσο από κατάλοιπα της επικράτειας 1 (*Glu120*, *Glu123*) όσο και από κατάλοιπα της επικράτειας 2 (*Tyr548*, *Lys544*, *Arg551* και *Lys655*) [62].

1.2.4.2.4. Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο σχηματίζεται από την επαφή της περιοχής του επικαλύμματος (κατάλοιπα 36-47) της μιας υπομονάδας με το πτυχωτό φύλλο $\beta 7$ και την έλικα $\alpha 2$ της δεύτερης υπομονάδας. Στο διμερές της *GP* οι δύο υπομονάδες έρχονται κοντά από αντίθετες πλευρές και σχηματίζονται δύο επαφές. Η πρώτη επαφή δημιουργείται από την έλικα $\alpha 2$ και το φύλλο $\beta 7$ της πρώτης υπομονάδας με την περιοχή του επικαλύμματος (κατάλοιπα 36-47) της δεύτερης υπομονάδας με τις αντίστοιχες επαφές να παρατηρούνται κατά τον δυαδικό άξονα συμμετρίας (Εικόνα 13). Στη δεύτερη επαφή συμμετέχει η διεπαφή του πύργου (*tower*) και δημιουργείται από την αντιπαράλληλη τοποθέτηση των δύο συμμετρικών ελίκων $\alpha 7$ (κατάλοιπα 262-276). Το αλλοστερικό κέντρο συμπληρώνεται από δύο έλικες ($\alpha 2$ και $\alpha 8$) και από ένα μικρό β φύλλο ($\beta 7$) και είναι κλειστό από την περιοχή του επικαλύμματος. Στο κέντρο αυτό έχουν βρεθεί να προσδέονται μόρια όπως η *ATP*, *AMP*, *IMP*, *G6P*, *UDP-Glc*, δηλαδή φωσφορυλιωμένοι παράγοντες με τις *AMP* και *IMP* να ενεργοποιούν το ένζυμο ενώ οι υπόλοιπες το αναστέλλουν [29]. Το γεγονός ότι αυτές οι ενώσεις αλληλεπιδρούν με το ένζυμο (κυρίως με τη μυϊκή μορφή) και επηρεάζουν τη δραστηριότητα του υποδηλώνει ότι η δραστηριότητα του ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου.

Φυσιολογικά, όταν οι μύες βρίσκονται σε ηρεμία, σχεδόν όλη *GPb* είναι μη δραστική λόγω της ανασταλτικής δράσης της *G6P* και της *ATP*. Κατά την άσκηση, όπου αυξάνεται η παραγωγή της *AMP*, η *GPb* μεταπίπτει από την στερεοδιαμόρφωση *T* στην *R* [12]. Η διαφορά στην επίδραση των δύο αυτών νουκλεοτιδίων οφείλεται στον τρόπο με τον οποίο προσδέονται στο ένζυμο. Συνοπτικά, η *AMP* προσδέεται δημιουργώντας αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα του αλλοστερικού κέντρου, προάγοντας αλλαγές στη διαμόρφωση του βρόχου 280s με αποτέλεσμα να μετατοπίζεται από το καταλυτικό κέντρο και το ένζυμο να ενεργοποιείται (Εικόνα 13). Η *ATP* παρότι συνδέεται στο ίδιο κέντρο, δεν ενεργοποιεί το ένζυμο λόγω της τριφωσφορικής της ομάδας. Ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ της α - και β - φωσφορικής ομάδας της *ATP* εντοπίζεται στη θέση της φωσφορικής ομάδας της *AMP* με αποτέλεσμα η

νουκλεοτιδική περιοχή της *AMP* να ωθείται εξωτερικά προς τον διαλύτη σε σύγκριση με την αντίστοιχη θέση της νουκλεοτιδικής περιοχής της *AMP* [94]. Σε αυτή τη διαμόρφωση ο δακτύλιος της αδενίνης της *ATP* δεν σχηματίζει *van der Waals* αλληλεπιδράσεις ή δεσμούς υδρογόνου με κατάλοιπα της πρωτεΐνης και η πρόσδεση του εμφανίζεται αποδιαταγμένη. Επομένως, η πρόσδεση της *ATP* δεν είναι ικανή να προκαλέσει τις απαραίτητες αλλαγές στη διαμόρφωση ώστε να ενεργοποιηθεί το ένζυμο [94]. Στο αλλοστερικό κέντρο προσδένεται πολύ ισχυρά η ένωση *Bayer-W1807* (Πίνακας 4, ένωση-1) σχηματίζοντας πολλές μη πολικές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Η *W1807* αναστέλλει το ένζυμο με K_i 1.6 nM και η πρόσδεση της σταθεροποιεί το ένζυμο στη στερεοδιαμόρφωση *T* [95].



Εικόνα 13: Στέρεο-απεικόνιση της υπέρθεσης των δομών της *hIGPa* (γαλάζιο, *PDB-ID*: 1FA9) και της *hmGPb* (πράσινο, *PDB-ID*: 3Z8D) σε σύμπλοκο με την *AMP* και έναν αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο (δεν παρουσιάζεται) με έμφαση στο αλλοστερικό κέντρο της *GP*¹. Παρουσιάζεται η επικοινωνία του αλλοστερικού κέντρου και του βρόχου 280s μέσω της έλικας $\alpha 8$. Επιπλέον παρουσιάζεται η μεγάλη διαφορά που υπάρχει στη διαμόρφωση του βρόχου αδενίνης μεταξύ της ηπατικής και της μυϊκής ισομορφής.

Ορισμένες από τις ενώσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4 είναι από τρεις (Πίνακας 4, ένωση 8) έως εννέα φορές (Πίνακας 4, ένωση 5) πιο δραστικές ως προς την *hIGP* συγκριτικά με την *hmGP* [96]. Επιπλέον, η ένωση 3 από τον Πίνακα 4 (~ 3 φορές πιο ισχυρή ως προς την *hIGP*) οδήγησε σε σταθεροποίηση των επιπέδων της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα όταν χορηγήθηκε σε ποντίκια *db/db* (έλλειψη λεπτίνης), ενός μοντέλου για τον ΣΔ2. Η ίδια ένωση φάνηκε ότι μπορεί να αναστέλλει την επαγόμενη από γλυκαγόνη γλυκογονόλυση σε ηπατοκύτταρα αρουραίων με τιμή EC_{50} ίση με 270 nM [97].

¹ Η σύνδεση του αναστολέα στο σύμπλοκο *hIGPa-AMP* δεν οδηγεί σε αλλοστερική μετάπτωση το ένζυμο με αποτέλεσμα η *hIGPa* να βρίσκεται στην στερεοδιαμόρφωση-*R*, σε αντίθεση με το μη φωσφορυλιωμένο μυϊκό ένζυμο στο οποίο η πρόσδεση του αναστολέα σταθεροποιεί το ένζυμο στην στερεοδιαμόρφωση-*T* παρά την πρόσδεση της *AMP*.

Πίνακας 4: Κάποιοι από τους πιο ισχυρούς αναστολείς για το αλλοστερικό κέντρο της GP [77].

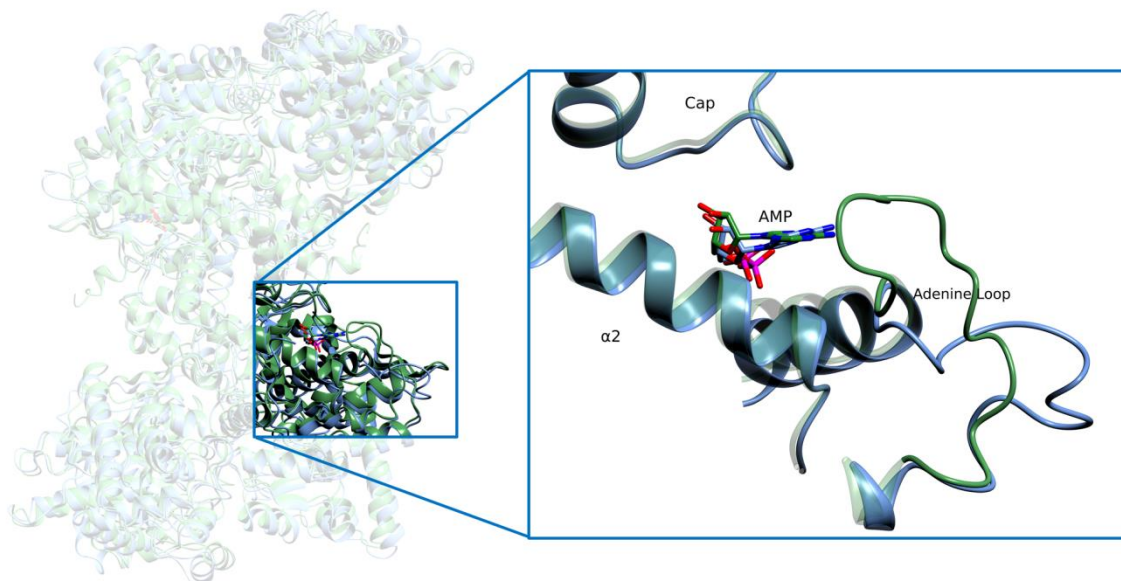
Αύξων Αριθμός	Χημική δομή	Υποκαταστάτες	<i>hIGPa</i> [nM]
		R	
1		-CH ₂ CH ₃	39 (1.6)*
2			2
3			4
4			5
		X	
5		3'-F	1
6		H	3
7		4'-F	13
8			1
		X	
9		X ¹ = H X ² = OH	23
10		X ¹ = F X ² = NHCONHMe	53

* K_i: 1.6 nM ως προς την *rmGPb* [95]

1.2.4.2.4.1. Το αλλοστερικό κέντρο στην *mGP* και *IGP*.

Η *mGPb* ενεργοποιείται από την πρόσδεση της *AMP* ενώ η ενεργή φωσφορυλιωμένη μορφή, *mGPa*, εμφανίζει μια αύξηση στη δραστηριότητα παρουσία της *AMP* της τάξης του ~ 20 %. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η δραστηριότητα της *IGP* δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την παρουσία της *AMP*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα κατάλοιπα του αλλοστερικού κέντρου τόσο στην *mGP* όσο και στην *IGP* είναι συντηρημένα αλλά πολλές από τις αλληλεπιδράσεις που δημιουργεί η *AMP* με την *mGP* απουσιάζουν από το σύμπλοκο *AMP-IGP* [53]. Η απώλεια αυτών των αλληλεπιδράσεων οφείλεται κυρίως σε μια περιστροφή μεταξύ των δύο υπομονάδων και δευτερευόντως σε μεταβολές των θέσεων των

πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων. Η περιστροφή των υπομονάδων αυξάνει την απόσταση μεταξύ των ατόμων άνθρακα $C\alpha$ του καλύμματος και της έλικας $\alpha 2$ με αποτέλεσμα οι 5 δεσμοί υδρογόνου που υπάρχουν στο σύμπλοκο *AMP-mGP* να απουσιάζουν στο σύμπλοκο *AMP-IGP*. Στο μυϊκό ένζυμο η *AMP* αλληλεπιδρά επίσης με κατάλοιπα ενός βρόχου στην επιφάνεια του ενζύμου, γνωστός ως βρόχος αδενίνης (κατάλοιπα 315-325). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές δεν παρατηρούνται στην *IGP* καθώς ο βρόχος αδενίνης έχει διαφορετική διαμόρφωση για δύο βασικούς λόγους (Εικόνα 14).



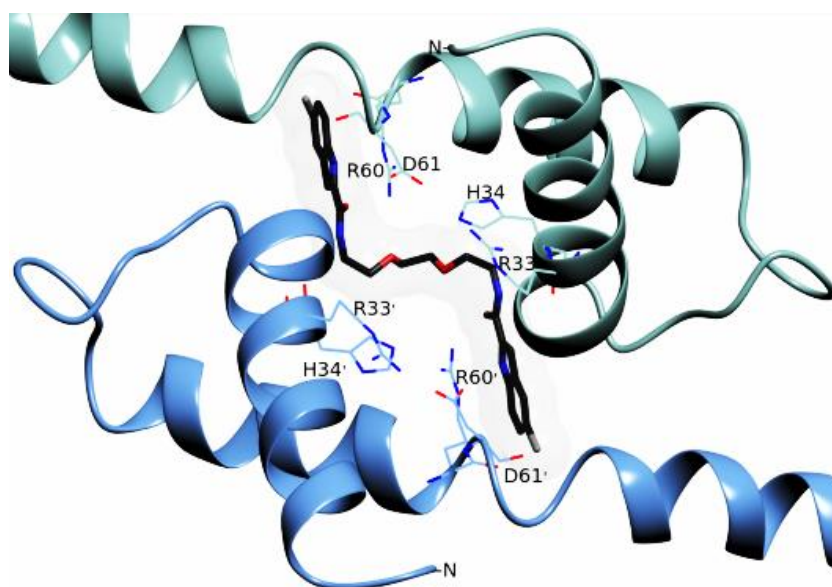
Εικόνα 14: Σύγκριση της δομής των *hIGPa* (γαλάζιο, *PDB-ID: 1FA9* [53]) και *hmGPb* (πράσινο, *PDB-ID: 1Z8D* [51]) σε σύμπλοκο με την *AMP* και έναν αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο (δεν παρουσιάζεται). Παρατηρείται η σαφής αλλαγή της διαμόρφωσης του βρόχου αδενίνης μεταξύ του ηπατικού και μυϊκού ενζύμου η οποία φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη διαφορετική απόκριση των δύο ενζύμων στην *AMP*.

Αρχικά, η διαμόρφωση του βρόχου περιορίζεται χωροταξικά από την *Tyr75* και επιπλέον πολλοί δεσμοί υδρογόνου που σταθεροποιούν τη διαμόρφωση του βρόχου στην *mGP* δεν παρατηρούνται στην *IGP*. Ο βρόχος αδενίνης συνδέει το αλλοστερικό κέντρο με το καταλυτικό κέντρο μέσω της έλικας $\alpha 8$ (Εικόνα 13). Επομένως, η μη αλληλεπίδραση του βρόχου της αδενίνης με την *AMP* στο ηπατικό ένζυμο δεν μπορεί να οδηγήσει στις απαραίτητες αλλαγές στη διαμόρφωση ώστε το καταλυτικό κέντρο να είναι προσβάσιμο στο υπόστρωμα [53]. Εκτός από τη διαφορετική διαμόρφωση του βρόχου αδενίνης, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν και άλλα κατάλοιπα του ενζύμου στη διαφορετική απόκριση των δύο ενζύμων στην *AMP*. Τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με την *AMP* στη *mGP* είναι πλήρως συντηρημένα στην αλληλουχία της *IGP*. Είναι σημαντικό ότι ακόμα και σε απόσταση 12 Å από το αλλοστερικό κέντρο, μόνο εννέα κατάλοιπα εντοπίζονται διαφορετικά, ενώ σε απόσταση 10 Å μόνο δύο. Ερευνητές δημιούργησαν μεταλλάξεις στην *IGP* σε δύο κατάλοιπα που έκριναν σημαντικά

ώστε να είναι ίδια με αυτά της *mGP*. Δοκιμές δραστηριότητας, έδειξαν ότι οι μεταλλαγμένες μορφές του ηπατικού ενζύμου εξακολουθούσαν να μην εμφανίζουν συγγένεια με την *AMP*. Στη συνέχεια διερεύνησαν την N-τελική περιοχή καθώς εμφανίζει 10 αντικαταστάσεις καταλοίπων από τα συνολικά 48 πρώτα κατάλοιπα. Έτσι λοιπόν κατασκεύασαν μια πρωτεϊνική χίμαιρα ώστε η N-τελική της *lGP* να είναι ίδια με της *mGP*. Δοκιμές δραστηριότητας παρουσία *AMP* έδειξαν ότι η χιμαιρική πρωτεΐνη εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη δραστηριότητα από το φυσιολογικό ηπατικό ένζυμο αλλά όχι τόσο μεγάλη όσο το μυϊκό. Επομένως, κατάλοιπα εκτός του αλλοστερικού κέντρου παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση από την *AMP* και είναι υπεύθυνα για την μη ενεργοποίηση του ηπατικού ενζύμου αλλά για την ενεργοποίηση του μυϊκού [14].

1.2.4.2.5. Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το 2000 οι *Oikonomakos N.G.*, και συνεργάτες ανακάλυψαν ένα νέο κέντρο πρόσδεσης στη *rmGPb* στην διεπιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων κατά τη μελέτη σύνδεσης της ένωσης *CP320626* στη *GP* [72] ή οποία προηγουμένως είχε μελετηθεί μόνο με κινητικές μελέτες (IC_{50} : 205 nM) ως προς την *hlGPa* (Πίνακας 5, ένωση 6) [36]. Λίγο αργότερα έγινε περιγραφή της ύπαρξης αυτού του κέντρου στην *hlGP* από τους *Rath, V.L.*, και συνεργάτες αναφέροντας ότι η έκδοση της πρώτης εργασίας έγινε κατά το χρονικό διάστημα της αξιολόγησης της δικής τους προς δημοσίευση [98]. Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στην κεντρική κοιλότητα που υπάρχει μεταξύ των δύο υπομονάδων σε απόσταση ~ 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, ~ 37 Å από το κέντρο αναστολής και ~ 33 Å από το καταλυτικό κέντρο.



Εικόνα 15: Το νέο αλλοστερικό κέντρο της *GP* σε σύμπλοκο με αναστολέα (Πίνακας 5, ένωση 1), *PDB-ID: 1EM6*.

Πίνακας 5: Οι τιμές των IC_{50} των πιο δραστικών αναστολέων που συνδέονται στο νέο αλλοστερικό κέντρο της *hIGPa* [77].

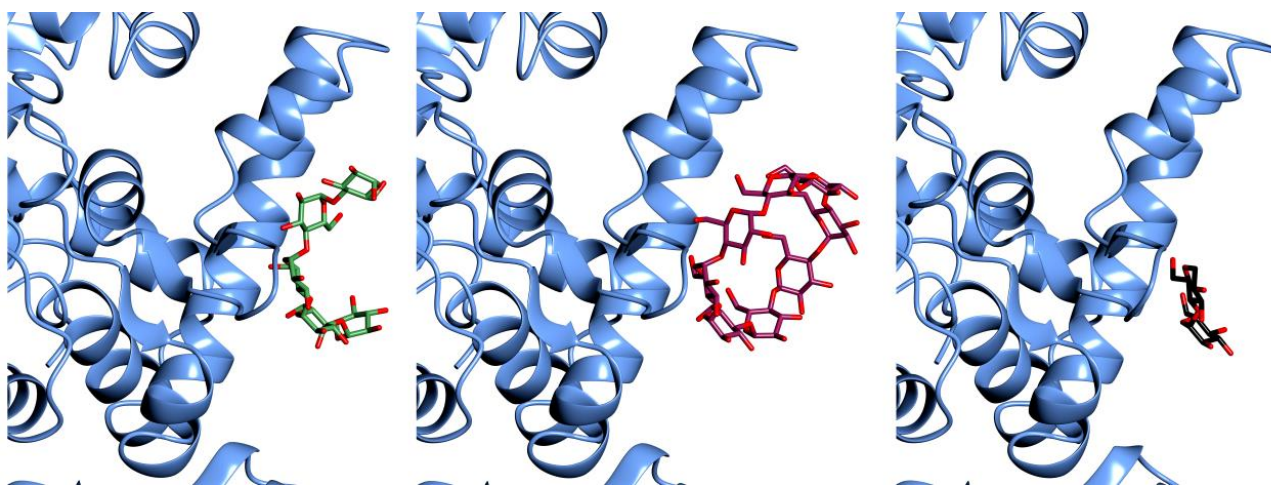
Αύξων αριθμός	Χημική δομή	IC_{50} (nM)
1		6
2		45
3		82
4		83
5		130
6		205
7		2310

Η κοιλότητα αυτή έχει μήκος $\sim 30 \text{ \AA}$, με ακτίνα $\sim 4 - 8 \text{ \AA}$ και περικλείει έναν όγκο $\sim 1300 \text{ \AA}^3$. Επιπλέον, η κοιλότητα, είναι κλειστή από τη μια πλευρά από κατάλοιπα που αποτελούν μέρος του καλύμματος και της έλικας $\alpha 2$ (*Arg33*, *His34*, *Arg60*, *Asp61* και τα αντίστοιχα συμμετρικά κατάλοιπα) και από την άλλη πλευρά από τις έλικες του πύργου (*Asn270*, *Glu273*, *Ser276* και τα αντίστοιχα συμμετρικά κατάλοιπα) [72]. Στο νέο αλλοστερικό κέντρο έχουν βρεθεί ότι προσδένονται ενώσεις όπως αυτές που αναφέρονται στον Πίνακα 5 και αναστέλλουν σημαντικά την *GP* [77].

1.2.4.2.6. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου

Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου βρίσκεται στην επικράτεια 1 της *GP* στην επιφάνεια της πρωτεΐνης σε απόσταση $\sim 40 \text{ \AA}$ από το αλλοστερικό κέντρο, $\sim 50 \text{ \AA}$ από το νέο αλλοστερικό κέντρο και $\sim 30 \text{ \AA}$ από το καταλυτικό κέντρο. Η σύνδεση του γλυκογόνου αλλά

και ολιγοσακχαριτών όπως η μαλτοπενταόζη και οι κυκλοδεξτρίνες στο κέντρο αυτό γίνεται κυρίως μέσω αλληλεπίδρασης με την έλικα $\alpha 12$. Για το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου δεν είναι πολλά γνωστά καθώς δεν έχουν γίνει αρκετές κρυσταλλογραφικές μελέτες, ωστόσο είναι γνωστό ότι η σύνδεση του γλυκογόνου στο κέντρο αυτό τοποθετεί την GP στην επιφάνεια του γλυκογόνου και επάγει τη δημιουργία ενεργών διμερών. Ως προς το κέντρο αυτό έχει μελετηθεί με κινητικές και κρυσταλλογραφικές η αναστολή που προκαλούν στο ένζυμο η σύνδεση β - και γ -κυκλοδεξτρινών (Εικόνα 16). Οι κυκλοδεξτρίνες αυτές αναστέλλουν το ένζυμο με τιμές της K_i στα 47.1 mM, 14.1 mM, 7.4 mM, και για την α -, β - και γ -κυκλοδεξτρίνη αντίστοιχα [73].

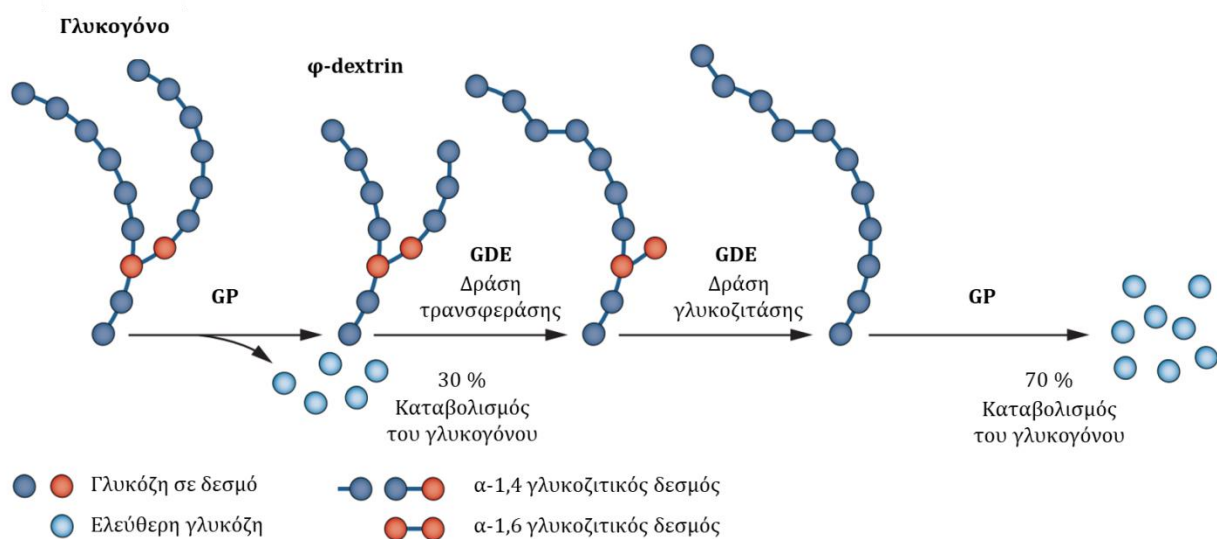


Εικόνα 16: Η πρόσδεση κυκλοδεξτρινών το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου της GP. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται τα σύμπλοκα της *rmGPb* με μαλτοπενταόζη (PDB-ID: 1P2B [73]), γ -κυκλοδεξτρίνη (PDB-ID: 1P2G [73]) , β -κυκλοδεξτρίνη (PDB-ID: 1P2D [73]).

1.3. Το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου

Οι μελέτες που είχαν γίνει στη φωσφορυλάση από τους *Cori* είχαν δείξει ότι η GP έχει την ικανότητα να καταναλώσει πλήρως το γλυκογόνο κυρίως προς φωσφορική γλυκόζη αλλά και σε γλυκόζη σε ένα μικρό ποσοστό. Θεωρούσαν ότι ένα ποσοστό της τάξης του 10 % της φωσφορικής γλυκόζης υφίσταται υδρόλυση με αποτέλεσμα να παράγεται ελεύθερη γλυκόζη. Όταν ο *Larner, J.*, βρέθηκε στο εργαστήριο της *Cori, G.*, του ζητήθηκε να βρει το λόγο για τον οποίο η κρυσταλλική μυϊκή GP μπορούσε να αποικοδομήσει πλήρως το γλυκογόνο, σε αντίθεση με την φωσφορυλάση από πατάτα. Τότε, ο *Hestrin, S.*, μεταδιδάκτορας στο συγκεκριμένο εργαστήριο, είχε προτείνει ότι η κρυσταλλική GP είχε πρόσμιξη από κάποια άλλη πρωτεΐνη, κάτι το οποίο ενόχλησε την *Cori, G.*, καθώς απορούσε πως ένα κρυσταλλικό ένζυμο που συνέβαλε στη βράβευση της με το βραβείο Νόμπελ μπορεί να έχει προσμίξεις [99]. Η απορία της *Cori, G.*, είχε να κάνει με το γεγονός ότι για να κρυσταλλωθεί μια πρωτεΐνη πρέπει να έχει ποσοστό βιοχημικής καθαρότητας περισσότερο από 95 %, δηλαδή να μην

υπάρχουν προσμίξεις από άλλες πρωτεΐνες [100]. Επιπλέον, τα στάδια καθαρισμού της *GP* περιέχουν τα στάδια κρυστάλλωσης και ανακρυστάλλωσης όπου η *GP* κρυσταλλώνεται ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση και συλλέγονται οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης. Οι κρύσταλλοι αυτοί διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα και οι διαδικασία της κρυστάλλωσης και ανακρυστάλλωσης επαναλαμβάνεται (βλ. παράγραφο 4.5.1) [101]. Παρά τα παραπάνω, η *Cori, G.*, ζήτησε από τον *Larner, J.*, να βρει ποια είναι αυτή η πρωτεΐνη που υπήρχε ως πρόσμιξη. Ο τελευταίος, διεξήγαγε 8 ανακρυσταλλώσεις στη *GP*, αντί για 2 έως 3 που ήταν το σύνηθες, και κρατούσε κάθε φορά τα υπερκείμενα. Οι δοκιμές δραστηριότητας που έγιναν στα υπερκείμενα, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα γλυκογόνο το οποίο είχε επεξεργαστεί με φωσφορυλάση από πατάτα έδειξαν ότι το προϊόν δεν ήταν φωσφορική γλυκόζη αλλά ελεύθερη γλυκόζη, δηλαδή το ίδιο προϊόν με αυτό της διάσπασης του α -1,6 γλυκοζιτικού δεσμού, όπως είχαν δείξει πειράματα διάσπασης της ισομαλτόζης [99, 102]. Τα πειράματα αυτά ανέδειξαν ότι υπάρχει ένα άλλο ένζυμο το οποίο σήμερα ονομάζεται ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου (*GDE*) και η συμμετοχή του μαζί με την *GP* οδηγεί σε πλήρη κατανάλωση του μακρομορίου του γλυκογόνου.



Εικόνα 17: Παρουσιάζεται η διαδικασία της γλυκογονόλυσης. Το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου (*GDE*) διαθέτει δύο καταλυτικά κέντρα η δράση των οποίων οδηγεί σε υδρόλυση του καταλοίπου της γλυκόζης στο σημείο της διακλάδωσης [103].

Σήμερα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι γνωστό ότι η *GP* καταλύει τη σταδιακή απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης μέχρι 4 κατάλοιπα από ένα σημείο διακλάδωσης όπου αναλαμβάνει δράση το *GDE*. Το *GDE* στους ευκαρυώτες είναι μια μονομερής πρωτεΐνη με μοριακό βάρος ~ 175 *kDa* και η μελέτη του έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον καθώς είναι ένα διλειτουργικό ένζυμο διαθέτοντας δυο καταλυτικές δραστηριότητες σε μια πολυπεπτιδική

αλυσίδα. Αποτελείται από μια α-1,4 γλυκοζυλοτρανσφεράση (EC 2.4.1.25) και μια άμυλο-α-1,6 γλυκοζιτάση (EC 3.2.1.33) χωρίς η δραστηριότητα της μιας να εξαρτάται από την άλλη [44, 104, 105]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17, το *GDE* δρα σε γλυκογόνο το οποίο έχει επεξεργαστεί από την *GP* (*φ-dextrin*) μεταφέροντας τα τρία κατάλοιπα γλυκόζης (α-1,4 γλυκοζυλοτρανσφεράση) που βρίσκονται συνδεδεμένα με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, σε μια άλλη αλυσίδα του γλυκογόνου και έπειτα υδρολύοντας το διακλαδισμένο μόριο γλυκόζης που έχει απομείνει (άμυλο-α-1,6 γλυκοζιτάση), προς παραγωγή γλυκόζης. Με αυτό τον τρόπο παράγεται γλυκογόνο το οποίο μπορεί να καταναλώσει περαιτέρω η *GP*.

Το *GDE* έχει απομονωθεί από ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως κονίκλους (σκελετικοί μύες, ήπαρ) [106, 107], μύκητες (*Candida gabrata*, *Saccharomyces cerevisiae*) [44], χοίρους (ήπαρ, εγκέφαλο) [108, 109], ενώ υπάρχει αντίστοιχο ένζυμο στα φυτά (ένζυμο αποδιακλάδωσης του αμύλου) [110]. Ένζυμο αποδιακλάδωσης υπάρχει επίσης στους προκαρυώτες [111] και τα αρχαία [112, 113] στους οποίους όμως, η δραστηριότητα της μεταφοράς και της γλυκοζιτάσης βρίσκεται σε διαφορετικές πρωτεΐνες. Έλλειψη ή μεταλλάξεις του *GDE* σχετίζονται με *GSD-III*, η οποία αφορά περίπου το 24 % όλων των *GSD* και οδηγεί σε συσσώρευση γλυκογόνου ανώμαλης μορφής, κάτι το οποίο είναι επιβλαβές για τα ηπατοκύτταρα [114]. Παρά το μεγάλο χρονικό διάστημα που έχει παρέλθει από τότε που ανακαλύφθηκε το *GDE* έως σήμερα, δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία αναφορά για λειτουργικές μελέτες σε ανασυνδυασμένο ανθρώπινο *GDE* (*hGDE*), καθώς οι περισσότερες έρευνες έχουν γίνει κυρίως σε *GDE* από μύκητες. Υπάρχει μια αναφορά για παραγωγή του *hGDE* σε κύτταρα εντόμων [115] και πολύ πρόσφατα, δημοσιεύτηκε μια περίληψη που αφορά την παραγωγή λειτουργικού *hGDE* σε ρίζες του φυτού *N. Benthamiana*, χωρίς όμως να είναι διαθέσιμο το άρθρο κατά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής [116] (περίληψη διαθέσιμη στις 6/04/2019).

Στον άνθρωπο, το *GDE* αποτελεί προϊόν ενός μόνο γονιδίου που εδράζεται στο χρωμόσωμα 1p21.2 [117] και διακρίνεται σε έξι ισομορφές. Το ήπαρ και οι νεφροί παράγουν κυρίως την ισομορφή 1, ενώ οι μύες και η καρδιά παράγουν επιπλέον τις ισομορφές 2, 3 και 4. Τις ισομορφές 5 και 6 τις συναντάμε σε μικρά ποσοστά στους μύες και στο ήπαρ [118]. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία της ισομορφής 1, η οποία αποτελεί την κύρια ισομορφή του ήπατος, αποτελείται από μία 5' αμετάφραστη περιοχή 400 bp, μια κωδική περιοχή 4596 bp και μια 3' αμετάφραστη περιοχή 2371 bp. Η ηπατική μορφή είναι ταυτόσημη με την μυϊκή μορφή αλλά διαφέρουν εντελώς στην 5' αμετάφραστη περιοχή. Η ιστοειδικότητα των ισομορφών

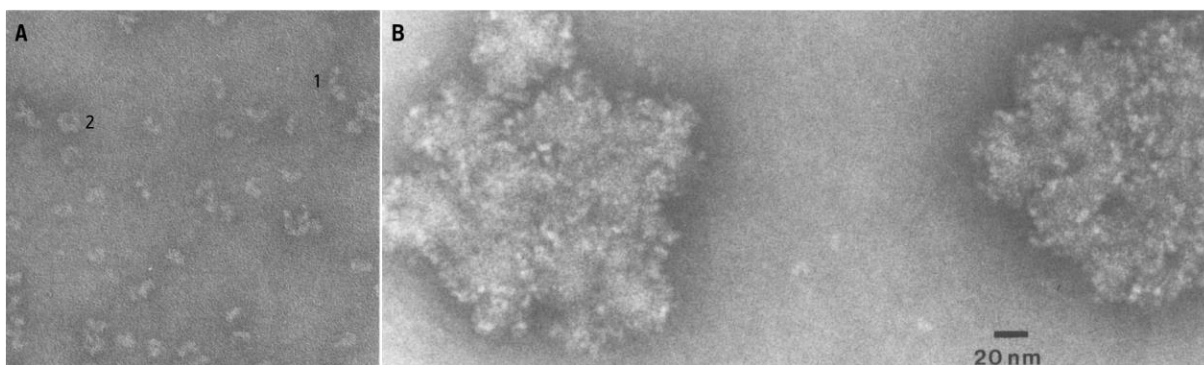
φαίνεται να οφείλεται σε δύο διαφορετικές περιοχές υποκινητών που οδηγούν σε διαφορετική έκφραση των *mRNA* των ισομορφών με έναν ιστοειδικό τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, ο ένας υποκινητής είναι λειτουργικός σε ηπατικές και μυϊκές κυτταρικές σειρές, ενώ ο δεύτερος υποκινητής είναι λειτουργικός μόνο σε μυϊκές κυτταρικές σειρές [119].

1.3.1. Δομικές μελέτες στο *GDE*

Σε μελέτη του 1975 οι *Bates E.J.*, και συνεργάτες [104] μελέτησαν την επίδραση της θρυψίνης ή χυμοθρυψίνης, στη δραστικότητα του *GDE* μετρώντας με διαφορετική μεθοδολογία τη δραστικότητα της τρυσφεράσης ή της γλυκοζιτάσης. Οι ερευνητές έδειξαν ότι παρήχθησαν πρωτεολύματα σε συγκεκριμένα μοριακά βάρη και όταν το δείγμα αυτό εφαρμόστηκε σε στήλη μοριακής διήθησης, τότε στο χρωματογράφημα παρατήρησαν μια κορυφή, ελαφρώς διαφορετική από αυτή του *GDE* χωρίς πέψη με θρυψίνη (~ 20 % μείωση στο μοριακό βάρος), προτείνοντας ότι αυτές οι περιοχές μπορούν ακόμα να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Σε ότι αφορά τη δραστικότητα, παρατηρήθηκε μικρή μείωση στη δράση της γλυκοζιτάσης σε αντίθεση με τη δραστικότητα της τρυσφεράσης η οποία μειωνόταν σημαντικά όσο αυξανόταν ο χρόνος επώασης με την πρωτεάση (~ 75 %). Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι το *GDE* αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα όπου οι δύο δραστικότητες πρέπει να βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές [104]. Παρότι το *GDE* έχει κρυσταλλωθεί από σκελετικούς μύες κονίκλων, δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί η κρυσταλλική του δομή [120]. Η μόνη διαθέσιμη κρυσταλλική δομή για ευκαρυωτικό *GDE* προέρχεται από τον οργανισμό *Candida glabrata* [44].

1.3.1.1. Μελέτες ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας στο *rmGDE*

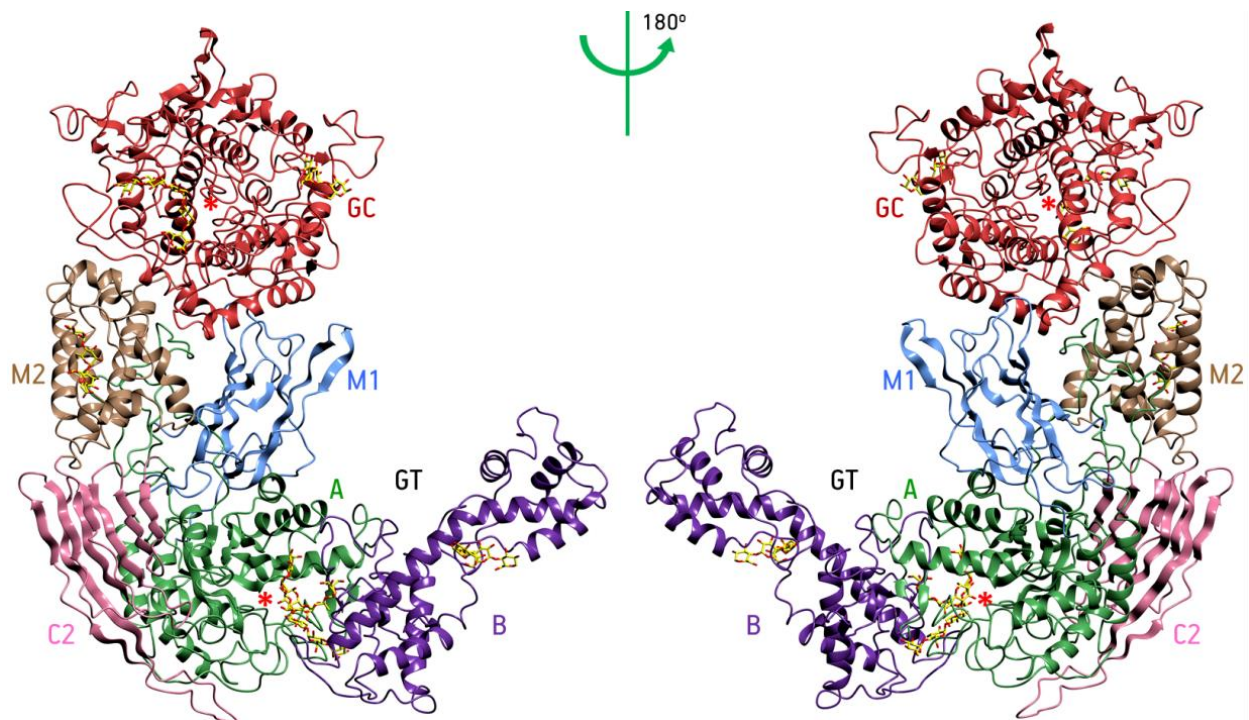
Μελέτες ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας στο *rmGDE* έδειξαν ότι το ένζυμο έχει μια επιμήκη δομή (σε σχήμα κάρεως) και υπάρχει κατά κύριο λόγο ως μονομερές (Εικόνα 18A1) τόσο σε ελεύθερη μορφή αλλά και παρουσία γλυκογόνου (Εικόνα 18B). Επιπλέον, το *rmGDE* έχει σε μικρό βαθμό την τάση να διμερίζεται και να δημιουργεί κυκλικές δομές (Εικόνα 18A2) σε συγκέντρωση 0.03 *mg/mL* [121] κάτι το οποίο οι ερευνητές το απέδωσαν πιθανόν σε δημιουργία συσσωματωμάτων. Σε προηγούμενες μελέτες είχε φανεί ότι το *GDE* δημιουργεί συσσωματώματα σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 5 *mg/mL*, σημαντικά υψηλότερη από αυτή που υπάρχει φυσιολογικά στους μύες (0.7 *mg/mL*) [106] αλλά και από αυτή που χρησιμοποίησαν για τις μελέτες με ηλεκτρονιακό μικροσκόπιο [121].



Εικόνα 18: Μελέτες ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας έναντι του *rmGDE A*) σε ελεύθερη μορφή και *B*) παρουσία γλυκογόνου [121]

1.3.1.2. Η κρυσταλλική δομή του *CgGDE*

Το *CgGDE* έχει μια επιμήκη δομή και αποτελείται από τέσσερις επικράτειες (Εικόνα 19). Η επικράτεια με δράση γλυκοζιτάσης (*GC*) και η αντίστοιχη με δράση τρανσφεράσης (*GT*) βρίσκονται στα δύο άκρα του ενζύμου και μεταξύ τους παρεμβάλλονται δύο ενδιάμεσες περιοχές (*M1* και *M2*). Οι ενδιάμεσες περιοχές δημιουργούν ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με τις επικράτειες *GC* και *GT*, όμως τόσο οι επικράτειες *GC* και *GT*, όσο και οι *M1* και *M2*, μοιράζονται μεταξύ τους ένα μικρό αριθμό αλληλεπιδράσεων. Οι επικράτειες *GC* και *GT* μπορεί να είναι απαραίτητες για την καταλυτική δράση του ενζύμου αλλά οι επικράτειες *M1* και *M2*, στη διεπιφάνεια των οποίων σχηματίζεται μία κοιλότητα, είναι απαραίτητες για τη σταθεροποίηση του ενζύμου και τη διατήρηση της τριτοταγούς δομής. Η *N*-τελική περιοχή του *CgGDE* είναι αυτή που έχει τη δράση της τρανσφεράσης ενώ η *C*-τελική περιοχή έχει τη δράση της γλυκοζιτάσης. Η *N*-τελική περιοχή μπορεί επιπλέον να χωριστεί σε τρεις υπομονάδες: μια υπομονάδα *A* που έχει μια διαμόρφωση βαρέλι *TIM*, μια υπομονάδα *C2* με β-πτυχωτά φύλλα και μια υπομονάδα *B* η οποία βρίσκεται μεταξύ του φύλλου $\beta 3$ και της έλικας $\alpha 3$ της υπομονάδας *A*. Η περιοχή αυτή ταυτοποιήθηκε ως η περιοχή με δράση τρανσφεράσης καθώς εμφανίζει δομική ομολογία με πρωτεΐνες της οικογένειας *GH13* (*glucoside hydrolase*) με τα κατάλοιπα *Asp535* και *Glu564* να καταλαμβάνουν αντίστοιχες θέσεις ως νουκλεόφιλο και δότης πρωτονίων αντίστοιχα. Μεταλλαγμένες μορφές αυτών των καταλοίπων (*D535N*, *E564Q*) έδειξαν ότι το ένζυμο χάνει τη δραστηριότητα της τρανσφεράσης αλλά όχι της γλυκοζιτάσης. Η *C*-τελική περιοχή έχει μια διαμόρφωση (α/α)₆-βαρέλι, ομόλογη με την καταλυτική περιοχή γλυκοαμυλασών αλλά και άλλων πρωτεϊνών της οικογένειας *GH15* οι οποίες διασπών α-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Τα κατάλοιπα *Asp1241* και *Glu1492* καταλαμβάνουν αντίστοιχες θέσεις με παρόμοια διαμόρφωση σε δομές γλυκοαμυλασών. Μεταλλαγμένες μορφές του ενζύμου ως προς αυτά τα κατάλοιπα έδειξαν ότι χάνεται η δραστηριότητα της γλυκοζιτάσης αλλά όχι της τρανσφεράσης [44].

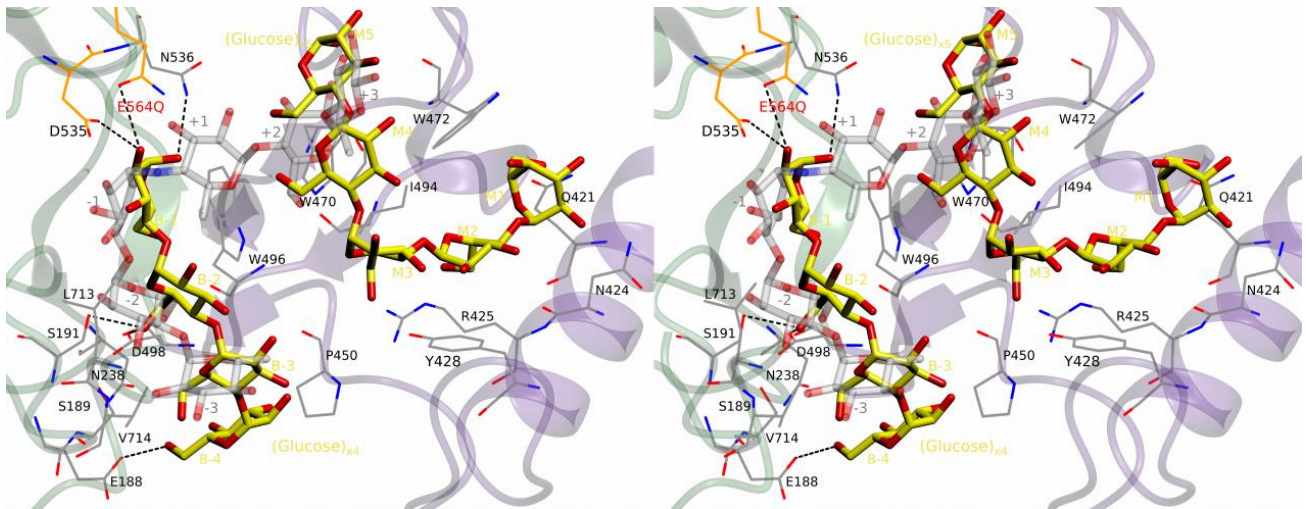


Εικόνα 19: Η κρυσταλλική δομή του *CgGDE* (*E564Q*) σε σύμπλοκο με ολιγοσακχαρίτες (*PDB-ID: 5D0F*) με απόκλιση 180°. Παρουσιάζονται οι επικράτειες *GC* (γλυκοζιτάση) και *GT* (γλυκοτρανσφεράση). Η N-τελική περιοχή που περιέχει την επικράτεια της *GT*, μπορεί να χωριστεί επιπλέον στις περιοχές *B*, *C2* και *A*. Τα καταλυτικά κέντρα επισημαίνονται με * [44]. Με βάση την κρυσταλλική δομή του *CgGDE* τα κατάλοιπα 1-131 αντιστοιχούν στην περιοχή *M1*, τα κατάλοιπα 132-237 και 499-749 στην περιοχή *A* της τρανσφεράσης, τα κατάλοιπα 238-498 στην περιοχή *B* της τρανσφεράσης, τα κατάλοιπα 750-869 στην περιοχή *C2* της τρανσφεράσης, τα κατάλοιπα 870-1022 στην περιοχή *M2* και τα κατάλοιπα 1023-1538 στην περιοχή της γλυκοζιτάσης. Η εικόνα αποτελεί ανακατασκευή της εικόνα από τη δημοσίευση των *Zhai, L.*, και συνεργατών [44] και κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα *CCP4-MG* [122]

Η περιοχή αναγνώρισης του υποστρώματος

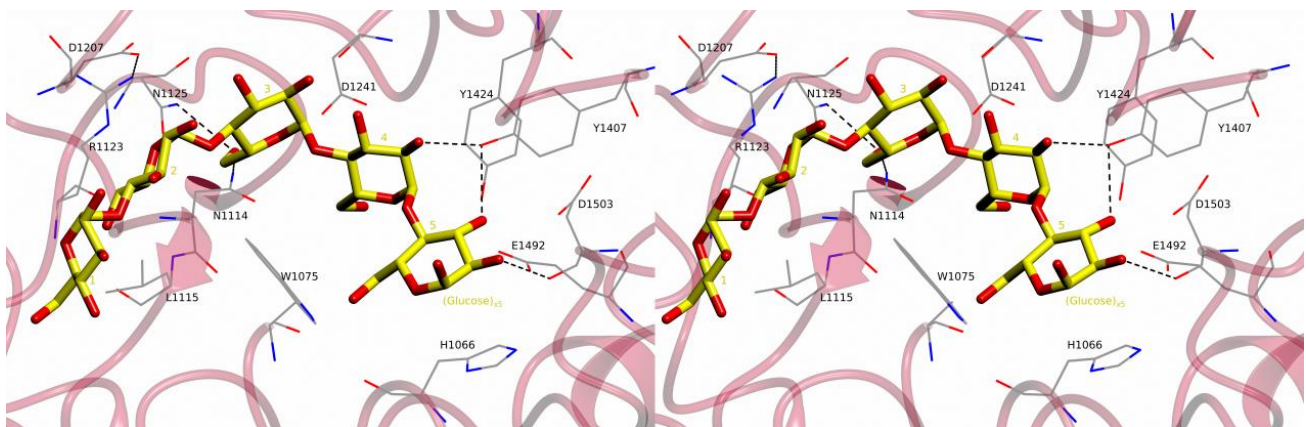
Για τις κρυσταλλογραφικές μελέτες με ολιγοσακχαρίτες, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τη μεταλλαγμένη μορφή *E564Q* ώστε να μην είναι δραστική η τρανσφεράση.

Τρανσφεράση: Στην περιοχή της τρανσφεράσης βρέθηκαν προσδεδεμένοι δύο ολιγοσακχαρίτες μήκους πέντε και τεσσάρων καταλοίπων σε κοντινή θέση μεταξύ τους. Ο ολιγοσακχαρίτης με τα πέντε κατάλοιπα (αλληλεπιδρά με την υπομονάδα *B* της *GT*, κατάλοιπα *Trp470*, *Trp472*, *Ile494*, *Gln421*, *Asn424*, *Arg425*, *Tyr428*) φαίνεται να αντιπροσωπεύει την κύρια αλυσίδα του γλυκογόνου ενώ ο ολιγοσακχαρίτης με τα τέσσερα κατάλοιπα (αλληλεπιδρά με τις υπομονάδες *A* και *B* της *GT*, κατάλοιπα *Glu188*, *Ser189*, *Ser191*, *Asn238*, *Pro450*, *Trp496*, *Asp498*, *Leu713*, *Val714*) φαίνεται να αποτελεί την διακλαδισμένη αλυσίδα. Αυτή η υπόθεση προέκυψε διότι μεταξύ των δύο ολιγοσακχαριτών και συγκριτικά με τη δομή της *Taka-amylase A* φαίνεται ότι υπάρχει χώρος για ένα ακόμα μόριο γλυκόζης προτείνοντας ότι εκείνη είναι η περιοχή όπου διασπάται ο α-1,4 γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του καταλοίπου +1 και B-1 (Εικόνα 20) [44].



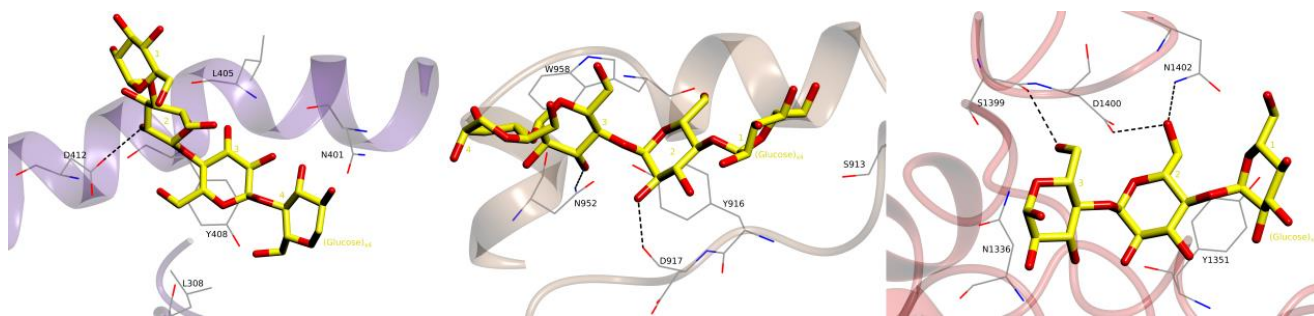
Εικόνα 20: Στέρεο-απεικόνιση της περιοχής της τρανσφεράσης στο *CgGDE*. Με λευκό παρουσιάζονται ο ολιγοσακχαρίτης που προσδένεται στην *Taka-amylase A* σε υπέρθεση με το *CgGDE* [44]. Η εικόνα αποτελεί ανακατασκευή της εικόνας από τη δημοσίευση των *Zhai, L.*, και συνεργατών [44] και κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα *CCP4-MG* [122].

Γλυκοζιτάση: Στην περιοχή της γλυκοζιτάσης προσδένεται μόνο ένας ολιγοσακχαρίτης πέντε καταλοίπων και συνδέεται σε μια σχισμή σε αυτή τη περιοχή. Τα κατάλοιπα 2-3 της μαλτοπενταόζης αλληλεπιδρούν με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης *Asn1114*, *Leu1115*, *Arg1123*, *Asn1125* και *Asp1207* ενώ τα κατάλοιπα 4-5 της μαλτοπενταόζης αλληλεπιδρούν με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης *His1066*, *Trp1075*, *Tyr1407*, *Tyr1424*, *Asp1503*. Το τέταρτο κατάλοιπο της μαλτοπενταόζης και πιο συγκεκριμένα ο άνθρακας C6 προβάλλει προς το καταλυτικό κέντρο της *GC* όπου γίνεται η υδρόλυση του α-1,6 γλυκοζιτικού δεσμού (Εικόνα 21) [44].



Εικόνα 21: Στέρεο-απεικόνιση της σύνδεσης ολιγοσακχαρίτη στο κέντρο της γλυκοζιτάσης στο *CgGDE* [44]. Η εικόνα αποτελεί ανακατασκευή της εικόνας από τη δημοσίευση των *Zhai, L.*, και συνεργατών [44] και κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα *CCP4-MG* [122].

Περιοχές αλληλεπίδρασης με το γλυκογόνο: Εκτός από τη σύνδεση ολιγοσακχαριτών στα δυο καταλυτικά κέντρα, βρέθηκαν προσδεμένοι ολιγοσακχαρίτες στην υπομονάδα *B* της *GT*, στην περιοχή *M2* και στην περιοχή της *GC* μακριά όμως από το κέντρο πρόσδεσης του υποστρώματος (απόσταση ~ 20 Å).



Εικόνα 22: Τα κέντρα πρόσδεσης ολιγοσακχαριτών. Από αριστερά προς τα δεξιά παρουσιάζονται τα κέντρα πρόσδεσης ολιγοσακχαριτών στις περιοχές *B*, *M2*, *GC*. Ο σχεδιασμός της εικόνας έγινε με το πρόγραμμα *CCP4-MG* [44].

Οι μεταλλαγμένες μορφές του ενζύμου *Y408A*, *W958A* και *D1400A* που κατασκεύασαν και ειδικά το *W958A* έδειξαν μειωμένη ικανότητα για την σύνδεση με το γλυκογόνο σε πειράματα κατακρήμνισης με σφαιρίδια *concanavalin A* αλλά και μειωμένη δραστηριότητα. Επομένως, τα κέντρα αυτά είναι απαραίτητα για την σύνδεση και τη σωστή τοποθέτηση του γλυκογόνου (Εικόνα 22) [44].

1.3.2. Ο καταλυτικός μηχανισμός του *GDE*

Το 1977 οι *Gillard B. K.*, και *Nelson T. E.*, πρότειναν ένα μηχανισμό δράσης του *GDE* βασιζόμενοι σε κινητικές μελέτες με αναστολείς ως προς το ένζυμο (*nojiromycin*, *tris*, *Bistris* κ.α.). Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης βασίστηκε στο γεγονός ότι, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το *GDE* αποτελείται από δυο καταλυτικές περιοχές και κέντρο/α πρόσδεσης ολιγοσακχαριτών τα οποία θεωρούσαν ότι είτε επικαλύπτονται μεταξύ τους είτε αλληλεπιδρούν ισχυρά. Οι ερευνητές πρότειναν ότι αφού η τρανσφεράση διασπάσει τον α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό, τότε απομακρύνεται το προϊόν (μαλτοτριόζη) το οποίο μετατοπίζεται σε κάποιο κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών και το κατάλοιπο της γλυκόζης που έχει μείνει συνδεδεμένο με α-1,6 γλυκοζιτικό δεσμό μετατοπίζεται στο κέντρο της γλυκοζιτάσης χωρίς το ένζυμο να αποσυνδεθεί από το γλυκογόνο. Αυτή η μετατόπιση θα μπορούσε να κατευθύνει ένα μη αναγωγικό άκρο του γλυκογόνου να έρθει σε κατάλληλη θέση ώστε να συνδεθεί με την μαλτοτριόζη και να παραχθεί μια επιμήκης αλυσίδα. Τέλος, η γλυκοζιτάση απομακρύνει τη γλυκόζη που βρίσκεται συνδεδεμένη στη διακλάδωση και επομένως η όλη διαδικασία της κατάλυσης βασίζεται στη συντονισμένη δράση μεταξύ των διαφορετικών περιοχών του ενζύμου [123]. Οι *Zhai L.*, και συνεργάτες προσδιόρισαν τη δομή του *CgGDE* το 2016, σε ελεύθερη μορφή (κωδικός *PDB* 5D06) και σε σύμπλοκο με ολιγοσακχαρίτες (κωδικός *PDB* 5D0F, E564Q) και μελέτησαν την παραπάνω υπόθεση κατασκευάζοντας μεταλλαγμένες μορφές του ενζύμου στα οποία είχε διαταραχθεί είτε η δράση της τρανσφεράσης είτε η δράση της γλυκοζιτάσης. Η κάθε μεταλλαγμένη μορφή δεν εμφάνιζε δραστηριότητα παρουσία φ-

dextrin, μιας και για την ολική δραστηριότητα του *GDE* είναι απαραίτητο να είναι δραστικές και οι δύο καταλυτικές περιοχές. Μίξη τέτοιων μεταλλαγμάτων έδειξε ότι η δραστηριότητα ήταν όμοια με αυτή της φυσιολογικής πρωτεΐνης με αποτέλεσμα, η αντίδραση που καταλύει το *GDE* να μην είναι απαραίτητο να συμβαίνει μέσω μεταφοράς του προϊόντος στην περιοχή της γλυκοζιτάσης. Οι ερευνητές προτείνουν ότι το προϊόν της τρανσφεράσης (μαλτοτριόζη) αποσυνδέεται από το *GDE* πριν το διακλαδισμένο κατάλοιπο εισέλθει στην περιοχή της γλυκοζιτάσης [44].

Ένα ερώτημα στα παραπάνω θέτει η εργασία των *Min-ho, L.*, το 2014 όπου υποστήριξαν ότι η περικομμένη μορφή της N-τελικής περιοχής του *ScGDE*, δηλαδή η περιοχή που έχει χαρακτηριστεί με δράση τρανσφεράσης, διαθέτει επιπλέον και δράση γλυκοζιτάσης. Οι ερευνητές, δημιούργησαν μια κατασκευή που περιείχε την N-τελική περιοχή του ενζύμου (κατάλοιπα 1-644) σε φυσική μορφή ή με μία μετάλλαξη (D535N ή E564Q). Ως υπόστρωμα χρησιμοποίησαν είτε μαλτοτετραόζη είτε β-κυκλοδεξτρίνη με διαφορετικούς υποκαταστάτες: G1-βCD (β-κυκλοδεξτρίνη συνδεδεμένη με γλυκόζη με α-1,6 γλυκοζιτικό δεσμό) και G4-βCD (G1-βCD και τα υπόλοιπα 3 κατάλοιπα γλυκόζης συνδεδεμένα με α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό με την α-1,6 γλυκόζη). Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι οι μεταλλαγμένες μορφές του ενζύμου δεν είχαν δραστηριότητα τρανσφεράσης αλλά εμφάνισαν δραστηριότητα γλυκοζιτάσης όταν χρησιμοποίησαν ως υπόστρωμα *G1-βCD* [124]. Ωστόσο, μελέτες σε μεταλλαγμένες μορφές στα αντίστοιχα κατάλοιπα του ολοενζύμου του *ScGDE* και *CgGDE* δεν έχουν δείξει να υπάρχει δραστηριότητα γλυκοζιτάσης [44, 125]. Αυτή η νέα δραστηριότητα της N-τελικής περιοχής του *GDE* φαίνεται να απορρέει από τη δημιουργία της συγκεκριμένης κατασκευής (κατάλοιπα 1-644) καθώς η απώλεια της C-περιοχής μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της γεωμετρίας του παραγόμενου ενζύμου και να σχηματίζει τετραμερή κάτι το οποίο του προσδίδει την επιπλέον καταλυτική δράση [124]. Κάτι ανάλογο συμβαίνει με το ένζυμο *TreX* (EC: 2.4.1.25, 3.2.1.33, MW 70 kDa) από το αρχαίο *Sulfolobus sulfotaricus* το οποίο διαθέτει τόσο δραστηριότητα τρανσφεράσης όσο και γλυκοζιτάσης. Αξίζει να σημειωθεί το *TreX* σχηματίζει στο διάλυμα διμερή και τετραμερή με τα τετραμερή να είναι 4 φορές περισσότερο καταλυτικά δραστικά με την δράση της τρανσφεράσης να ενισχύεται σημαντικά από τον τετραμερισμό του ενζύμου [113].

1.3.3. Η εμπλοκή του *GDE* στον καρκίνο

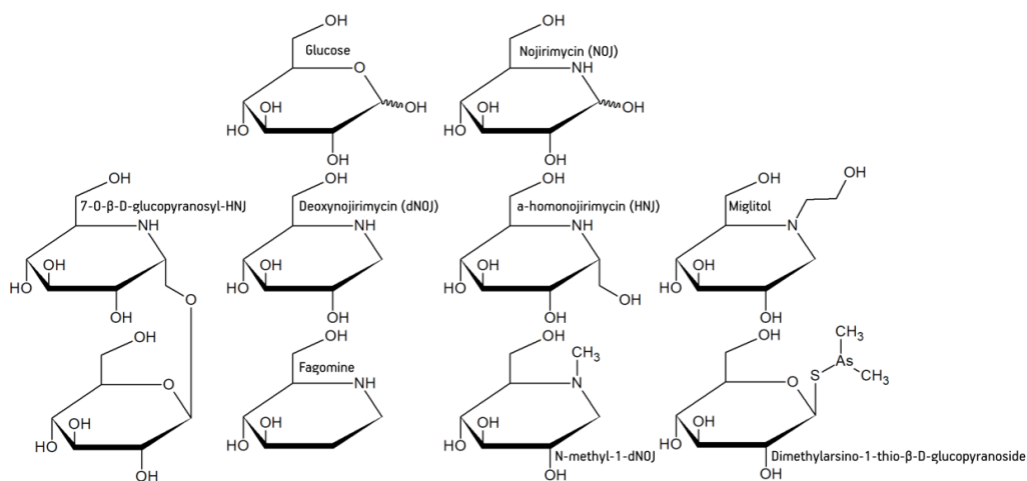
Μελέτες έχουν δείξει ότι το *GDE* αποτελεί ένα καταστολέα της εξέλιξης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης αλλά και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και ως εκ

τούτου αποτελεί ένα ένζυμο κλειδί στη βιολογία του καρκίνου. Τα επίπεδα του *mRNA* του *hGDE* φαίνεται να σχετίζονται με την εξέλιξη της νόσου στους ασθενείς καθώς χαμηλά επίπεδα *hGDE* σχετίζονται με αυξημένη θνησιμότητα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η επίδραση που επιφέρει η απουσία του *GDE* στην εξέλιξη του καρκίνου δεν σχετίζεται με την έως σήμερα γνωστή του καταλυτική λειτουργία, δηλαδή τη συμμετοχή του στο μεταβολισμό του γλυκογόνου [126-129]. Παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και σε γλυκολυτικά ένζυμα του μεταβολισμού που έχουν επιπλέον μη μεταβολικές δράσεις [130, 131]. Οι ερευνητές που διεξήγαγαν αυτές τις μελέτες έδειξαν ότι σε κύτταρα στα οποία είχε επιτευχθεί απαλοιφή του *GDE*, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της συνθάσης του υαλουρονικού οξέος, *HAS2* [127, 128] και ως αποτέλεσμα αυτού, αυξημένη παραγωγή υαλουρονικού οξέος που οδηγεί σε ανάπτυξη ανεξάρτητη από προσφύσεις. Ο τρόπος με τον οποίο η απώλεια του *GDE* οδηγεί σε αυξημένη έκφραση της *HAS2* είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Οι επιστήμονες που διεξήγαγαν την έρευνα εικάζουν ότι μπορεί να προκαλείται είτε μέσω αυξημένης πρόσληψης γλυκόζης λόγω επαναπρογραμματισμού του μεταβολισμού είτε μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες [126-128] χωρίς όμως να υπάρχουν στοιχεία που να ευνοούν σημαντικά είτε στη μία είτε στην άλλη περίπτωση. Ενδιαφέρον εύρημα πάνω σε ένα πιθανό μηχανισμό εμπλοκής του *GDE* στους δύο αυτούς τύπους καρκίνου αποτελεί η αλληλεπίδραση του με την *AMPK* και συγκεκριμένα με την υπομονάδα $\beta 1$ μέσω αλληλεπίδρασης η οποία δε σχετίζεται με τη σύνδεση των δύο πρωτεϊνών στο γλυκογόνο. Η *AMPK* αποτελεί έναν ενεργειακό αισθητήρα για το κύτταρο και ένα σημαντικό ρυθμιστή του μεταβολισμού καθώς εμπλέκεται στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και των λιπιδίων. Όταν χάνεται η αλληλεπίδραση του *GDE* με την *AMPK*, τότε η δραστηριότητα του *GDE* μένει ανεπηρέαστη αλλά η δραστηριότητα της *AMPK* αυξάνεται σημαντικά [132]. Επομένως, η αύξηση της δράσης της *AMPK* λόγω απώλειας του *GDE*, ενδεχομένως, θα μπορούσε να οδηγήσει σε επαναπρογραμματισμό του μεταβολισμού με αύξηση της πρόσληψης της γλυκόζης η οποία αποτελεί πρόδρομο μόριο για το σχηματισμό υαλουρονικού οξέος. Επιπλέον, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα οδηγεί σε ενεργοποίηση της *PKC* [133] και στη συνέχεια σε ενεργοποίηση των συνθασών του υαλουρονικού οξέος [134]. Από την άλλη μεριά, μελέτες έχουν δείξει ότι η *AMPK* φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την *HAS2* αλλά όχι τα ισόενζυμα *HAS1* και *HAS3* [135] θέτοντας έτσι διάφορες παραμέτρους που θα πρέπει να ικανοποιούνται από κάποιον προτεινόμενο μηχανισμό ρύθμισης. Η διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο η απαλοιφή του *GDE* εμπλέκεται στην εξέλιξη του καρκίνου ίσως φέρει στο προσκήνιο επιπλέον άγνωστες

λειτουργίες του *GDE* που δεν σχετίζονται με την καταλυτική του δράση και μπορεί προσφέρει νέα γνώση γύρω από τον μεταβολισμό του γλυκογόνου και την βιολογία του καρκίνου.

1.3.4. Αναστολείς του *GDE*

Από την δράση της *GP* στο μακρομόριο του γλυκογόνου μπορεί να καταναλωθεί μόνο το 30 % [103]. Το υπόλοιπο 70 % [103] απαιτεί τη δράση του *GDE* με αποτέλεσμα το ένζυμο αυτό να αποτελεί έναν στόχο για την εύρεση μικρών μορίων με σκοπό τη μείωση των επιπέδων της γλυκογονόλυσης σε διαβητικούς ασθενείς. Το ευκαρυωτικό *GDE* δεν έχει μελετηθεί σε βάθος για την εύρεση αναστολέων, όπως η *GP*, καθώς δεν υπάρχει διαθέσιμη κρυσταλλική δομή. Η ένωση *1-S-dimethylarsino-1-thio-β-D-glucanopyranoside (DATG)* αναστέλλει και τις δύο καταλυτικές δράσεις του *GDE* [136]. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η *nojirimycin (5-amino-D-glucose)*, ένας αναστολέας γλυκοζιτασών, αναστέλλει την ολική δράση του *rmGDE* με K_i 24 μM και τη δράση της α -1,6 γλυκοζιτάσης με K_i 3.9 μM [123]. Παράγωγο της *nojirimycin*, όπως η *1-deoxynojirimycin* [45, 137], και παράγωγα αυτής όπως, *BAY m 1099 (miglitol)* [45, 137], *BAY o 1248* [137], *fagomine* [45], α -*homonojirimycin (HNJ)* [45], *7-O-β-D-glucopyranosyl-HNJ* [45] και *N-Methyl-1-Deoxynojirimycin (MOR-14)* [138] (Εικόνα 23), αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της α -1,6 γλυκοζιτάσης του *GDE*. *In vivo* πειράματα σε αρουραίους έχουν δείξει ότι η *dNOJ* και η *miglitol* είναι ισχυροί αναστολείς της επαγόμενης γλυκογονόλυσης από γλυκαγόνη και Ca^{2+} χωρίς όμως να επηρεάζεται η συγκέντρωση της *GPa* [139].



Εικόνα 23: Διάφοροι αναστολείς που έχουν μελετηθεί με κινητικές μελέτες ως προς το *GDE*.

Η *dNOJ* και παράγωγα της αναστέλλουν την γλυκοζιτάση και όχι την τρανσφεράση του *GDE* με τιμές IC_{50} της τάξεων των χαμηλών μM . Σε συγκέντρωση 100 μM *dNOJ* το *GDE* εμφανίζει δραστηριότητα μόνο 1 - 7 % ως προς το δείγμα ελέγχου ενώ η δραστηριότητα της *GP* σε συγκέντρωση 0.6 mM μένει πρακτικά ανεπηρέαστη [137]. Εκτός από τις παραπάνω ενώσεις, έχουν μελετηθεί και άλλα σακχαρομιμητικά ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν το

GDE αλλά και άλλες α-1,4 γλυκοζιτάσες. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι πέντε ενώσεις οι οποίες αναστέλλουν ισχυρά το *GDE*. Εκτός από τη *miglitol* και η *fagomine* αναστέλλει ισχυρά το *GDE* συγκριτικά με τις υπόλοιπες α-γλυκοζιτάσες ενώ η δράση τους ως προς την *GP* είναι από μικρή έως μηδαμινή [37, 45]. Το εύρημα αυτό είναι αρκετά σημαντικό γιατί η ένωση *miglitol* έχει εγκριθεί από τον *FDA* (1996) ως φάρμακο για τη διαχείριση του ΣΔ2 καθώς αποτελεί αναστολέα α-γλυκοζιτασών και καθυστερεί την πέψη των υδατανθράκων μετά από ένα γεύμα αποτρέποντας έτσι την αύξηση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα [140, 141].

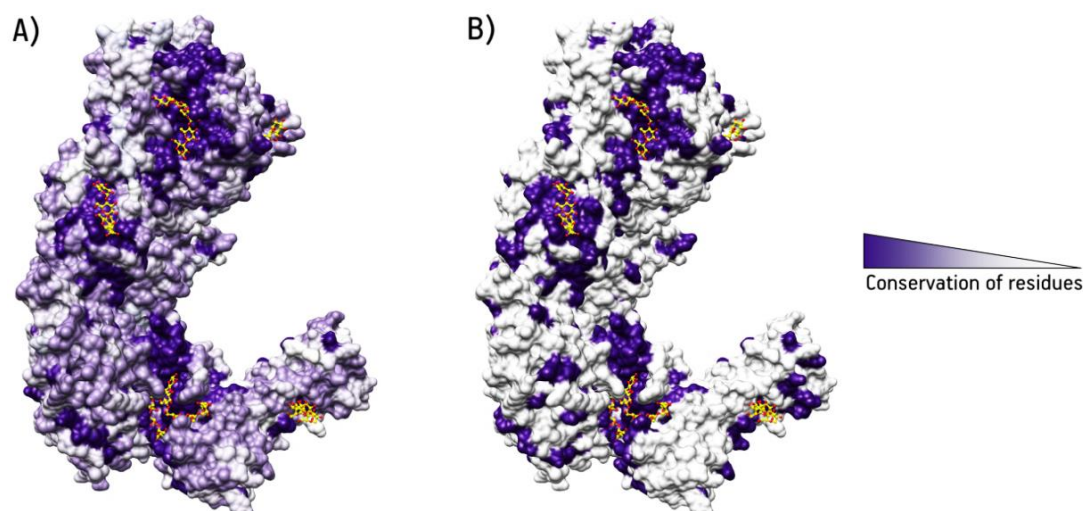
Πίνακας 6: Τα πέντε πιο βιοδραστικά σάκχαρο-μμητικά ως προς το *rmGDE* και άλλες γλυκοζιτάσες. Οι τιμές των IC_{50} παρουσιάζονται σε μM [45].

Ένζυμο	<i>dNOJ</i>	<i>Fagomine</i>	<i>HNJ</i>	<i>7-O-β-D-glucopyranosyl-HNJ</i>	<i>Miglitol</i>
Εντερική α-γλυκοζιτάση					
Μαλτάση αρουραίου	0.13	820	0.08	0.38	1.3
Ισομαλτάση αρουραίου	0.16	460	0.70	0.60	1.2
Σουκράση αρουραίου	0.21	90	0.17	2.6	0.11
α-γλυκοζιτάση	1.0	- ^a	1.0	18	0.35
β-γλυκοζιτάση	240	- ^a	- ^a	- ^a	84
<i>rmGPb</i>	- ^b	200	- ^b	- ^b	- ^b
<i>rmGDE (1,6-Glc)</i>	0.19	2.1	0.11	6.1	0.39

^a Λιγότερο από 50 % αναστολή σε 1000 μM αναστολέα.

^b Λιγότερο από 50 % αναστολή σε 400 μM αναστολέα.

Η διαθέσιμη κρυσταλλική δομή για το *CgGDE*, του οποία η αλληλουχία είναι αρκετά συντηρημένη στα καταλυτικά κέντρα (Εικόνα 24), αλλά και η επίλυση της δομής του *hGDE* θα δώσει όλες τις απαραίτητες δομικές πληροφορίες ώστε μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων να γίνει σύνθεση χημικών ενώσεων πολύ πιο ισχυρών, οι οποίες πιθανόν να μπορούν να περάσουν σε κλινικές μελέτες, όπως το *miglitol*.



Εικόνα 24: Η επιφάνεια της κρυσταλλικής δομής του *CgGDE* (PDB-ID: 5D0F, [44]) σε σύμπλοκο με ολιγοσακχαρίτες. Με διαβάθμιση της έντασης των χρωμάτων παρουσιάζεται η συντήρηση των καταλοίπων μεταξύ των: A) *CgGDE*, *ScGDE*, *hGDE*, *rGDE*, *pGDE* και B) *CgGDE*, *hGDE*. Η στοίχιση των αλληλουχιών παρατίθεται στο παράρτημα (Στοίχιση 2). Η απεικόνιση των ποσοστών συντήρησης των καταλοίπων έγινε με το πρόγραμμα *UCSF Chimera* [142].

1.4. Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων κατευθυνόμενος από τη δομή (*Structure Based Drug Design, SBDD*)

Η διαδικασία η οποία ακολουθείται ώστε ένα υποψήφιο φάρμακο να μπορέσει να βγει στην αγορά απαιτεί επένδυση πολλών χρημάτων από τις φαρμακευτικές εταιρείες και πάνω από 15 χρόνια μελετών κατά μέσο όρο. Το ποσοστό επιτυχίας είναι αρκετά μικρό (~ 10 %) καθώς πολλά υποσχόμενα φάρμακα αδυνατούν να περάσουν τις κλινικές μελέτες είτε γιατί χαρακτηρίζονται ως μη αποτελεσματικά είτε λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών. Αυτό σημαίνει ότι το ~ 70 % των χρημάτων που έχουν δαπανηθεί για κλινικές μελέτες δεν έχει οδηγήσει σε παραγωγή νέων φαρμάκων. Σήμερα ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής πολλών πρωτεϊνών μέσω μεθόδων όπως η κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (*NMR*) παρέχουν το απαραίτητο πλαίσιο ώστε να σχεδιαστούν αναστολείς με μεγάλη συγγένεια ως προς τα μόρια στόχους [143]. Μεγάλη εφαρμογή για τον *SBDD* βρίσκεται στην παραγωγή φαρμάκων εξειδικευμένων για παθογόνα, καθώς ο *SBDD* μπορεί να οδηγήσει σε εξειδικευμένη στόχευση των πρωτεϊνών των παθογόνων οργανισμών, βασιζόμενοι στις δομικές διαφορές που εμφανίζουν με τις αντίστοιχες ανθρώπινες πρωτεΐνες, ώστε να μην επηρεαστεί η λειτουργία του ξενιστή [144].

Οι συνεχείς βελτιώσεις των υπηρεσιών που παρέχουν τα αυτοματοποιημένα κέντρα συγχροτρονικής ακτινοβολίας, όπως η πιο ισχυρή ακτινοβολία και η δυνατότητα αυτοματοποιημένης συλλογής δεδομένων με μεγάλη ταχύτητα χωρίς φυσική παρουσία αλλά και η ταυτόχρονα εξέλιξη των προγραμμάτων ανάλυσης δεδομένων μείωσαν κατά πολύ το χρόνο που χρειάζεται για την ανακάλυψη νέων δομών. Το πρώτο στάδιο του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων είναι η εύρεση του στόχου. Ο στόχος μπορεί να είναι ένα βιολογικό μακρομόριο όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Τα ένζυμα, μιας που αποτελούν καταλύτες βιολογικών αντιδράσεων, αποτελούν τους πρωταγωνιστές στον *SBDD* καθώς βλάβες στη ρύθμιση ή τη λειτουργία τους μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες. Η διαδικασία του *SBDD* βασίζεται στην επανάληψη μιας σειράς διεργασιών, συχνά μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων, με σκοπό τη βελτιστοποίηση μιας ένωσης οδηγού ώστε να χρησιμοποιηθεί σε κλινικές μελέτες (Διάγραμμα 1). Ο πρώτος κύκλος περιλαμβάνει την κλωνοποίηση του γονιδίου στόχου, τον καθαρισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης και τον βιοχημικό και δομικό χαρακτηρισμό της. Ο προσδιορισμός της δομής μπορεί να γίνει μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ, *NMR* και κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, με κάθε μεθοδολογία να φέρει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα [144]. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-

X αποτελεί την πλέον παραδοσιακή τεχνική καθώς μπορούν να εξαχθούν δεδομένα υψηλής ευκρίνειας και να παρατηρηθούν μόρια ύδατος τα οποία μπορεί να έχουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα της πρωτεΐνης αλλά και στην καταλυτική δράση, ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά τον *SBDD*. Στη συνέχεια, πρέπει να βρεθεί μια ένωση οδηγός, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία άλλων πιο βιοδραστικών ενώσεων. Ένωση οδηγό, μπορεί να αποτελεί το υπόστρωμα της πρωτεΐνης ή συμπαράγοντες οι οποίοι αν τροποποιηθούν μπορούν να αποτελέσουν ισχυρούς αναστολείς του ενζύμου [144, 145]. Αν δεν υπάρχουν τέτοια δεδομένα, τότε μια ένωση οδηγός μπορεί να προκύψει είτε πειραματικά μέσω υψηλής απόδοσης διαλογή συλλογών (*HTS*), κρυσταλλογραφία συγγένειας, σχεδιασμό φαρμάκων μέσω θραυσμάτων (*FBDD*) είτε μέσω του σχεδιασμού φαρμάκων *in silico* (*CADD*).

- Σχεδιασμός φαρμάκων *in silico* (Computer-Aided Drug Discovery, *CADD*).

Η ύπαρξη μεγάλων βιβλιοθηκών με χημικές ενώσεις χρησιμεύει στην *in silico* διαλογή πολλών ενώσεων ώστε να βρεθεί ένα αρχικό μόριο το οποίο στη συνέχεια θα βελτιστοποιηθεί ως προς τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη στόχο [143]. Για την κατασκευή των κατάλληλων μοντέλων για μελέτες μοριακού ελλιμενισμού (*docking*) μπορούν να χρησιμοποιηθούν δεδομένα από κρυσταλλογραφία ακτίνων-X και από μελέτες *NMR*. Επειδή η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X αποκαλύπτει μόνο μια διαμόρφωση για την πρωτεΐνη, συνήθως χρησιμοποιούνται διαφορετικές δομικές διαμορφώσεις για την ίδια πρωτεΐνη με σκοπό την παραγωγή του μοντέλου. Η φασματοσκοπία *NMR* διαθέτει ένα πλεονέκτημα σε αυτό το κομμάτι καθώς προκύπτουν διαφορετικές διαμορφώσεις της ίδιας πρωτεΐνης στο διάλυμα. Συχνά, αν υπάρχουν δεδομένα για μια πρωτεΐνη και από τις δύο μεθοδολογίες, τότε συνδυάζονται. Όταν όμως δεν υπάρχει γνωστή δομή συνήθως κατασκευάζονται μοντέλα μέσω ομόλογου συνδυασμού με χρήση υπολογιστών. Με υπολογιστικά προγράμματα και χρήση αλγορίθμων πολλές ενώσεις ή θραύσματα ενώσεων ελέγχονται για το αν μπορούν να προσδεθούν σε επιλεγμένες περιοχές της δομής. Αυτοί οι παράγοντες αξιολογούνται, κατηγοριοποιούνται και ελέγχονται στο εργαστήριο με βιοχημικές μεθόδους [144]. Έπειτα οι πιο υποσχόμενες ενώσεις μπαίνουν ξανά στη διαδικασία βελτιστοποίησης με σκοπό την εύρεση πιο ισχυρών ενώσεων.

- Διαλογή υψηλής απόδοσης (High throughput Screening, *HTS*).

Η αναγκαιότητα για την εύρεση φαρμάκων και ειδικότερα η εύρεση ενώσεων οδηγών που μπορούν να τροποποιηθούν για να δοκιμαστούν ως εν δυνάμει φάρμακα έχει οδηγήσει σε ανάπτυξη σημαντικών τεχνολογιών και αυτοματοποιημένων μέσων ώστε να δοκιμάζονται με

χαμηλό κόστος και σε σύντομο χρονικό διάστημα πολλές χημικές ενώσεις έναντι ενός στόχου. Εκτός από την ανάπτυξη στην υλικοτεχνική υποδομή, η εύρεση νέων, άμεσων, μη ραδιενεργών μεθόδων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας ενζύμων οδηγεί σε ταχεία σάρωση πολλών ενώσεων. Ωστόσο, η ίδια αυτή η ανάπτυξη αυτοματοποιημένης τεχνολογίας που συχνά απαιτεί την χρήση 1 - 2 μL σε πιάτα έως και 1536 θέσεων μειώνει μεν το κόστος και την ταχύτητα αλλά για να είναι αξιόπιστο το αποτέλεσμα απαιτείται η χρήση αξιόπιστων οργάνων που μπορούν να χειριστούν με ακρίβεια τέτοιους όγκους [146]. Επιπλέον, η ταχύτητα διαλογής πολλών ενώσεων ποικίλει ανάλογα με την πολυπλοκότητα της μεθόδου που εφαρμόζεται. Γενικά, η διαλογή ~ 10.000 ενώσεων χρειάζεται περίπου μια εβδομάδα ενώ η διαλογή $\sim 1.000.000$ χρειάζεται περίπου 1-3 μήνες [147]. Το ποσοστό επιτυχίας του *HTS* ώστε να βρεθεί μία ένωση οδηγός υπολογίζεται $\sim 50\%$ αν και η ολοένα αύξηση των βιβλιοθηκών με χημικές ενώσεις φαίνεται πως μάλλον δυσκολεύει το έργο του να «βρούμε μια βελόνα μέσα στα άχυρα» αλλά αυξάνει την πιθανότητα για εύρεση ενώσεων οδηγών για περισσότερα μόρια στόχους [146, 147]. Η χρήση αυτής της μεθόδου μπορεί να εφαρμοστεί και σε κρυστάλλους πρωτεϊνών αλλά αυτή η προσέγγιση είναι αρκετά δαπανηρή και χρονοβόρα και για αυτό συνήθως μόνο τα αρχικά ευρήματα χρησιμοποιούνται για την ανάλυση του τρόπου πρόσδεσης τους στο μόριο στόχο ώστε στη συνέχεια να βελτιστοποιηθούν.

- Σχεδιασμός φαρμάκων βασιζόμενος σε θραύσματα ενώσεων (*Fragment Based Drug Design, FBDD*).

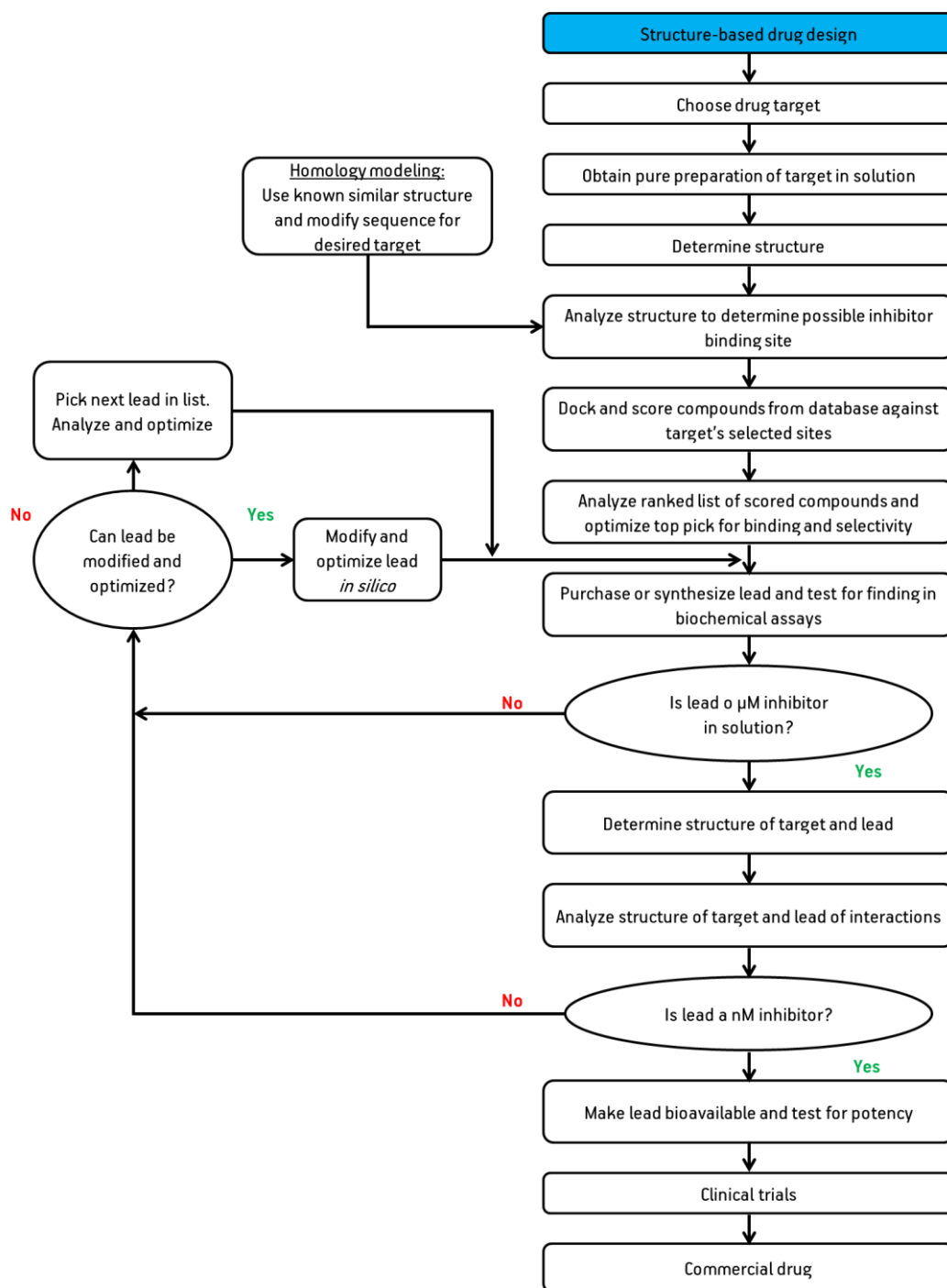
Η μεθοδολογία του *FBDD* χρησιμοποιείται για την εύρεση μικρών θραυσμάτων χημικών ενώσεων που μπορούν να προσδένονται σε ένα μεγάλο εύρος θεραπευτικών στόχων, όπως είναι τα ένζυμα. Η βασική αρχή που ακολουθεί ο *FBDD* στηρίζεται στη διαλογή ακόμα και μιας μικρής βιβλιοθήκης μικρών και απλών μορίων (10^2 - 10^4 θραύσματα) αυξάνοντας την πιθανότητα να βρεθεί ένα εύρημα που προσδένεται στον στόχο, συγκριτικά με τη διαλογή μεγάλων βιβλιοθηκών με μεγαλύτερα μόρια όπως στο *HTS* (έως 10^6 ενώσεις). Αυτά τα θραύσματα ενώσεων αξιολογούνται αρχικά ως προς την ικανότητα τους να προσδένονται στο ένζυμο με βιοχημικές και/ή βιοφυσικές μεθόδους. Συνήθως, τα ευρήματα δεν προσδένονται ισχυρά στον στόχο με σταθερά διάστασης (K_D) από υψηλά μM έως mM [148]. Το γεγονός ότι οι αρχικές ενώσεις οδηγοί που βρίσκονται έχουν χαμηλή συγγένεια ως προς τους στόχους εγείρει ερωτήματα γύρω από το κατά πόσο τέτοιες ενώσεις που μπορεί να προσδένονται στον κρύσταλλο θα παρατηρηθούν στη δομή μετά από αρχική βελτιστοποίηση του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Μελέτη των *Schiebel, J.* και συνεργατών, έδειξε ότι το 25 % των

ευρημάτων που είχαν από αυτή τη μέθοδο θα είχε παραλειφτεί αν δεν είχαν προχωρήσει σε περαιτέρω βελτιστοποίηση των δομών [149]. Η επίλυση της δομής του συμπλόκου ενζύμου-θραύσματος, συνήθως με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ αναδεικνύει το ή τα κέντρα πρόσδεσης στο ένζυμο. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου διαφορετικά θραύσματα έχουν βρεθεί προσδεμένα σε κοντινές περιοχές του ενζύμου. Η ένωση αυτών των θραυσμάτων σε μια χημική ένωση μέσω ενός βραχίονα έχει οδηγήσει σε σημαντική αύξηση της δράσης τους. Ωστόσο, η επιλογή του κατάλληλου βραχίονα ώστε να μην επηρεαστεί ο τρόπος πρόσδεσης των δύο θραυσμάτων αποτελεί μια δύσκολη διαδικασία. Όπως και στην *HTS* έτσι και εδώ, η οποιαδήποτε βελτιστοποίηση των αρχικών ευρημάτων επηρεάζεται άμεσα από την δυνατότητα οι υποψήφιος ενώσεις να μπορούν να συντεθούν στο εργαστήριο [148].

- Κρυσταλλογραφία συγγένειας

Η κρυσταλλογραφία συγγένειας αναπτύχθηκε με σκοπό την εύρεση των πιο βιοδραστικών ουσιών από ένα μίγμα φυσικών ουσιών (εκχύλισμα). Η κλασική μεθοδολογία που ακολουθείται μέχρι σήμερα για την εύρεση δραστικών ουσιών από φυτά βασίζεται σε διαφορετικά στάδια εκχύλισης στα οποία πραγματοποιούνται δοκιμές δραστικότητας έναντι πρωτεϊνών στόχων και στη συνέχεια περαιτέρω καθαρισμός του μίγματος και δοκιμές δραστικότητας. Στο τέλος, ο ερευνητής καταλήγει με μια ή λίγες ενώσεις που μπορούν να επηρεάσουν τη δραστικότητα του στόχου. Η διαδικασία αυτή είναι δαπανηρή και απαιτεί πολλές εργατοώρες. Η κρυσταλλογραφία συγγένειας ελαχιστοποιεί το χρόνο διότι χρησιμοποιεί τον κρύσταλλο ως μέσο εκλεκτικής προσρόφησης της πιο βιοδραστικής ένωσης από το εκχύλισμα στη βάση της παραδοχής ότι η ένωση με τη μεγαλύτερη συγγένεια ως προς το στόχο θα βρεθεί συνδεδεμένη στον κρύσταλλο. Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι μια ένωση μπορεί να βρεθεί προσδεμένη στον κρύσταλλο ακόμα και αν υπάρχει σε μικρά ποσοστά στο εκχύλισμα [150]. Επιπλέον, η εφαρμογή αυτής της μεθόδου έχει οδηγήσει στην εύρεση ενός νέου κέντρου της *GP*, το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης, [62] η οποία αναστέλλει το ένζυμο *in vitro* με σταθερά αναστολής $44 \mu M$ [151]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι προσδέεται το χλωρογενικό οξύ στο καταλυτικό κέντρο [152] και το ελλαγικό οξύ κέντρο αναστολής [92, 152]. Το χλωρογενικό οξύ εμφανίζει σχετικά υψηλή τιμή K_i ($2.5 mM$), παρόμοια με τη γλυκόζη, [152] και η χορήγηση του χλωρογενικού οξέος σε αρουραίους *Zucker (fa/fa)* με ανοχή στην ινσουλίνη έχει δείξει ότι μειώνει το μέγιστο επίπεδο του σακχάρου στο αίμα μετά από γεύμα [153]. Το ελλαγικό οξύ είναι μια αρκετά βιοδραστική φυσική ένωση καθώς αναστέλλει το ένζυμο με τιμή K_i ίση με $7.5 \mu M$ ως προς την *rmGPa* [92]. Επίσης η χορήγηση

ελλαγικού οξέος σε διαβητικά ποντίκια οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα [154].



Διάγραμμα 1: Ένα διάγραμμα ροής που ακολουθείται στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμών φαρμάκων. Το διάγραμμα αποτελεί ανακατασκευή του αντίστοιχου διαγράμματος της δημοσίευσης των Anderson, A.C., και συνεργατών [144].

Το σκεύασμα *EmulinTM*, ένα παντενταρισμένο προϊόν, το οποίο αποτελείται από κερσετίνη, χλωρογενικό οξύ και μυρισετίνη μπορεί σε βάθος χρόνου να μειώσει τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα ασθενών με ΣΔ2 [155]. Η μυρισετίνη αναστέλλει την εντερική α-γλυκοζιτάση διαβητικών αρουραίων με τιμή της IC_{50} στα 0.44 mM [156] ενώ το χλωρογενικό οξύ και η

κερσετίνη αποτελούν επίσης αναστολείς α-γλυκοζιτασών, όπως η σουκράση, με τιμή IC_{50} ίση με 2.18 mM και 1.46 mM αντίστοιχα [157]. Η κρυσταλλογραφία συγγένειας είναι μια μεθοδολογία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για υψηλής απόδοσης σάρωσης εκχυλισμάτων με σκοπό την εύρεση νέων φυσικών ενώσεων, υποψήφιων για φαρμακευτική χρήση αλλά και για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων.

Από τις παραπάνω προσεγγίσεις, προκύπτουν μόρια τα οποία αξιολογούνται ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν το ένζυμο. Οι ενώσεις που θα αναστέλλουν το ένζυμο *in vitro* σε συγκεντρώσεις χαμηλών μM συνεχίζουν να αξιολογούνται σε δεύτερο κύκλο. Στον δεύτερο κύκλο, γίνεται προσδιορισμός της δομής των πιο υποσχόμενων ενώσεων σε σύμπλοκο με το ένζυμο ώστε να αποκαλυφθεί το κέντρο στο οποίο προσδέονται και οι αλληλεπιδράσεις τους με αυτό, με στόχο οι ενώσεις αυτές να βελτιστοποιηθούν περαιτέρω με υπολογιστικές μεθόδους. Σημαντικό παράγοντα στην επιλογή των υποψήφιων μορίων που θα σχεδιαστούν αποτελεί η δυνατότητα σύνθεσης τους στο εργαστήριο καθώς δεν είναι εφικτό να συντεθεί οποιαδήποτε ένωση θεωρεί ένας επιστήμονας ότι μπορεί να αποτελέσει υποψήφιο φάρμακο [144]. Επιπλέον, οι ενώσεις αξιολογούνται και ως προς διάφορους περιοριστικούς παράγοντες όπως οι ιδιότητες *ADMET* (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση και τοξικότητα) κ.α. για να είναι όσο το δυνατόν πιο πιθανό να έχουν θετικό αποτέλεσμα σε κλινικές μελέτες [143]. Αφού προκύψουν οι υποψήφιες ενώσεις ακολουθούν και άλλοι κύκλοι σύνθεσης χημικών ενώσεων, αξιολόγησης, προσδιορισμού της δομής του συμπλόκου και βελτιστοποίησης ώστε στο τέλος να προκύψουν ενώσεις/η με φανερά αυξημένη συγγένεια ως προς το ένζυμο, ικανές να δοκιμαστούν σε κλινικές μελέτες [144]. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται κάποια πολύ επιτυχημένα παραδείγματα του *SBDD* που βρίσκονται σήμερα στην αγορά.

Πίνακας 7: Κάποια επιτυχημένα παραδείγματα του *SBDD* που έχουν επιτύχει σε κλινικές μελέτες και κυκλοφορούν στην αγορά [143].

Φάρμακο	Πρωτεΐνη-Στόχος	Εταιρεία
Dorzolamid	Carbonic Anhydrase	Merck Sharp and Dohme (Harlow, UK)
Saquinavir	HIV Protease	Roche (Welwyn, UK)
Zanamivir	Neuraminidase	Biota (Melbourne, Australia)
AG85, AG337, AG331	Thymidylate synthase	Agouron (La Jolla, CA, USA)
Ro466240	Thrombin	Roche (Basel, Switzerland)
Imatinib	BCR-ABL	Novartis (Basel)

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η εύρεση μικρών μορίων τα οποία θα μπορούσαν να αναστείλουν ισχυρά την γλυκογονόλυση. Τέτοιες ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω ως αντι-υπεργλυκαιμικοί παράγοντες για τη διαχείριση του ΣΔ2, καθώς σε ασθενείς με αυτή τη νόσο η γλυκογονόλυση αυξάνει επιπλέον τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Τα κύρια ένζυμα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*) και το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου (*GDE*). Η *GP* καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση κατάλοιπων γλυκόζης από το μακρομόριο του γλυκογόνου προς παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης, η οποία στο ήπαρ μετατρέπεται σε ελεύθερη γλυκόζη, ώστε να διατηρούνται τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα σε φυσιολογικά επίπεδα [5]. Η δράση της *GP* σταματά τέσσερα κατάλοιπα γλυκόζης πριν από ένα σημείο διακλάδωσης. Τότε, το *GDE* μεταφέρει τα τρία κατάλοιπα γλυκόζης από τη διακλάδωση σε μια άλλη και υδρολύει τον α -1,6 γλυκοζιτικό δεσμό του μορίου της γλυκόζης που είχε απομείνει στη διακλάδωση. Έτσι, η *GP* είναι ελεύθερη να συνεχίσει τον καταβολισμό του γλυκογόνου [5]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η *GP* από μόνη της μπορεί να διασπάσει μόνο το 30 % του γλυκογόνου και το υπόλοιπο 70 % μπορεί να ανοικοδομηθεί μόνο με τη βοήθεια του *GDE* [103]. Η *GP* είναι ένας φαρμακευτικός στόχος για τη διαχείριση του ΣΔ2 [29] καθώς έχει φανεί ότι αναστολές της *GP* μειώνουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα διαβητικών ποντικών και οδηγούν σε βελτίωση της έκκρισης της ινσουλίνης [158-160]. Επομένως, η εύρεση ενώσεων που θα μπορούν να αναστείλουν ισχυρά την *GP* ή το *GDE* ή ενδεχομένως και τα δύο ένζυμα ταυτόχρονα αποτελεί μια υποσχόμενη προσέγγιση για τη διαχείριση του ΣΔ2. Οι τρεις κύριες κατηγορίες αναλόγων γλυκόζης που έχουν μελετηθεί και οδηγούν σε αναστολή της *GP* με τιμές των K_i της τάξης μικρών μM είναι ανάλογα: α) *c*-γλυκοπυρανόσυλο-ετεροκυκλικών ενώσεων [161] β) *N*-άκυλο-*N'*-γλυκοπυρανόσυλο-ουρίας [82, 162, 163] και γ) γλυκοπυρανοσυλιδενο-σπείρο-ετεροκυκλικών ενώσεων [82]. Αρχικά, εστίασαμε στις σπείροκυκλικές ενώσεις καθώς προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα διαβητικών αρουραίων [158, 160] και να ευαισθητοποιήσουν τους ιστούς στόχους στη μεταβολική δράση της ινσουλίνης [159]. Συγκριτικά με τις προηγούμενες μελέτες, προσπαθήσαμε να εκμεταλλευτούμε τα δομικά χαρακτηριστικά που είχαν βρεθεί να προσδίδουν ισχυρή αναστολή σε σπείρο-κυκλικές ενώσεις. Έτσι καταλήξαμε στη μελέτη γλυκοπυρανοσυλιδενο-σπείρο-ιμιδαζολινονών με κινητικές και δομικές μελέτες ως προς τη *GP*.

Έπειτα στραφήκαμε σε *C*-β-*D*-γλυκοκυρανόσυλο-ετεροκυκλικές ενώσεις, καθώς τέτοιες ενώσεις που διαθέτουν μια ομάδα ιμιδαζολίου ή τριαζολίου αποτελούν τους πιο ισχυρούς αναστολείς της *GP* για το καταλυτικό κέντρο μέχρι σήμερα με τιμή της K_i ίση με 26 nM [57] και 172 nM αντίστοιχα [58]. Με σκοπό να προσδιορίσουμε το ρόλο της φύσης και της θέσης των ατόμων στον ετεροκυκλικό δακτύλιο μελετήσαμε τη σύνδεση στη *GP* μια σειράς αναλόγων *C*-β-*D*-γλυκοκυρανόσυλο -θειαζολών, -ιμιδαζολών και μιας *N*-β-*D* γλυκοκυρανόσυλο - τετραζόλης. Επιπλέον, εξετάσαμε τον ρόλο του δακτυλίου της γλυκόζης, καθώς προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι η παρεμβολή στο δακτύλιο της γλυκόζης με αντικατάσταση κάποιων ομάδων της είχε οδηγήσει σε σημαντική μείωση της ισχύς των αναστολέων. Για το λόγο αυτό, μελετήσαμε τη σύνδεση στη *GP* δύο ενώσεων οι οποίες είχαν τροποποιημένο το δακτύλιο της γλυκοκυρανόζης όπου η ομάδα -OH στη θέση 2' ($K_i = 172$ nM [58]) αντικαταστάθηκε από μια ομάδα -NH₂ (γλυκοζαμίνες). Σε όλες τις παραπάνω αλλά και σε προηγούμενες μελέτες, έχει αναδειχθεί ο ρόλος των υδρόφοβων ομάδων ως υποκαταστάτες σε έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο [57, 58, 80]. Επομένως, θελήσαμε να εξερευνήσουμε τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου στην οποία προσδένονται όλοι αυτοί οι αναστολείς. Ως βάση, χρησιμοποιήσαμε πάλι ανάλογα *C*-β-*D*-γλυκοκυρανόσυλο-τριαζόλης όπου στο δακτύλιο του τριαζολίου υπήρχε μια φαινυλομάδα ως υποκαταστάτης. Η φαινυλομάδα με τη σειρά της έφερε υποκαταστάτες στη θέση *πάρα*, οι οποίοι διέφεραν ως προς το μέγεθος και την πολικότητα. Εκτός από το καταλυτικό κέντρο της *GP* μελετήσαμε και το κέντρο αναστολής της με ανάλογα χρυσίνης. Η μελέτη του κέντρου αναστολής έχει φαρμακολογικό ενδιαφέρον καθώς ενώσεις που προσδένονται σε αυτό το κέντρο του ενζύμου εμφανίζουν συνέργεια με τη γλυκόζη. Αυτό σημαίνει ότι οι αναστολείς αυτοί αναστέλλουν το ένζυμο πιο ισχυρά παρουσία γλυκόζης και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για αποφυγή της υπογλυκαιμίας [84, 87, 89, 92]. Μελετήσαμε ανάλογα χρυσίνης με κινητικές και δομικές μελέτες καθώς η πρόσδεση της χρυσίνης στο ένζυμο είχε μελετηθεί εις βάθος στο παρελθόν [89].

Σε ό,τι αφορά το *GDE*, δεν υπάρχουν πολλές μελέτες με αναστολείς του ενζύμου. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί κάποιοι αναστολείς οι οποίοι δεν είναι αρκετά ειδικοί, καθώς στοχεύουν και άλλες γλυκοζιτάσες [45, 137, 138]. *In vivo* πειράματα σε αρουραίους έχουν δείξει ότι η *dNOJ* και η *miglitol* είναι αναστολείς του *GDE* και της επαγόμενης γλυκογονόλυσης από γλυκαγόνη και Ca²⁺ χωρίς όμως να επηρεάζεται η συγκέντρωση της *GPa* [139]. Η πλειοψηφία των μελετών έχουν γίνει είτε σε *rmGDE* είτε σε *ScGDE*. Σε ό,τι αφορά το ανθρώπινο *GDE* (*hGDE*) δεν

υπάρχει αναφορά στη βιβλιογραφία για παραγωγή του *hGDE* στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης *E. coli* και η μόνη διαθέσιμη κρυσταλλική δομή ευκαρυωτικού *GDE* προέρχεται από τον οργανισμό *Candida glabrata* [44]. Η εύρεση της κρυσταλλικής δομής του *hGDE* θα προσφέρει πολλές πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης του και το σχεδιασμό εν δυνάμει αναστολέων. Για το λόγο αυτό, έγιναν δοκιμές παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης στο *E. coli* και καθαρισμός, απομόνωση, κρυστάλλωση και εκτίμηση της δραστικότητας του *hGDE*.

Η μελέτη που παρουσιάζεται στη διδακτορική διατριβή παρέχει σημαντικές πληροφορίες σε ότι αφορά τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων για την *GP* και θέτει τις βάσεις για τη βιοχημική και δομική μελέτη καθώς και τον κατευθυνόμενο από δομή σχεδιασμό αναστολέων για το *hGDE*.

3. ΥΛΙΚΑ

3.1. Όργανα

Όργανο: μοντέλο	Εταιρεία
<i>FPLC: AKTA purifier UPC900</i>	<i>GE Healthcare</i>
Φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους φωτός: UV-1600PC	<i>VWR</i>
Φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους φωτός: LAMBDA Bio	<i>PerkinElmer</i>
Συσκευή μέτρησης pH: 827 pH Lab	<i>Metrohm</i>
Φυγόκεντρος: eppendorf 5417R	<i>Eppendorf</i>
Φυγόκεντρος 50 mL, 500 mL	<i>Hitachi</i>
Συσκευή παραγωγής υπερήχων	<i>Witeg</i>
Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης	<i>Bio-Rad</i>
Υδατόλουτρο: Wisebath	<i>Witeg</i>
<i>Heat block</i>	<i>Nippon Genetics</i>
Αναλυτικός ζυγός	<i>KERN</i>
Παρασκευαστικός ζυγός	<i>KERN</i>
Ανακινούμενος-ψυχόμενος επωαστήρας	<i>LabTech</i>
Ρομποτικό σύστημα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης: <i>OryxNano</i>	<i>Douglas Instruments</i>
Συμβατή πηγή παραγωγής ακτίνων - X: Oxford Diffraction SuperNova	<i>Oxford Diffraction</i>
<i>PCR</i>	<i>Eppendorf</i>
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης: <i>Mini-PROTEAN tetra cell</i>	<i>Bio-Rad</i>
Σύστημα απεικόνισης πηκτών πολυακρυλαμίδης: <i>ChemiDox XR</i>	<i>Bio-Rad</i>

3.2. Βακτηριακές κυτταρικές σειρές

Βακτηριακό στέλεχος (DE3)	Εταιρεία
<i>BL21Gold</i>	<i>Agilent technologies</i>
<i>B834</i>	<i>Novagen</i>
<i>B834 pLysS</i>	<i>Novagen</i>
<i>Rosetta2</i>	<i>Novagen</i>
<i>Origami</i>	<i>Novagen</i>

3.3. Γονίδια κλωνοποιημένα σε πλασμιδιακούς φορείς

Γονίδιο	Πλασμίδιο
<i>hGP</i>	<i>pETM-11</i>
<i>rmPhK-γ-trunc</i>	<i>PGEX-6P-1</i>
<i>CgGDE</i>	<i>pET-26b</i>
<i>hGDE</i>	<i>pET-26b</i>
<i>hGDE</i>	<i>pET-26b</i>

3.4. Στήλες/υλικά χρωματογραφίας

Στήλες/υλικά χρωματογραφίας	Εταιρεία
<i>HiTrap FF (1 και 5 mL)</i>	<i>GE Healthcare</i>
<i>HiTrap TALON Crude (1 mL)</i>	<i>GE Healthcare</i>
<i>Resource Q (1 mL)</i>	<i>GE Healthcare</i>
<i>HiTrapQ (5 mL)</i>	<i>GE Healthcare</i>
<i>HiTrap Blue (1 mL)</i>	<i>GE Healthcare</i>
<i>Epoxy-Activated Sepharose 6B (15 g)</i>	<i>GE Healthcare</i>
<i>Protino Glutathione Agarose 4B (1 mL)</i>	<i>Macherey-Nagel</i>
Στήλη XK16/20	<i>GE Healthcare</i>

3.5. Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
Acetic acid (CH ₃ COOH)	Sds
Acrylamide	Serva
Activated Charcoal	Sigma
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma
Adenosine Triphosphate (ATP)	Sigma
Ammonium Molybdate	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Ammonium sulfate [(NH ₄) ₂ SO ₄]	ChemLab
Ampicillin	Serva
Arabinose	Applichem
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
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethanolamine	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glucose Liquid Fast Enzymatic GOD-POD: REF 3101	P. Zafiroopoulos
Glycerol	Applichem
Glycine	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Imidazole 99%	Sigma
Imidazole BioUltra	Sigma
Inosine Monophosphate (IMP)	Sigma
L-Ascorbic acid	Sigma
LB-Agar	Serva
Magnesium acetate tetrahydrate (CH ₃ COOH) ₂ Mg	Applichem
Magnesium Chloride anhydrous (MgCl ₂)	Alfa Aesar
Magnesium sulfate (MgSO ₄) anhydrous	Merck
Manganese (II) Chloride (MnCl ₂)	Sigma
MES	Apollo Scientific
Methanol	Scharleu
Monopotassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	Merck
Monosodium dihydrogen orthophosphate (NaH ₂ PO ₄)	Merck
phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	AppliChem
Potassium bicarbonate (KHCO ₃)	Merck
Potassium chloride (KCl)	Merck
Protease inhibitors	Roch
Pyridoxine	Sigma
Sodium acetate (CH ₃ COONa)	Merck
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃) anhydrous	sds
Sodium chloride (NaCl)	Scharleu
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Serva
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck
Spermine	Sigma

Sucrose	Sigma
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra Pure	Applichem
Triton X-100	Panreac
Tryptone	Serva
Yeast extract	Serva
Zinc acetate	Sigma
α -D-Glucose (Glc)	Sigma
α -D-Glucose 1-Phosphate (G1P) Dipotassium Salt hydrate	Sigma
β -Cyclodextrin (β -CD)	Serva
β -Glycerol phosphate (β -GP)	Sigma
β -Mercaptoethanol (β -Merc)	Sigma
Πυκνό διάλυμα αμμωνίας	Fluka

3.6. Λοιπά υλικά

Υλικά	Εταιρεία
Φίλτρα συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa	Amicon Ultra-4, Meck Millipore
Φίλτρα συμπύκνωσης με κατώφλι 30 kDa	Amicon Ultra-4, Meck Millipore
Φίλτρα συμπύκνωσης με κατώφλι 100 kDa	Amicon Ultra-15, Meck Millipore
Μεμβράνες διαπίδυσης με κατώφλι 10 kDa	Sigma
Πιάτα κρυστάλλωσης 96 θέσεων: SWISSCI MRC 2 Well	Jena Bioscience
Υάλινοι τριχωειδείς σωλήνες διαμέτρου 1.5 mm	Hilgenberg GmbH
Φίλτρα για φιλτράρισμα διαλυμάτων: Omni pore membrane filter	Merc Millipore
Φίλτρα σύριγγας 0.2 μ m	Sartorius
Φίλτρα σύριγγας 0.45 μ m	Sartorius

3.7. Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1, pH 6.8:	50 mM β -φωσφορική γλυκερόλη
	50 mM β -Μερκαπτοαιθανόλη
	1 mM EDTA
Ρυθμιστικό διάλυμα TEA, pH 6.8:	100 mM Tris-HCl
	2 mM DTT
	1 mM EDTA
Θρεπτικό υλικό <i>Terrific Broth</i> (1 L):	12.3 g Τρυπτόνη
	24.6 Εκχύλισμα ζύμης
	4.1 mL γλυκερόλη
	12.854 g K ₂ HPO ₄
	2.386 g KH ₂ PO ₄

4. ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΩΝ

4.1.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟ ΕΤΕΡΟΛΟΓΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

E. coli

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA αποτέλεσε μια μεγάλη ανακάλυψη η οποία επέτρεψε την παραγωγή ανθρώπινων πρωτεϊνών, φαρμακευτικού ενδιαφέροντος, σε βακτήρια. Αυτή η δυνατότητα οδήγησε σε μεγάλη ανάπτυξη της φαρμακοβιομηχανίας, στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων και χαρακτηρισμό πολλών πρωτεϊνών. Το 1973 οι *Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W.* και *Helling, R.B.*, [164] περιέγραψαν έναν τρόπο με τον οποίο μεμονωμένα γονίδια μπορούν να κλωνοποιηθούν σε πλασμίδια και να εισαχθούν σε βακτήρια. Έπειτα, ακολούθησαν άλλες δύο δημοσιεύσεις που έδειξαν ότι η ίδια διαδικασία μπορεί να γίνει ακόμα και με γονίδια από ζωικά κύτταρα και να παράγεται μια λειτουργική πρωτεΐνη από τα βακτήρια [165]. Το 1979 αναφέρθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία η παραγωγή ινσουλίνης στο *E. coli* [166] και το 1982 εγκρίθηκε από τον FDA [167] η κυκλοφορία της ανασυνδυασμένης ινσουλίνης στην αγορά από την εταιρεία "Genentech".

Από την κυκλοφορία της ινσουλίνης στην αγορά μέχρι σήμερα, η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και η δυνατότητα παραγωγής πρωτεϊνών σε ετερόλογα συστήματα έκφρασης έχει οδηγήσει στη μελέτη πολλών πρωτεϊνών φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Εκτός από τα βακτήρια, πλέον χρησιμοποιούνται κύτταρα θηλαστικών, ζύμες, φυτά και έντομα με κάθε σύστημα να έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Το μεγάλο πλεονέκτημα της χρήσης βακτηρίων είναι η γρήγορη ανάπτυξη τους και το χαμηλό κόστος φιλοξενίας μιας τέτοιας εγκατάστασης συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους. Επιπλέον, τα βακτήρια δε μπορούν να επιτελέσουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις κάτι το οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι επιθυμητό εάν, παραδείγματος χάριν, μια πρωτεΐνη ενεργοποιείται ή απενεργοποιείται με φωσφορυλίωση. Τα σημαντικά μειονεκτήματα αυτής της μεθοδολογίας είναι τα πιθανά χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, η έκφραση του γονιδίου πριν τη προσθήκη του επαγωγέα της υπερέκφρασης, η δημιουργία συσσωματωμάτων της παραγόμενης πρωτεΐνης και παραγωγή έγκλειστων σωμάτων. Το γεγονός ότι τα βακτήρια δεν μπορούν να επιτελέσουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, μπορεί επίσης να αποτελεί μειονέκτημα εάν αυτές είναι απαραίτητες για τη δομή και

λειτουργία της πρωτεΐνης. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι που βοηθούν στην επίλυση τέτοιων προβλημάτων και σχετίζονται με την αύξηση των επιπέδων έκφρασης και τη παραγωγή σταθερών πρωτεϊνών όπως αναφέρεται συνοπτικά παρακάτω.

4.1.1.1. Αντιμετώπιση προβλημάτων παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο σύστημα *E. coli*

4.1.1.1.1. Χαμηλά επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης

Τα 61 κωδικόνια δεν χρησιμοποιούνται όλα σε ίδια συχνότητα. Τα γνωστά ως “μείζονα” κωδικόνια βρίσκονται σε γονίδια που εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα ενώ αντίθετα τα “σπάνια” κωδικόνια βρίσκονται σε γονίδια που εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα. Η τοποθέτηση των κωδικονίων στις δύο παραπάνω κατηγορίες εξαρτάται από τον οργανισμό στον οποίο γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Η συχνότητα χρήσης των κωδικονίων αντανακλά την αφθονία των *tRNAs* τους. Ως εκ τούτου, όταν τα κωδικόνια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης διαφέρουν σημαντικά από τη μέση χρήση κωδικονίων του βακτηρίου, τότε μπορεί να παρατηρηθούν προβλήματα κατά τη παραγωγή της πρωτεΐνης [168]. Τέτοια προβλήματα μπορεί να είναι:

- Μειωμένη σταθερότητα του *mRNA* (λόγω καθυστέρησης της μετάφρασης).
- Πρώιμος τερματισμός της μεταγραφής ή/και της μετάφρασης, το οποίο οδηγεί σε παραγωγή πολλών κομματιών της ίδιας πρωτεΐνης.
- Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και της ανάπτυξης του κυττάρου.

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, παρατηρείται μειωμένη ή ακόμα και μηδενική παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης. Ειδικά όταν τα σπάνια κωδικόνια βρίσκονται στο 5'-άκρο του *mRNA* ή σε συστάδες, τότε τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης είναι χαμηλά και παράγονται περικεκομμένες μορφές της πρωτεΐνης [169, 170].

Τα επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης μπορούν όμως να βελτιωθούν με:

- Αλλαγή του δεύτερου κωδικονίου: Η επιλογή του κατάλληλου κωδικονίου στη δεύτερη τριπλέτα μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα έκφρασης με έως και 15-φορές αύξηση [171].
- Συν-έκφραση του επιθυμητού γονιδίου με γονίδια που κωδικοποιούν έναν αριθμό σπάνιων κωδικονίων: Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα στελέχη *E. coli* που φέρουν πλασμίδια τα οποία τους προσδίδουν αυτή την ιδιότητα (Πίνακας 8) [168].

Πίνακας 8: Εμπορικά διαθέσιμα στελέχη *E. coli* που παράγουν *tRNAs* για σπάνια κωδικόνια [168].

Στελέχη <i>E. coli</i>	Σπάνια κωδικόνια
<i>BL21 (DE3) CodonPlus-RIL</i>	Αργινίνη (AGG, AGA), ισολευκίνη (AUA) και λευκίνη (CUA)
<i>BL21 (DE3) CodonPlus-RP</i>	Αργινίνη (AGG, AGA) και προλίνη (CCC)
<i>Rosetta</i> ή <i>Rosetta (DE3)</i>	Αργινίνη (AGG/AGA), Αργινίνη (CGG), ισολευκίνη (AUA), λευκίνης (CUA), προλίνη (CCC), και γλυκίνη (GGA)

- Αντικατάσταση των σπάνιων κωδικονίων σε όλο το γονίδιο με άλλα πιο φιλικά για την *E. coli* [169]: Πολλές εταιρείες δίνουν τη δυνατότητα σύνθεσης της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για την επιθυμητή πρωτεΐνη με αντικατάσταση όλων των σπάνιων κωδικονίων με άλλα πιο φιλικά προς την *E. coli*. Επιπλέον έχουν αναπτυχθεί αλγόριθμοι ώστε να βελτιώνονται και άλλα στοιχεία που βοηθούν και στη σταθερότητα του *mRNA* όπως το περιεχόμενο σε *GC*, οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, μοτίβα αποσταθεροποίησης του *RNA* κ.α.

4.1.1.1.2. Δημιουργία συσσωματωμάτων και έγκλειστων σωμάτων

Σε πολλές περιπτώσεις η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι αδιάλυτη και συσσωρεύεται στα έγκλειστα σώματα. Αυτό μπορεί να συμβαίνει για διάφορους λόγους, όπως ο υψηλός ρυθμός έκφρασης του γονιδίου, η παρουσία σπάνιων κωδικονίων, η παραγωγή της πρωτεΐνης πριν την προσθήκη του επαγωγέα της υπερέκφρασης και η τοξικότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη όταν βρίσκεται σε έγκλειστα σώματα, έχει χάσει τη φυσιολογική τριτοταγή της διαμόρφωση και η ανάκτηση της μπορεί να επιτευχθεί μόνο με αποδιάταξη και επαναδιάταξη της πρωτεΐνης. Η διαδικασία αυτή είναι συνήθως ανεπιτυχής για πρωτεΐνες με μεγάλη μοριακή μάζα [168]. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι που βελτιώνουν τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης, όπως:

- Μείωση του ρυθμού της πρωτεϊνικής σύνθεσης

Η μείωση του ρυθμού της σύνθεσης πρωτεϊνών και η παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης μπορεί να επιτευχθεί με τη μείωση της θερμοκρασίας κατά την επαγωγή της υπερέκφρασης, με τη χρήση άλλου υποκινητή, με χρήση πλασμιδίου με χαμηλά αντίγραφα (*low copy number*) και με τη μείωση της συγκέντρωσης του επαγωγέα της υπερέκφρασης [168].

- Η επιλογή της κατάλληλης σύστασης του θρεπτικού υλικού

Η προσθήκη διαφόρων παραγόντων στο θρεπτικό υλικό, όπως αναστολείς ή συμπαράγοντες της πρωτεΐνης στόχου, μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη διαλυτότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Επιπλέον, η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος στο θρεπτικό, εξασφαλίζει την σταθερότητα του *pH* κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων και την παραγωγή της πρωτεΐνης.

Επιπλέον, τα θρεπτικά υλικά που διαφέρουν ως προς την σύσταση τους στα κοινά συστατικά όπως, *NaCl*, τρυπτόνη και εκχύλισμα ζύμης (*LB*, *2xYT*, *TB*) μπορεί να δώσουν διαφορετικά αποτελέσματα ως προς τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης [172].

- Συν-έκφραση με μοριακές συνοδούς

Οι πρωτεΐνες αρχικά παράγονται από το ριβόσωμα ως γραμμικές αμινοξικές αλληλουχίες οι οποίες στη συνέχεια αναδιπλώνονται ώστε να αποκτήσουν την τριτοταγή τους διαμόρφωση και να ασκήσουν τις βιολογικές του δράσεις. Οι μικρές πρωτεΐνες έχουν την τάση να αναδιπλώνονται γρήγορα, ενώ οι μεγάλες πρωτεΐνες χρειάζονται περισσότερο χρόνο και είναι τελικά πιθανό να μην αναδιπλωθούν *in vitro*. Η αναδίπλωση πρωτεϊνών σε κυτταρικό επίπεδο είναι ακόμα πιο δύσκολη γιατί το κύτταρο αποτελεί ένα ασφυκτικό περιβάλλον όπου συνωστίζονται πολλές πρωτεΐνες. Η διατήρηση της σωστής δομής όλων των πρωτεϊνών είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο, καθώς βλάβες σε αυτόν το μηχανισμό μπορεί να οδηγήσουν σε πολλά προβλήματα, όπως η δημιουργία αμυλοειδών η οποία ευθύνεται για πολλές ασθένειες όπως ο ΣΔ2 και η ασθένεια του *Parkinson*. Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που βοηθούν τις πρωτεΐνες να αποκτήσουν τη σωστή τους διαμόρφωση ή διορθώνουν τις μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Οι μοριακές συνοδοί (*chaperones*) είναι πρωτεΐνες οι οποίες διεκπεραιώνουν τέτοιες διεργασίες στο κύτταρο συχνά με την κατανάλωση ενέργειας (*ATP*) [173]. Η συν-έκφραση με μοριακές συνοδούς όπως η *Trigger factor* και οι *GroES/EL* έχει οδηγήσει με επιτυχία σε παραγωγή λειτουργικών πρωτεϊνών φαρμακευτικού ενδιαφέροντος, μεταξύ των οποίων και η *bGP* [54], με αυξημένη σταθερότητα και μειωμένη τάση δημιουργίας συσσωματωμάτων [174-177].

Παρότι η συν-έκφραση με μοριακές συνοδούς έχει αποδείξει ότι μπορεί να συνεισφέρει στην παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης, η εφαρμογή αυτής της μεθοδολογίας μπορεί να έχει και κάποιες παρενέργειες για την πρωτεΐνη στόχο όπως η πρωτεόλυση, η μείωση της απόδοσης και η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των βακτηρίων. Δεδομένου ότι στη βιβλιογραφία σπάνια αναφέρονται περιπτώσεις αποτυχίας της εφαρμογής μιας μεθόδου, ενδεχομένως η συν-έκφραση με μοριακές συνοδούς να μη μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε περίπτωση [178]. Επιπλέον, σε μελέτη του 2009 φάνηκε ότι αυτή η μεθοδολογία μπορεί να οδηγεί σε μια φαινομενική αύξηση της διαλυτότητας πρωτεϊνικών κινασών, ενισχύοντας όμως την παραγωγή διαλυτών συσσωματωμάτων οδηγώντας όμως και πάλι σε μια μικρή αύξηση της απόδοσης. Επομένως, η παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης με συν-έκφραση με μοριακές

συνοδούς μπορεί να οφείλεται σε αύξηση των διαλυτών συσσωματωμάτων και όχι λειτουργικής πρωτεΐνης [179].

- Χρήση συγκεκριμένων στελεχών *E. coli*

Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα στελέχη *E. coli* τα οποία οδηγούν σε αυξημένη διαλυτότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης η οποία περιέχει δισουλφιδικούς δεσμούς. Το στέλεχος *Origami* (*Novagen*) έχει δύο μεταλλάξεις στα γονίδια *trxB* και *gor* και η χρήση αυτού του στελέχους έχει οδηγήσει σε σημαντική αύξηση της ποσότητας διαλυτής πρωτεΐνης με δισουλφιδικούς δεσμούς [172, 180].

- Δημιουργία χιμαιρικής πρωτεΐνης

Έχει παρατηρηθεί ότι η σύζευξη της επιθυμητής πρωτεΐνης με μια άλλη πρωτεΐνη, όπως η *GST* (211 aa, 26 kDa), η *MBP* (396 aa, 43 kDa), η *SUMO* (~100 aa, ~ 11 kDa) ή η *Fh8* (69 aa, 8 kDa), μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αύξηση των επιπέδων της διαλυτής πρωτεΐνης. Επιπλέον, οι παραπάνω πρωτεΐνες λειτουργούν και ως ετικέτες συγγένειας οδηγώντας σε απομόνωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης σε υψηλή καθαρότητα. Ωστόσο, η τελική μοριακή μάζα της παραγόμενης πρωτεΐνης, μπορεί να αποτελέσει τροχοπέδη καθώς οι πρωτεΐνες με μεγάλο μοριακό βάρος αναδιπλώνονται πιο δύσκολα. Επειδή η χιμαιρική πρωτεΐνη δεν αποτελεί τη φυσική μορφή της πρωτεΐνης, συνήθως η ετικέτα συγγένειας αποκόβεται με τη χρήση πρωτεασών (*3C*, *TEV*) που αναγνωρίζουν και πρωτεολύουν συγκεκριμένα αμινοξικά αλληλουχία μεταξύ της πρωτεΐνης στόχου και της ετικέτας συγγένειας (Βλ. παράγραφο 4.1.4) [181].

- Δημιουργία μικρότερων κατασκευών του γονιδίου

Όπως αναφέρθηκε, μια πρωτεΐνη με μεγάλη μοριακή μάζα είναι δύσκολο να αναδιπλωθεί στο *E. coli* και πολλές φορές δημιουργούν συσσωματώματα. Η δημιουργία κατασκευών που θα παράγουν μικρότερα κομμάτια της πρωτεΐνης είναι μια μεθοδολογία που ακολουθείται συχνά όταν δεν έχει επιτύχει κάτι από τα παραπάνω. Όταν μια μεγάλη πρωτεΐνη αποτελείται από υπομονάδες, τότε εκτός από τις περικεκομμένες μορφές, μπορούν να μελετηθούν οι υπομονάδες ξεχωριστά [172].

- Αναδίπλωση της πρωτεΐνης στον περιπλασματικό χώρο του *E. coli* ή/και έκκριση της στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης

Ο περιπλασματικός χώρος βρίσκεται μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου. Φυσιολογικά, πρωτεΐνες που φέρουν κατάλληλη σηματοδοτική αλληλουχία μεταφέρονται στο περίπλασμα για να αναδιπλωθούν και η μεθοδολογία αυτή έχει

χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο περίπλασμα φέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα με το βασικότερο να είναι το οξειδωτικό περιβάλλον. Το περιβάλλον αυτόν επιτρέπει τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, κάτι το οποίο δεν ευνοείται στο αναγωγικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος. Το περίπλασμα διαθέτει επίσης δύο αναδιπλωδάσες (*foldases*) την οξειδοαναγωγή πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών [*disulfide oxidoreductase (DsbA)*] και την ισομεράση πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών [*disulfide isomerase (DsbC)*], οι οποίες καταλύουν τη δημιουργία και τον ισομερισμό των δισουλφιδικών δεσμών [182, 183]. Επιπλέον, η αναδίπλωση πρωτεϊνών στο περίπλασμα ευνοεί τη παραγωγή πρωτεϊνών που είναι τοξικές για το βακτήριο όταν βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Άλλα πλεονεκτήματα της παραγωγής πρωτεϊνών στον περιπλασματικό χώρο αποτελούν η μειωμένη πρωτεόλυση συγκριτικά με το κυτταρόπλασμα, η αυξημένη σταθερότητα και δραστηριότητα της πρωτεΐνης, η μείωση των συσσωματωμάτων καθώς και έκκριση της πρωτεΐνης στο θρεπτικό υλικό [183]. Η πρωτεΐνη που παράγεται στο περίπλασμα είναι πιο εύκολο να απομονωθεί σε καθαρή μορφή γιατί στο περίπλασμα υπάρχουν λιγότερες πρωτεΐνες από το κυτταρόπλασμα και δεν ακολουθείται η κλασική μεθοδολογία βακτηριακής λύσης με υπερήχους αλλά η ωσμωτική λύση η οποία διαρρηγνύει την εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων. Με αυτό τον τρόπο οι πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. [183] Για να μπορέσει μια πρωτεΐνη να εκκριθεί στο περίπλασμα θα πρέπει να φέρει στο N-τελικό της άκρο, μια σηματοδοτική αλληλουχία που θα την κατευθύνει στο περίπλασμα. Στην αγορά, υπάρχουν διαθέσιμοι πλασμιδιακοί φορείς οι οποίοι προσδίδουν στη πρωτεΐνη τέτοιες σηματοδοτικές αλληλουχίες (*pET26b*, *pET22b* κ.α.). Το βασικό μονοπάτι που χρησιμοποιείται με αυτές τις σηματοδοτικές αλληλουχίες, είναι αυτό της *SecA*. Συνοπτικά, σύμφωνα με αυτό το μονοπάτι, η νέο-συντιθέμενη αλυσίδα που παράγεται από τα ριβοσώματα, συνδέεται με την *trigger factor* η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη στο τούνελ εξόδου του ριβοσώματος. Έπειτα η *SecB* συνδέεται με τη νέο-συντιθέμενη αλυσίδα, δεν την αφήνει να αναδιπλωθεί και την μεταφέρει στο σύστημα μεταφοράς *SecA*. Τότε, η προ-πρωτεΐνη λόγω της σηματοδοτικής αλληλουχίας, συνδέεται με την *SecA* ώστε να ξεκινήσει η μεταφορά της στο περίπλασμα και αφού ολοκληρωθεί, αναδιπλώνεται και η σηματοδοτική αλληλουχία αποκόβεται [184]. Η διαδικασία αποκοπής της N-τελικής αλληλουχίας οδηγού οδηγεί και στην απομάκρυνση της πρώτης *Met* με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να μπορεί να μελετηθεί στη φυσιολογική της μορφή (όταν η *Met* αποκόπτεται φυσιολογικά στις ευκαρυωτικές πρωτεΐνες). Οι πιο συχνές αλληλουχίες που χρησιμοποιούνται μεταξύ άλλων είναι οι *pelB* (***MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA***) και *ompT*

(*MRAKLLGIVLTTPIAISSFA*) χωρίς όμως να υπάρχει κάποιος τρόπος να επιλεγεί η βέλτιστη, παρά μόνο η δοκιμή [185]. Ωστόσο, η εύρεση της κατάλληλης αλληλουχίας μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές διαφορές στην ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης [186]. Τυπικά οι σηματοδοτικές αλληλουχίες αποτελούνται από μια υδρόφοβη περιοχή περίπου 10-20 αμινοξέων η οποία βρίσκεται στο μέσο της αλληλουχίας, μια θετικά φορτισμένη περιοχή στην αρχή (επισημαίνεται με έντονη γραφή) και μια περιοχή στο τέλος, συνήθως λιγότερο υδροφοβική, η οποία περιέχει το σήμα που αναγνωρίζεται από την πεπτιδάση ώστε να αποκοπεί η σηματοδοτική αλληλουχία και να προκύψει η ώριμη πρωτεΐνη (επισημαίνεται με υπογράμμιση) [185].

Σημαντικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου αποτελεί ο χρόνος που χρειάζεται ώστε να μεταφερθεί η πρωτεΐνη στο περίπλασμα. Πολλές πρωτεΐνες μπορεί να προλάβουν να αναδιπλωθούν στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα να μη μπορούν να μεταφερθούν έπειτα στο περίπλασμα [184]. Ωστόσο, πρωτεΐνες φαρμακευτικού ενδιαφέροντος έχουν απομονωθεί με τη χρήση αυτού του συστήματος, όταν οι υπόλοιπες μέθοδοι είχαν αποτύχει. Παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης [187] αλλά και πολλών άλλων πρωτεϊνών που αναφέρονται στην ανασκόπηση των *Mergulhao* και συνεργατών [184]. Πρωτεΐνες που μεταφέρονται στο περίπλασμα μέσω του μονοπατιού *SecA* μπορούν να εκκριθούν στο θρεπτικό υλικό παρουσία *γλυκίνης*, *Triton X-100* και σουκρόζης καθώς οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν τη διαπερατότητα ή την ακεραιότητα της μεμβράνης του κυττάρου. Η έκκριση πρωτεϊνών στο εξωκυττάριο υγρό με αυτή τη μέθοδο έχει οδηγήσει σε έως και 170 φορές αύξηση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης [188-190]. Αυτή η μέθοδος μπορεί να οδηγεί σε σημαντικά αποτελέσματα αλλά πρέπει να ελέγχεται η βιωσιμότητα των κυττάρων καθώς και το αν έχει αποκοπεί η σηματοδοτική αλληλουχία μετά τη μεταφορά στον περιπλασματικό χώρο.

- Αυστηρή ρύθμιση της έναρξης της έκφρασης του γονιδίου

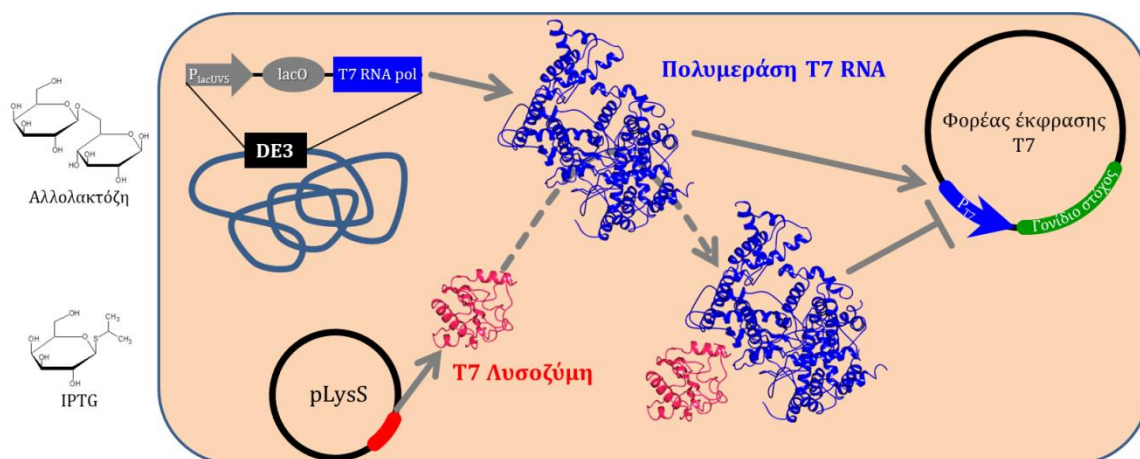
Το πιο γνωστό σύστημα για την παραγωγή πρωτεϊνών στο *E. coli* βασίζεται στη γνωστή λειτουργία του οπερονίου της λακτόζης. Απουσία λακτόζης, μια πρωτεΐνη καταστολέας (*LacI*) προσδένεται στο χειριστή οπερονίου της λακτόζης και το οπερόνιο δεν ενεργοποιείται αφού η πολυμεράση δεν μπορεί να ασκήσει τη δράση της. Όταν βρεθεί λακτόζη στο θρεπτικό μέσο, τότε ισομεριώνεται σε αλλολακτόζη η οποία προσδένεται στον καταστολέα και το σύμπλοκο δεν μπορεί να συνδεθεί στο χειριστή του οπερονίου και τότε, η πολυμεράση *RNA* είναι ελεύθερη να ξεκινήσει τη μεταγραφή του οπερονίου [12]. Στελέχη *E. coli*, όπως τα *BL21 (DE3)*,

έχουν τροποποιηθεί ώστε να έχουν στο χρωμόσωμα τους το γονίδιο για την παραγωγή της πολυμεράσης *T7 RNA* του βακτηριοφάγου λ κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του οπερονίου της λακτόζης (*LacUV5*) αλλά και του χειριστή (*LacO*). Η πολυμεράση *T7 RNA* έχει υψηλό ρυθμό λειτουργίας και υψηλή εξειδίκευση ως προς τον υποκινητή της ο οποίος δεν υπάρχει φυσιολογικά στο *E. coli*. Αυτός ο υψηλός ρυθμός λειτουργίας έχει φανεί ότι μειώνει τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων της *E. coli* μάλλον λόγω ανταγωνισμού των δύο πολυμερασών για τις πρώτες ύλες για παραγωγή *RNA* και κατ' επέκταση των πρωτεϊνών. Επίσης, τα υψηλά ποσοστά του *RNA* του εκφραζόμενου γονιδίου στόχου, καταλαμβάνουν σχεδόν όλα τα διαθέσιμα ριβοσώματα. Ως εκ τούτου, το ποσοστό της παραγωγής μιας πρωτεΐνης στόχου με το σύστημα της πολυμεράσης *T7 RNA* μπορεί να αποτελέσει το 50 % ή και περισσότερο συγκριτικά με το σύνολο των πρωτεϊνών του βακτηρίου. Επομένως, η τελική απόδοση του συστήματος για την παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης ρυθμίζεται από την ευκολία με την οποία το *mRNA* μπορεί να μεταφραστεί από τα ριβοσώματα [191, 192]. Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιούνται για την έκφραση των γονιδίων στόχων με αυτό το σύστημα ελέγχονται από υποκινητές που αναγνωρίζονται εξειδικευμένα από την πολυμεράση *T7 RNA*. Επομένως, η ενεργοποίηση του συστήματος οδηγεί σε παραγωγή της πολυμεράσης *T7 RNA* και κατ' επέκταση την έκφραση του γονιδίου στόχου. Αντί της αλλολακτόζης, ως επαγωγέας της έκφρασης του γονιδίου στόχου χρησιμοποιείται το *IPTG* (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) [192] το οποίο δεν αποικοδομείται με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή του να μένει σταθερή κατά την υπερέκφραση του γονιδίου στόχου (Εικόνα 25).

Ένα συχνό πρόβλημα με τους υποκινητές *T7* είναι η μεταγραφή του γονιδίου πριν την προσθήκη του *IPTG* (διαρρέον πλασμίδιο). Το φαινόμενο αυτό, ειδικά όταν η πρωτεΐνη είναι τοξική, μπορεί να οδηγήσει την πρωτεΐνη σε έγκλειστα σώματα. Η λακτόζη που υπάρχει στα θρεπτικά υλικά μπορεί πολλές φορές να επιφέρει αυτό το αποτέλεσμα το οποίο αντιμετωπίζεται κυρίως με τρεις τρόπους.

- a) Επιλογή φορέα κλωνοποίησης του επιθυμητού γονιδίου ο οποίος φέρει αλληλουχία για παραγωγή του αναστολέα του υποκινητή του γονιδίου στόχου (*T7lac*) και του υποκινητή της πολυμεράσης *T7 RNA* (*LacUV5*) [193].
- b) Χρήση στελεχών της *E. coli*, όπως τα *pLysS*: Τα κύτταρα αυτά φέρουν πλασμίδιο το οποίο παράγει την *T7* λυσοζύμη η οποία προσδένεται στην πολυμεράση *T7* και την αναστέλλει. Έτσι, όταν προστεθεί το *IPTG*, τότε αυτή η αναστολή αίρεται και ξεκινάει η μεταγραφή του γονιδίου στόχου (Εικόνα 25) [193, 194].

- c) Προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό: Όταν τα βακτήρια αναπτύσσονται παρουσία λακτόζης και γλυκόζης, τότε καταναλώνουν πρώτα τη γλυκόζη για την ανάπτυξη τους με αποτέλεσμα να μην ενεργοποιείται η παραγωγή της πολυμεράσης T7 [194, 195].



Εικόνα 25: Παραγωγή πρωτεϊνών σε βακτηριακά στελέχη E. coli DE3.

- Χρήση παραγόντων που ενισχύουν τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων.

Το γεγονός ότι μια πρωτεΐνη μπορεί να εντοπίζεται στα έγκλειστα σώματα, αυτό δεν οφείλεται κάθε φορά σε προβλήματα κατά τη διαδικασία της μετάφρασης. Ορισμένες φορές οι συνθήκες λύσης των βακτηριακών κυττάρων όπως το *pH*, η ιοντική ισχύς του διαλύματος λύσης, η παρουσία σταθεροποιητών και απορρυπαντικών μπορεί να βοηθήσουν στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης αποτρέποντας τη μετουσίωση της. Επομένως, με τη χρήση διαφόρων διαλυμάτων λύσης μια πρωτεΐνη μπορεί να βρεθεί στο διαλυτό κλάσμα μετά την λύση των βακτηριακών κυττάρων [196].

4.1.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

4.1.3. Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (FPLC)

Παλαιότερα η διαδικασία της απομόνωσης μιας πρωτεΐνης αποτελούσε μια αρκετά επίπονη διαδικασία καθώς δεν υπήρχαν τα μέσα που υπάρχουν σήμερα στη διάθεση μας. Συνήθως βασιζόταν στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης, όπως η τιμές του *pH* που μένει σταθερή, οι θερμοκρασίες αλλά και οι ποσότητες άλατος που μπορούν ή όχι να την καταβυθίσουν. Επιπλέον, η εφαρμογή χρωματογραφίας όπως η ιοντοανταλλαγή και η μοριακή διήθηση αποτελούσαν και αποτελούν βήματα για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως και στην απομόνωση της *rmGPb* από σκελετικούς μύες κονίκλων, ο καθαρισμός και η απομόνωση του ενζύμου στηρίζονται αποκλειστικά στα

φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης αλλά και στην ικανότητα της να κρυσταλλώνεται σε συνθήκες που άλλες πρωτεΐνες δεν μπορούν (βλ. παράγραφο 4.5.1). Σήμερα η ανάπτυξη της χρωματογραφίας και ιδιαίτερα της χρωματογραφίας συγγένειας έχει οδηγήσει στον καθαρισμό πολλών πρωτεϊνών, των οποίων ο καθαρισμός δεν μπορούσε να επιτευχθεί προηγουμένως. Μεγάλο βοήθημα αποτελεί η ανάπτυξη συστήματος για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών από την εταιρεία *Pharmacia LKB* το 1982. Από τότε μέχρι σήμερα, το σύστημα *ÄKTA FPLC* αποτελεί το πιο αυτοματοποιημένο και σύγχρονο εργαλείο για τον επιτυχή καθαρισμό πρωτεϊνών [197].

Ο καθαρισμός μιας πρωτεΐνης από ένα μίγμα πρωτεϊνών ακολουθεί στη βάση του κοινή μεθοδολογία. Τα βακτηριακά κύτταρα διαλυτοποιούνται σε ένα διάλυμα λύσης, λύονται με εφαρμογή εφαρμογή υπερήχων και έπειτα το διαλυτό κλάσμα παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση. Η στήλη εξισορροπείται με ένα διάλυμα, συνήθως παρόμοιο ή όμοιο με το διάλυμα λύσης, και το διαλυτό κλάσμα εφαρμόζεται στη στήλη. Οι πρωτεΐνη στόχος συνδέεται στη στήλη είτε λόγω συγγένειας είτε λόγω φορτίου και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες διαφεύγουν και δεν προσδένονται (*flow through*). Έπειτα, η στήλη πλένεται με το ίδιο διάλυμα ώστε να απομακρυνθούν οι μη ειδικά ή ασθενώς προσδεδεμένες πρωτεΐνες. Τέλος, η πρωτεΐνη στόχος εκλύεται από τη στήλη με αλλαγή στις συνθήκες του διαλύματος όπως η αλλαγή του pH, η αύξηση ή μείωση της ιοντικής ισχύος, η προσθήκη κάποιου παράγοντα που ανταγωνίζεται τη πρωτεΐνη για σύνδεση στο υλικό της στήλης κ.α.. Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά τα ήδη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

4.1.3.1. Χρωματογραφία συγγένειας (AC)

Αυτός ο τύπος χρωματογραφίας βασίζεται στην υψηλής εξειδίκευσης βιο-αναγνώριση μεταξύ δύο παραγόντων, όπως ένα ένζυμο με το υπόστρωμα του ή έναν αναστολέα. Το υλικό της μήτρας, το οποίο είναι σφαιρίδια σεφαρόζης ή αγαρόζης, συνδέεται συνήθως ομοιοπολικά με έναν προσδέτη που αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη στόχο.

- Χρωματογραφία συγγένειας με ακινητοποιημένα δισθενή ιόντα μετάλλων (IMAC): Τα δισθενή ιόντα μετάλλων όπως Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} εμφανίζουν συγγένεια με τις ιστοδίνες. Επομένως, ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παράγονται με μια ετικέτα ιστοδινών (συνήθως 6) μπορούν να συνδεθούν σε μια τέτοια στήλη και να απομακρυνθούν με προσθήκη ιμιδαζολίου το οποίο είναι όμοιο με τον δακτύλιο της ιστοδίνης [198].

- Χρωματογραφία συγγένειας με ακινητοποιημένη β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD): Η β-CD ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης 6B έχει χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό του *ScGDE* σε ένα μόνο βήμα [199]. Αυτό το υλικό δεν πωλείται στην τελική του μορφή και πρέπει να παρασκευάζεται με χρήση *epoxy-activated sepharose 6B* (βλ. παράγραφο 4.3) [199, 200].

4.1.3.2. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι η πιο κλασική μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών. Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι μια πρωτεΐνη έχει μηδέν καθαρό φορτίο στο ισοηλεκτρικό της σημείο. Η πρωτεΐνη μπορεί να αποκτήσει θετικό ή αρνητικό φορτίο αν βρεθεί σε διάλυμα με τιμή *pH* κάτω ή πάνω από το ισοηλεκτρικό της σημείο αντίστοιχα. Στη χρωματογραφία ανιοανταλλαγής, το υλικό της στήλης είναι φορτισμένο θετικά και οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες μπορούν να συνδέονται και να απομακρύνονται με αύξηση της συγκέντρωσης άλατος (*NaCl*, *KCl*) [201].

4.1.3.3. Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (SEC)

Η SEC διαχωρίζει πρωτεΐνες με βάση τη διαφορά στο μοριακό τους βάρος. Σε αντίθεση με την AC και IEC οι πρωτεΐνες δεν προσδένονται στο υλικό της στήλης και επομένως δεν υπάρχει κάποιος σημαντικός περιορισμός ως προς το διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί (πχ συμπράγοντες, μέταλλα, απορρυπαντικά, άλατα). Το υλικό της SEC αποτελείται από πορώδη σφαιρίδια με ικανότητα να ελαχιστοποιούν την προσρόφηση βιομορίων. Το υλικό εξισορροπείται με διάλυμα ώστε να γεμίσουν οι πόροι του υλικού και ο χώρος μεταξύ των σφαιριδίων με το επιθυμητό διάλυμα. Οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους δεν περνούν από τους πόρους των σφαιριδίων και έτσι εξέρχονται πρώτες από τη στήλη. Επιπλέον, τυχόν συσσωματώματα της πρωτεΐνης απομακρύνονται στο νεκρό όγκο της στήλης λόγω του μεγάλου μοριακού τους βάρους. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους, διέρχονται από τους πόρους των σφαιριδίων και καθυστερούν να εξέλθουν από τη στήλη [202].

4.1.4. Αποκοπή της ετικέτας συγγένειας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Οι ετικέτες συγγένειας, όπως αναφέραμε και παραπάνω, χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών. Ωστόσο, για να μελετηθεί η πρωτεΐνη στη φυσιολογική της μορφή, συνήθως οι ετικέτες αυτές αποκόπτονται με τη βοήθεια πρωτεασών. Οι πρωτεάσες αυτές αναγνωρίζουν και πρωτεολύουν συγκεκριμένες αμινοξικές αλληλουχίες που βρίσκονται μεταξύ της πρωτεΐνης και της ετικέτας συγγένειας. Επιπλέον, οι ανασυνδυασμένες αυτές

πρωτεάσες φέρουν και οι ίδιες ετικέτες συγγένειας, συνήθως όμοιες με της πρωτεΐνης στόχου, ώστε η κομμένη πρωτεΐνη να μπορέσει να διαχωριστεί από την άκοπη και την πρωτεάση [203].

4.1.4.1. Οι πρωτεάσες 3C και TEV.

Η πρωτεάση TEV αναγνωρίζει και πρωτεολύει την αλληλουχία *Glu-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln↓Ser/Gly*, με το Xaa να εκφράζει οποιοδήποτε αμινοξύ. Η πρωτεάση 3C αναγνωρίζει και πρωτεολύει την αμινοξική αλληλουχία *Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro* [204]. Τόσο η TEV όσο και η 3C κυκλοφορούν στην αγορά τόσο με ετικέτα GST, (His)₆ ή και με τις δύο.

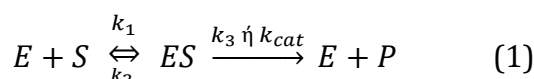
4.1.5. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

4.1.5.1. Το μοντέλο των Michaelis-Menten

Το μοντέλο *Michaelis-Menten* είναι το πλέον γνωστό για την περιγραφή της κινητικής ενός ενζύμου. Το μοντέλο αυτό πήρε το όνομα του από τον βιοχημικό *Michaelis L.*, και την φυσικό *Menten, M.* οι οποίοι πριν από 107 χρόνια έδειξαν ότι η ταχύτητα μιας αντίδρασης που καταλύεται από ένα ένζυμο, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του συμπλόκου του ενζύμου με το υπόστρωμα (ES) [205]. Οι *Michaelis* και *Menten* δεν ήταν αυτοί που μελέτησαν την κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων εξ αρχής αλλά βάδισαν πάνω σε αρκετή δουλειά που είχε γίνει από άλλους επιστήμονες και ειδικά από τον *Victor Henri*. Ο *Henri, V.*, προσπάθησε πρώτος να αναλύσει την πορεία μιας ενζυμικής αντίδρασης ως προς τον χρόνο και διατύπωσε μια σχέση η οποία είναι ανάλογη της εξίσωσης των *Michaelis-Menten*. Παρ' ότι ο *Henri* εισήγαγε την εξίσωση για την αρχική ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης, δεν την χρησιμοποίησε ποτέ [206]. Έτσι λοιπόν, οι *Michaelis* και *Menten* ήταν οι πρώτοι οι οποίοι αναγνώρισαν τα πλεονεκτήματα που θα μπορούσαν να προκύψουν από αυτή την ανάλυση. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα είναι η εξάλειψη όλων των επιπλοκών που οφείλονται στην εξέλιξη της αντίδρασης, όπως είναι η αναστολή από συσσωρευμένο προϊόν, η απώλεια της καταλυτικής δραστηριότητας και η αλλαγή των ιδιοτήτων του προϊόντος το οποίο προσδιορίζεται (πχ η μετατροπή της α-D-γλυκόζης σε β-D-γλυκόζη). Επιπλέον, η αντίστροφη πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων μπορεί να αγνοηθεί καθώς δεν μπορεί να επιτευχθεί αν δεν συσσωρευτεί αρκετό προϊόν. Σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί επίσης το γεγονός ότι οι εξισώσεις αρχικής ταχύτητας είναι εύκολο να εξαχθούν και να χρησιμοποιηθούν συγκριτικά με τις διαφορικές εξισώσεις. Τέλος, δεν υπάρχει αλλαγή στις πειραματικές συνθήκες, το pH και τη θερμοκρασία την χρονική στιγμή $t = 0$ [206].

Ο *Henri* στα πειράματα που διεξήγαγε με την ιμβερτάση δεν έλαβε υπόψη του την αυθόρμητη μετατροπή της α -D-γλυκόζης σε β -D-γλυκόζη ούτε χρησιμοποίησε κάποιο παράγοντα ώστε να διατηρείται σταθερό το pH στις αντιδράσεις. Για το λόγο αυτό οι *Michaelis-Menten* πραγματοποίησαν πειράματα με την ιμβερτάση σε σταθερό pH και ήταν οι πρώτοι οι οποίοι κατάφεραν να έχουν επαναλήψιμα αποτελέσματα σε μελέτες ενζυμικής κινητικής επισημαίνοντας τον ρόλο του σταθερού pH . Έτσι λοιπόν, οι *Michaelis-Menten* κατάφεραν να φτιάξουν ένα μοντέλο το οποίο εξηγεί ικανοποιητικά την αρχική ταχύτητα μια ενζυμικής αντίδρασης χωρίς η εφαρμογή του μοντέλου να περιορίζεται από πειραματικές συνθήκες, όπως συγκεκριμένα διαλύματα και τιμές του pH [205, 207].

Όμως, εξίσωση η οποία έχει τελικά οριστεί ως *Michaelis-Menten* προέρχεται από την υπόθεση των *Briggs* και *Haldane*, γνωστή ως υπόθεση σταθεροποιημένης κατάστασης (*steady state*). Σύμφωνα με αυτή, αφού τα αντιδρώντα αναμιχθούν αυξάνεται γρήγορα η ταχύτητα με την οποία διασπάται το σύμπλοκο *ES*, φτάνοντας σύντομα την ταχύτητα σχηματισμού του με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια σταθεροποιημένη κατάσταση [67].



Όπου:

- *E*: Ένζυμο.
- *S*: υπόστρωμα.
- *ES*: σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος.
- *P*: προϊόν.
- k_1, k_2 και k_3 είναι οι σταθερές διαστάσεως των αντιδράσεων.

Η εξίσωση των *Michaelis-Menten* με βάση την αρχή της σταθεροποιημένης κατάστασης έχει την μορφή:

$$v = \frac{k_3[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

Όπου:

- E_0 : η αρχική συγκέντρωση του *E*.
- K_M : $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$ και ορίζεται ως η σταθερά *Michaelis-Menten* [67].
- Η μέγιστη ταχύτητα V_{max} ισούται με: $k_3[E_0]$.

Η αντίδραση (1) περιγράφει τη σταθεροποιημένη κατάσταση. Το ES διατηρεί τη συγκέντρωση του σταθερή ενώ παράλληλα υπάρχει μεγάλη μεταβολή των απόλυτων τιμών που αφορούν τις συγκεντρώσεις του υποστρώματος και του προϊόντος. Με άλλα λόγια ισχύει ότι $d[ES]/dt = 0$ [67].

Η σταθερά *Michaelis-Menten* εκφράζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου η αντίδραση εξελίσσεται με ταχύτητα ίση με τη μισή της V_{max} . Επομένως, υψηλή τιμή της K_M εκφράζει μικρή συγγένεια του υποστρώματος για το ένζυμο ενώ αντίθετα, χαμηλή τιμή της K_M εκφράζει υψηλή συγγένεια του υποστρώματος για το ένζυμο καθώς χρειάζεται μικρή συγκέντρωση υποστρώματος ώστε να επιτευχθεί η $V_{max}/2$ [208]. Ο πιο συνήθης τρόπος προσδιορισμού της K_M και της V_{max} αποτελεί η μέθοδος των *Lineweaver-Burk* ή αλλιώς μέθοδος του διπλού αντιστρόφου [209].

Η εξίσωση (2), αν λάβουμε υπόψη ότι $V_{max} = k_3[E_0]$, μπορεί γραφτεί με μορφή διπλού αντιστρόφου ως:

$$\frac{1}{V_{max}} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3)$$

Η εξίσωση αυτή περιγράφει μια γραφική παράσταση όπου στον άξονα yy' τοποθετούνται οι τιμές $1/v$ και στον άξονα xx' οι τιμές $1/[S]$. Το σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα yy' ορίζεται ως $1/V_{max}$ και το αντίστοιχο σημείο με τον xx' ως $-1/K_M$. Τέλος, από την κλίση της ευθείας προκύπτει ο λόγος K_M/V_{max} [67].

4.1.5.2. Κινητική αλλοστερικών ενζύμων

Το φαινόμενο της συνέργειας παρατηρείται σε πολλά ολιγομερή ένζυμα όταν η πρόσδεση ενός μορίου σε κάποια περιοχή πρόσδεσης του ενζύμου, επηρεάζει την αγχιστεία μιας άλλης θέσης πρόσδεσης του ενζύμου για το μόριο. Για να παρατηρηθεί το παραπάνω φαινόμενο θα πρέπει να υπάρχει επικοινωνία μεταξύ των περιοχών πρόσδεσης. Η επικοινωνία αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ένα ένζυμο τα κατάλοιπα είναι σε αρκετά κοντινή απόσταση. Συνεπώς, ακόμα και μικρές αλλαγές στη διαμόρφωση των πλευρικών αλυσίδων κάποιων καταλοίπων της μιας υπομονάδας, μπορούν να μεταφερθούν και να επιφέρουν αλλαγές σε μια μακρινή περιοχή της άλλης υπομονάδας του ενζύμου. Η κινητική των αλλοστερικών ενζύμων δεν ακολουθεί την κλασική κινητική των *Michaelis-Menten* και αντί ορθογώνιας υπερβολής εμφανίζεται σιγμοειδής καμπύλη σε ένα διάγραμμα (ειδικής δραστηριότητας)/[υπόστρωμα]. Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, τα αλλοστερικά ένζυμα ισορροπούν μεταξύ μιας ανενεργής

στερεοδιαμόρφωσης-T και μιας ενεργούς στερεοδιαμόρφωσης-R. Επομένως, η στερεοδιαμόρφωση-T είναι δομικό απόθεμα της στερεοδιαμόρφωσης-R. Η εμφάνιση της σιγμοειδούς καμπύλης οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη προσθήκη υποστρώματος η ισορροπία μετατοπίζεται σταδιακά από την στερεοδιαμόρφωση-T στην R. Αντίθετα, ένα μη αλλοστερικό ένζυμο ή ένα ενεργοποιημένο αλλοστερικό ένζυμο (πχ λόγω της παρουσίας ενεργοποιητή) δεν εμφανίζει σιγμοειδή καμπύλη καθώς το ένζυμο υπάρχει σε μια ενεργή διαμόρφωση [67].

Η εξίσωση του *Hill* χρησιμοποιείται για τη μελέτη των κινητικών παραμέτρων όταν ένα ένζυμο εμφανίζει σιγμοειδή καμπύλη. Το πρότυπο του *Hill* εφαρμόζεται για κάποιο ένζυμο το οποίο έχει όμοιες θέσεις πρόσδεσης για ένα μόριο μεταξύ των οποίων παρατηρείται θετική ομότροπη συνέργεια. Η εξίσωση η οποία περιγράφει το πρότυπο του *Hill* είναι η εξής:

$$\log K_B + n \cdot \log[S] = \log \left(\frac{v}{V_{max}-v} \right)$$

Το διάγραμμα $\log[v/(V_{max}-v)]$ ως προς $\log[S]$, είναι γνωστό ως διάγραμμα του *Hill* και δίνει μια ευθεία γραμμή η οποία τέμνει τον άξονα yy' στο σημείο $-\log K_B$. Η κλίση της ευθείας ονομάζεται συντελεστής του *Hill* και ορίζεται με n . Η κλίση δηλώνει τον ελάχιστον αριθμό σημείων πρόσδεσης ενός μορίου. Όταν $n=1$, τότε δεν παρατηρούνται φαινόμενα συνέργειας. Το διάγραμμα $u_o/[S]$ είναι υπερβολή και το διάγραμμα *Lineweaver-Burk* είναι ευθεία. Όταν $n>1$, παρατηρείται φαινόμενο θετικής συνέργειας και όταν $n<1$ παρατηρείται φαινόμενο αρνητικής συνέργειας. Σε αυτές τις δύο περιπτώσεις το διάγραμμα $u_o/[S]$ είναι σιγμοειδής καμπύλη και το διάγραμμα *Lineweaver-Burk* κυρτή καμπύλη. Το πρότυπο του *Hill* είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται για τη μελέτη της θετικής συνέργειας γιατί η ύπαρξη αρνητικής συνέργειας δεν εξασφαλίζεται [67].

4.1.5.3. Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Μια ενζυμική αντίδραση είναι πιθανό να ανασταλεί είτε από μικρά μόρια τα οποία εμφανίζουν συγγένεια για τον ένζυμο είτε από το προϊόν της αντίδρασης την οποία καταλύουν. Όταν η κινητική ενός ενζύμου ακολουθεί την εξίσωση των *Michaelis-Menten*, θα συνεχίσει να υπακούει σε αυτή τη κινητική ακόμα και όταν βρίσκεται σε αναστολή. Σε αυτή τη περίπτωση οι τιμές των K_M και V_{max} μπορούν να αλλάξουν με αποτέλεσμα να υπολογίζονται νέες τιμές οι οποίες συμβολίζονται ως $K_{M(app.)}$, $V_{max(app.)}$ και ονομάζονται φαινομενικές τιμές (*apparent values*). Οι τιμές των K_M και $K_{M(app.)}$ χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής (K_i) [67].

Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά οι τύποι αναστολής.

- Συναγωνιστική αναστολή: Η $K_{M(\text{app.})}$ αυξάνεται αλλά η $V_{\max(\text{app.})}$ δεν επηρεάζεται. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν αυξηθεί σημαντικά η συγκέντρωση του υποστρώματος, τότε μπορεί να ξεπεραστεί η ανασταλτική επίδραση στην ταχύτητα. Ως εκ τούτου, αυτού του τύπου η αναστολή ορίζεται ως «συναγωνιστική» [210]. Συναγωνιστική αναστολή μπορεί να εμφανιστεί όταν ένα μόριο προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου ή κοντά σε αυτό. Έτσι αποτρέπεται η σύνδεση του υποστρώματος είτε άμεσα (σύνδεση στο καταλυτικό κέντρο) είτε έμμεσα λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης (σύνδεση σε κοντινή θέση του καταλυτικού κέντρου) [67].
- Μη συναγωνιστική αναστολή: Σε αυτή τη περίπτωση η $K_{M(\text{app.})}$ δεν επηρεάζεται και η $V_{\max(\text{app.})}$ μειώνεται. Σε αντίθεση με την συναγωνιστική αναστολή, αυξημένες συγκεντρώσεις υποστρώματος αδυνατούν να άρουν την ανασταλτική επίδραση στην ταχύτητα [210].
- Ανταγωνιστική αναστολή: Σε αυτού του τύπου την αναστολή επηρεάζονται τόσο η K_M όσο και η V_{\max} του ενζύμου και αφορά συνήθως πολύ-υποστρωματικές αντιδράσεις [210].

4.1.5.3.1. Κινητικές μελέτες με δύο αναστολείς

Μελέτες με δύο αναστολείς μπορούν να γίνουν ώστε να προσδιορίσουμε εάν αυτοί οι αναστολείς συνδέονται στο ίδιο κέντρο ή όχι. Εκτός από δύο αναστολείς μπορούν να μελετηθούν δύο ενεργοποιητές ή ένας αναστολέας και ένας ενεργοποιητής. Όπως και πριν, έτσι και εδώ εμφανίζονται οι όροι συναγωνιστική και μη συναγωνιστική αναστολή. Σε αυτή τη περίπτωση η αξιολόγηση γίνεται μέσω των διαγραμμάτων *Dixon* τα οποία κατασκευάζονται τοποθετώντας στον άξονα yy' τις τιμές $1/v$ και στον άξονα xx' τις τιμές της συγκέντρωσης ενός από τους δύο αναστολείς [211, 212]. Με αυτό τον τρόπο, μελετώντας την ενζυμική αντίδραση σε σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος και του ενός αναστολέα, μεταβάλλοντας την συγκέντρωση του άλλου (Βλ. παράγραφο 4.7.1.5), μπορούμε να κατασκευάσουμε διαγράμματα στα οποία οι ευθείες είτε θα τέμνονται είτε θα είναι παράλληλες, ορίζοντας έτσι τον τύπο της αναστολής [212]. Για δύο αναστολείς I και X εάν εμφανίζεται:

- Συναγωνιστική αναστολή: Στο ένζυμο μπορεί να προσδεθεί είτε ο αναστολέας I είτε ο αναστολέας X αλλά ποτέ και οι δύο ταυτόχρονα. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η μίξη των δύο αναστολέων δεν οδηγεί σε μεγαλύτερη αύξηση της

αναστολής συγκριτικά με ότι θα μπορούσε να προκαλέσει ο κάθε ένας αναστολέας. Οι ευθείες που λαμβάνονται από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα σε αυτή τη περίπτωση είναι παράλληλες [212].

- Μη συναγωνιστική αναστολή: Σε αυτή τη περίπτωση υπάρχουν δύο διαφορετικά κέντρα στο ένζυμο όπου μπορούν να συνδεθούν οι διαφορετικοί αναστολείς (I και X). Οι τιμές των σταθερών K_x και K_i προσδιορίζονται μελετώντας τον κάθε αναστολέα ξεχωριστά. Οι ευθείες που θα προκύψουν από το διάγραμμα *Dixon* θα τέμνονται με έναν παράγοντα αλληλεπίδρασης γ ο οποίος μπορεί να υπολογιστεί ως $[I] = -\gamma K_i$ ή $[X] = -\gamma K_x$, ανάλογα με το ποιου αναστολέα η συγκέντρωση μένει σταθερή σε κάθε πείραμα και ποιου μεταβάλλεται. Εάν $\gamma = 1$, τότε οι ευθείες τέμνονται στον άξονα xx' , εάν $\gamma < 1$, τότε οι ευθείες τέμνονται πάνω από τον xx' και εάν $\gamma > 1$, τότε οι ευθείες τέμνονται κάτω από τον xx' [212].

4.1.6. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ-X

4.1.6.1. Μια σύντομη ανασκόπηση στην ιστορία της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών με χρήση ακτίνων-X

Οι ακτίνες-X αποτελούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκος κύματος 0.01 – 10 nm και έτσι είναι ιδανικές για τη μελέτη της δομής μακρομορίων, μιας και ένας τυπικός ομοιοπολικός δεσμός, δηλαδή η πιο κοντινή απόσταση μεταξύ δύο ατόμων, έχει μήκος ~ 0.12 nm [100]. Η εφαρμογή της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X στη μελέτη δομών έχει οδηγήσει στην απονομή πολλών βραβείων Νόμπελ αλλά και σε πολλές σημαντικές επιστημονικές ανακαλύψεις, κάποιες από τις οποίες θα αναλυθούν εν συντομία παρακάτω [213]. Οι ακτίνες-X ανακαλύφθηκαν το 1885 από τον *Wilhelm Röntgen* (βραβείο Νόμπελ το 1901). Το 1912 ο *Max Von Laue*, πρότεινε ότι η χρήση της ακτινοβολίας ακτίνων-X μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της απόστασης μεταξύ των ατόμων σε στερεά υλικά και παράλληλα απέδειξε ότι οι κρύσταλλοι μπορούν να περιθλούν τις ακτίνες-X. Για τη συνεισφορά του, ο *Max Von Laue* βραβεύτηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1914, ενώ το 1915 ο *William Henry Bragg* και ο *William Lawrence Bragg* (πατέρας και υιός) βραβεύτηκαν με το ίδιο βραβείο για την ανάλυση κρυσταλλικών δομών με χρήση ακτίνων-X. Μέχρι τότε όμως, κανείς δεν είχε δείξει ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να αναπτύξουν κρυστάλλους έτσι ώστε να μπορεί να μελετηθεί η δομή τους [213]. Αργότερα, ο *James Batcheller Sumner* (βραβείο Νόμπελ το 1946), σε μελέτες που έκανε στην ουρεάση, έδειξε ότι τα ένζυμα μπορούν να κρυσταλλωθούν [214]. Το 1962 τα βραβεία Νόμπελ που απονεμήθηκαν στη χημεία και στη φυσιολογία ή ιατρική, αποτέλεσαν

δύο κορυφαίες στιγμές στη δομική βιολογία. Οι *John Kendrew* και *Max Perutz* βραβεύτηκαν με το Νόμπελ χημείας για δομικές μελέτες σε σφαιρικές πρωτεΐνες με την μυσσοφαιρίνη να αποτελεί την πρώτη πρωτεΐνη της οποίας προσδιορίστηκε η κρυσταλλική δομή. Επίσης, οι *Francis Crick*, *James Watson* και *Maurice Wilkins* βραβεύτηκαν με το Νόμπελ φυσιολογίας ή ιατρικής για την ίσως πιο γνωστή ανακάλυψη στην ιστορία της κρυσταλλογραφίας, τη δομή του *DNA*. Το 1964 η *Dorothy Hodgkin* βραβεύτηκε με το βραβείο Νόμπελ χημείας για τον προσδιορισμό της δομής της βιταμίνης B12 αλλά μεγάλο της επίτευγμα αποτελεί και ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής της ινσουλίνης έπειτα από 35 χρόνια επίμονης εργασίας. Αυτή θα μπορούσαμε να πούμε ότι ήταν ιστορικά η αρχή στην κρυσταλλογραφία των μακρομορίων, αν και υπήρξαν και άλλες σημαντικές στιγμές. Από τότε μέχρι σήμερα έχουν απονεμηθεί περισσότερα από 15 ακόμα βραβεία Νόμπελ στον τομέα της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X [213]. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X αποτελεί ακόμα και σήμερα την κύρια μεθοδολογία προσδιορισμού δομών μακρομορίων. Εκτός από την κρυσταλλογραφία, μπορούν να εφαρμοστούν και άλλες τεχνικές για τον προσδιορισμό τρισδιάστατων δομών σε υψηλή ευκρίνεια οι οποίες δεν απαιτούν την παραγωγή κρυστάλλων. Τέτοιες μεθοδολογίες είναι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και η κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία οι οποίες όμως έχουν διάφορους περιορισμούς κυρίως σε ότι αφορά τη μοριακή μάζα του μακρομορίου που μελετάται. Επιπλέον, ο τρόπος με τον οποίο προσδιορίζεται η δομή του μακρομορίου διαφέρει ριζικά μεταξύ των τεχνικών με αποτέλεσμα η κάθε τεχνική να εμφανίζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ανάλογα την περίπτωση [215]. Το 2019 είχαν κατατεθεί στην βάση δεδομένων για πρωτεΐνες (*Protein Data Bank, PDB*) 9666 δομές με χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X, 380 δομές με χρήση *NMR* και 1422 δομές με χρήση 3D ηλεκτρονικής μικροσκοπίας [πληροφορίες από την *PDB* www.rcsb.org/stats/growth/xray ή [/nrm](http://www.rcsb.org/stats/growth/nrm) ή [/em](http://www.rcsb.org/stats/growth/em)].

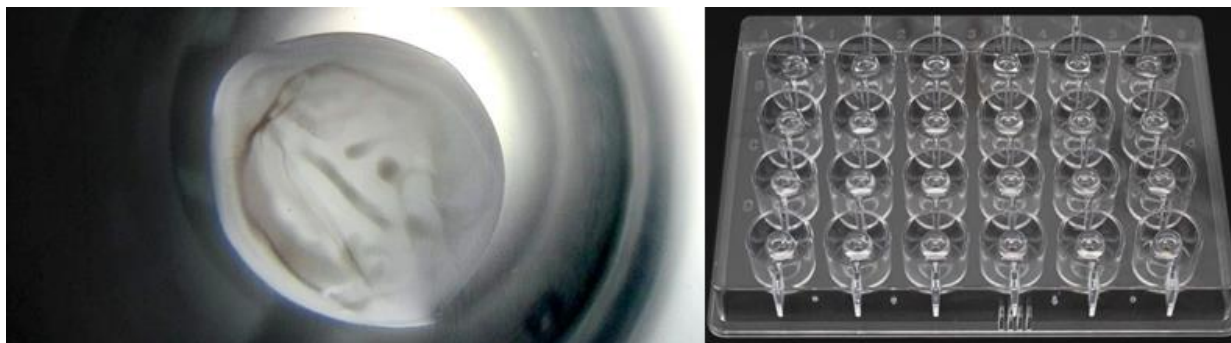
Οι πρωτεϊνικές δομές εκτός του ότι απαντούν βασικά βιολογικά ερωτήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο σχεδιασμό φαρμάκων έναντι συγκεκριμένων στόχων. Η μεγάλη ανάπτυξη της τεχνολογίας επιτρέπει πλέον τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων ακόμα και από εξαιρετικά μικρούς κρυστάλλους σε υψηλή ευκρίνεια μέσα σε λίγα λεπτά με χρήση πηγών συγχροτρονικής ακτινοβολίας. Ωστόσο, η ανάλυση των δεδομένων, δηλαδή ο προσδιορισμός της δομής της πρωτεΐνης μπορεί να είναι ακόμα και σήμερα μια δύσκολη διαδικασία. Βασικός παράγοντας στον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής μιας πρωτεΐνης, είναι προφανώς η ύπαρξη κρυστάλλων. Εάν η ανάλυση των δεδομένων μπορεί να είναι μια

απαιτητική διαδικασία, η παραγωγή κρυστάλλων κατάλληλων για περίθλαση ακτίνων-X σε υψηλή ευκρίνεια (βλ. παρακάτω) μπορεί να αποτελεί μια αρκετά επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία χωρίς να θεωρείται δεδομένη η επιτυχία της.

4.1.6.2. Ανάπτυξη κρυστάλλων πρωτεΐνης

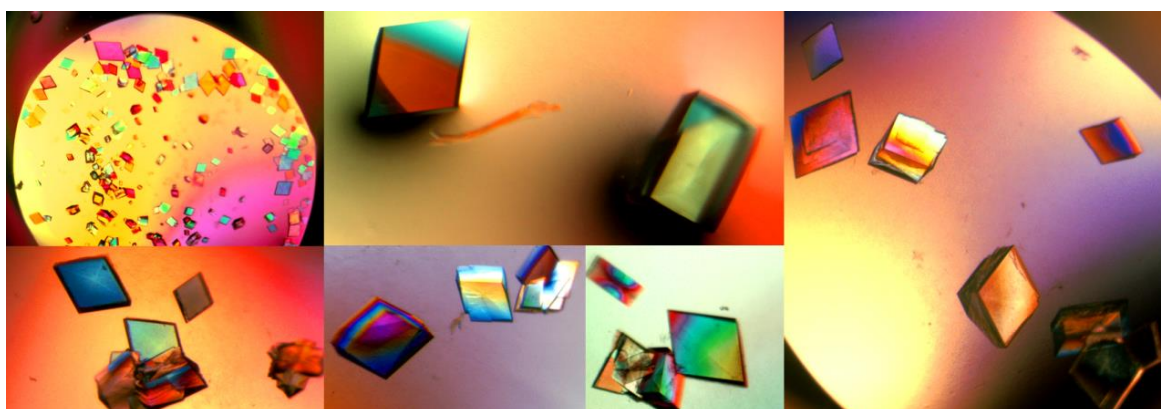
Οι κρύσταλλοι των πρωτεϊνών αναπτύσσονται σε συνθήκες που δεν μετουσιώνουν την πρωτεΐνη, μέσω αργής και ελεγχόμενης καταβύθισης της από ένα υδατικό διάλυμα. Η καταβύθιση της πρωτεΐνης μπορεί να επιτευχθεί από μια σειρά ενώσεων, όπως τα άλατα μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται εξαλάτωση, αλλά και με οργανικούς διαλύτες οι οποίοι όμως ενδέχεται να μετουσιώσουν την πρωτεΐνη. Η πολυαιθυλική γλυκόλη (*PEG*) είναι ένα υδατοδιαλυτό πολυμερές το οποίο χρησιμοποιείται συχνά στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών καθώς είναι ισχυρό καταβυθιστικό αν και αποτελεί έναν ασθενή μετουσιωτικό παράγοντα. Η *PEG* υπάρχει διαθέσιμη σε διάφορα μοριακά βάρη, όπως η *PEG* 400 η οποία έχει μοριακή μάζα 400 *Da*. Ένας τρόπος για να προκληθεί αργή καταβύθιση μιας πρωτεΐνης είναι να προστεθεί ο καταβυθιστικός παράγοντας σε ένα υδατικό διάλυμα, στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη, σε συγκέντρωση ελάχιστα λιγότερη από αυτήν που οδηγεί στην καταβύθιση της πρωτεΐνης. Όταν επιτευχθεί αυτή η συγκέντρωση, τότε, το νερό εξατμίζεται αργά κάτι το οποίο οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης τόσο του παράγοντα καταβύθισης όσο και της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα κάποια στιγμή η πρωτεΐνη να μην είναι πλέον διαλυτή. Σε αυτήν την κατάσταση η πρωτεΐνη μπορεί να καταβυθιστεί δημιουργώντας είτε κρύσταλλο (Εικόνα 27) είτε άμορφο ίζημα (Εικόνα 26) [216]. Η διαδικασία που περιγράφηκε στηρίζεται στην ανάπτυξη κρυστάλλων με μια μεθοδολογία η οποία ονομάζεται διάχυση ατμών και είναι αυτή που ακολουθείται συνήθως στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών. Όπως αναφέραμε, πρέπει να επιτευχθεί μείωση της διαλυτότητας του μακρομορίου για να αναπτυχθούν κρύσταλλοι. Συνήθως, η συνθήκη που θέλουμε να εξετάσουμε εάν μπορεί να οδηγήσει σε κρυστάλλωση της πρωτεΐνης, τοποθετείται σε μια δεξαμενή, στο κέντρο της οποίας υπάρχει θέση για την τοποθέτηση μιας σταγόνας της πρωτεΐνης, χωρίς όμως τα δύο υγρά να έρχονται σε επαφή. Η πρωτεΐνη, αφού αναμιχθεί με μικρή ποσότητα του διαλύματος δεξαμενής (συνήθως σε αναλογία 1:1, 1:2 ή 1:3), τοποθετείται στη συγκεκριμένη θέση στο κέντρο της δεξαμενής και το σύστημα σφραγίζεται με μεμβράνη ώστε να μην υπάρχει επικοινωνία με το εξωτερικό περιβάλλον (Εικόνα 26). Μόρια ύδατος αρχίζουν να απομακρύνονται από τη σταγόνα που περιέχει την πρωτεΐνη (διάχυση ατμών) προς την δεξαμενή έως ότου να εξισορροπηθεί η τάση ατμών του ύδατος στη σταγόνα της πρωτεΐνης και στο διάλυμα της δεξαμενής. Συνήθως

χρησιμοποιούνται ~ 500 - 700 μL διαλύματος δεξαμενής για συνολικά ~ 1 - 5 μL δείγματος πρωτεΐνης ώστε να μην εξατμιστεί εντελώς η σταγόνα που περιέχει την πρωτεΐνη [100].



Εικόνα 26: Αριστερά, Πρωτεΐνη η οποία έχει σχηματίσει ιζήμα αντί για κρύσταλλο. Δεξιά, πιάτο ανάπτυξης κρυστάλλων μέσω διάχυσης ατμών.

Ο σχηματισμός πρωτεϊνικού κρυστάλλου ή άμορφου ιζήματος εξαρτάται από μια πληθώρα παραγόντων όπως η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η ιοντική ισχύς και το pH του διαλύματος αλλά και η θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η ανάπτυξη κρυστάλλων. Συνήθως, χρειάζονται αρκετές προσπάθειες προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι πρωτεΐνης καλής ποιότητας και κατάλληλοι για περίθλαση ακτίνων-X [216].



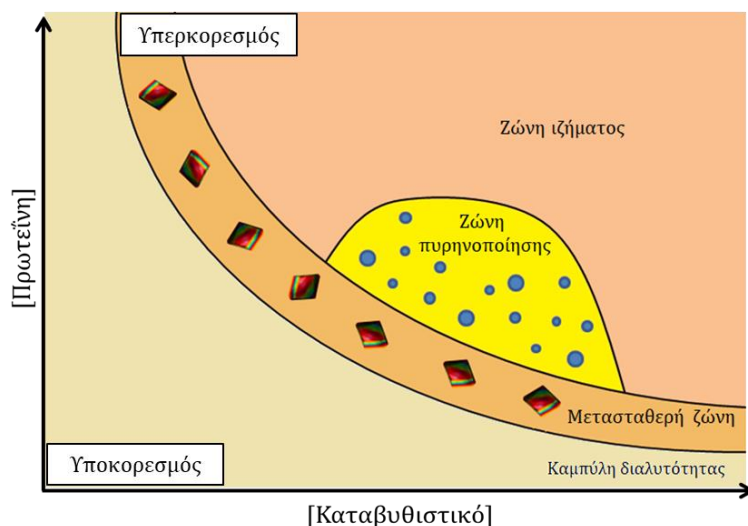
Εικόνα 27: Κρύσταλλοι πρωτεΐνης που αναπτύχθηκαν στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

Για να αυξήσουμε τις πιθανότητες μια πρωτεΐνη να σχηματίσει κρύσταλλο, πρέπει το δείγμα που θα υποβληθεί σε δοκιμές κρυστάλλωσης να εμφανίζει βιοχημική καθαρότητα μεγαλύτερη από 95 %. Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα δείγμα το οποίο αποτελείται από ένα μακρομόριο σε πολλά αντίγραφα. Το δείγμα πρέπει επίσης να εμφανίζει και δομική καθαρότητα, δηλαδή όλα μόρια μέσα στο δείγμα να έχουν την ίδια διαμόρφωση. Επομένως, οι μέθοδοι κρυστάλλωσης και τα διαλύματα επιλέγονται με σκοπό να συνεισφέρουν στη φυσική δομή του μακρομορίου [100].

Η διαδικασία ανάπτυξης κρυστάλλων χωρίζεται κυρίως σε δύο σημαντικά βήματα:

1. Πυρηνοποίηση
2. Αύξηση του μεγέθους του σχηματισμένου κρυστάλλου (μετασταθερή φάση)

Η πυρηνοποίηση είναι μια κρίσιμη διαδικασία για τη δημιουργία ενός κρυστάλλου και μπορεί να συμβεί όταν η συγκέντρωση του μακρομορίου γίνει υψηλότερη από αυτή που του επιτρέπει να μείνει στη διαλυτή φάση. Ακολουθώντας, μόρια του μακρομορίου προστίθενται στις κρυσταλλικές επιφάνειες σε συγκέντρωση η οποία είναι χαμηλότερη από πριν, δηλαδή στην εγγενή διαλυτότητα. Ανάμεσα στα δύο βήματα που αναφέρθηκαν, η πυρηνοποίηση είναι το σημαντικότερο καθώς εάν η συγκέντρωση του μακρομορίου δεν φτάσει τον υπερκορεσμό, τότε δεν θα μπορέσει να σχηματιστεί ο πυρήνας και κατ' επέκταση ο κρύσταλλος [100]. Όμως, η δημιουργία ενός υπέρκορου διαλύματος δεν λύνει από μόνο του το πρόβλημα καθώς υπάρχει η πιθανότητα να σχηματιστούν πολλοί πυρήνες κάτι το οποίο θα οδηγήσει σε κατανάλωση των μορίων της πρωτεΐνης που υπάρχουν στο διάλυμα. Το γεγονός αυτό με τη σειρά του θα οδηγήσει σε παραγωγή πολλών μικρών κρυστάλλων οι οποίοι συνήθως δεν είναι κατάλληλοι για περίθλαση ακτίνων-X. Επομένως, οι συνθήκες κρυστάλλωσης πρέπει να τροποποιούνται με τέτοιο τρόπο ώστε το μακρομόριο να συμπυκνωθεί με ελεγχόμενο τρόπο και να επιτευχθεί μια ισορροπία η οποία θα ευνοεί τη δημιουργία μεγάλων μονοκρυστάλλων αντί ιζήματος (Εικόνα 28) [100].



Εικόνα 28: Διάγραμμα φάσης κρυστάλλωσης πρωτεϊνών.

Η διαδικασία κρυστάλλωσης αλλά και βελτιστοποίησης των κρυστάλλων είναι, όπως αναλύθηκε παραπάνω, μια απαιτητική διαδικασία και ορισμένες φορές μη επιτυχής. Για το λόγο αυτό, εταιρείες έχουν αναπτύξει διάφορα κιτ πολλών συνθηκών κρυστάλλωσης όπου μεταβάλλονται πολλοί παράγοντες ταυτόχρονα. Η ανάπτυξη ρομποτικών συστημάτων έχει βοηθήσει σε αυτή τη κατεύθυνση ελαχιστοποιώντας τον όγκο της πρωτεΐνης που

καταναλώνεται για αυτές τις δοκιμές σε πιάτα 96 θέσεων (Εικόνα 29). Για παράδειγμα, με 100 μL πρωτεΐνη στην επιθυμητή συγκέντρωση, μπορούν να εξεταστούν ταυτόχρονα ~ 280 και περισσότερες διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης ανάλογα με τον όγκο της σταγόνας που θα επιλεγεί.



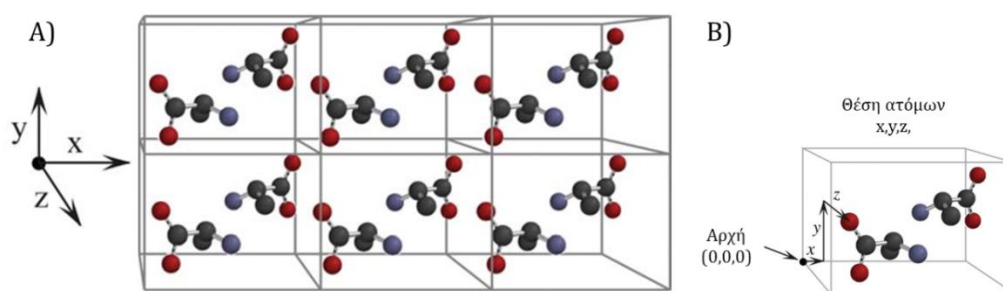
Εικόνα 29: Αριστερά, το ρομποτικό σύστημα OrghNano (Douglas Instruments). Δεξιά: Πιάτο 96 θέσεων δοκιμής διαφορετικών συνθηκών κρυστάλλωσης. Η συνθήκη κρυστάλλωσης τοποθετείται στο βοθρίο και η πρωτεΐνη με τη συνθήκη τοποθετούνται ταυτόχρονα στη θέση τοποθέτησης της σταγόνας.

Η κρυστάλλωση, εκτός από δομικές μελέτες μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον καθαρισμό μιας ένωσης ή ενός μακρομορίου από τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος. Αυτό συμβαίνει επειδή κατά τη διαδικασία της κρυστάλλωσης τα συστατικά τα οποία δεν μπορούν να κρυσταλλωθούν παραμένουν στο διάλυμα σε αντίθεση με τους κρυστάλλους οι οποίοι μπορούν να συλλεχθούν και να απομακρυνθούν από το διάλυμα.

4.1.6.3. Ιδιότητες πρωτεϊνικών κρυστάλλων

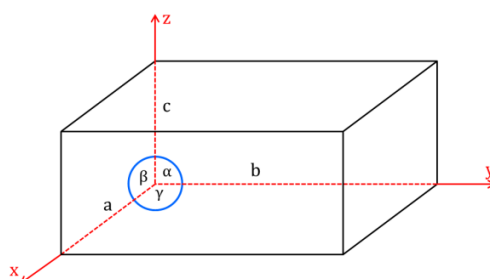
Οι πρωτεΐνες μπορούν να βρεθούν σε στερεή κατάσταση με τη μορφή κρυστάλλων. Ένας κρύσταλλος (πρωτεΐνης ή μη) μπορεί να τεμαχιστεί νοητά σε πολλά μικρά κομμάτια έως ότου φτάσουμε σε ένα σημείο όπου δεν μπορούμε να τον κόψουμε άλλο. Αυτή η τελική μονάδα η οποία μπορεί να πολλαπλασιαστεί και με εφαρμογή τελεστών συμμετρίας να δώσει το αρχικό αντικείμενο ονομάζεται μοναδιαία ή στοιχειώδης κυψελίδα. Είναι φανερό ότι για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε τη δομή ενός κρυστάλλου, χρειάζεται να προσδιορίσουμε μόνο τη δομή του λιγότερο συμμετρικού συστατικού της μοναδιαίας κυψελίδας. Επομένως, η περιγραφή της λιγότερο συμμετρικής μονάδας (συμμετρικό μοτίβο) και η εφαρμογή συμμετρίας, αρκούν για να περιγράψουν έναν ολόκληρο κρύσταλλο [100]. Είναι φανερό ότι η λιγότερο συμμετρική μονάδα του μακρομορίου μπορεί να χωριστεί σε μια οντότητα η οποία δεν εμφανίζει καμία συμμετρία και καλείται ασύμμετρη μονάδα. Οι τελεστές συμμετρίας αλλά και γενικότερα η συμμετρία των κρυστάλλων αποτελεί ένα ολόκληρο κομμάτι μελέτης στην

κρυσταλλογραφία στο οποίο δεν θα επεκταθούμε ιδιαίτερα. Επομένως, εφόσον κάθε επίπεδο του κρυστάλλου είναι δυνατόν να παραχθεί με εφαρμογή τελεστών συμμετρίας στην ασύμμετρη μονάδα και κατ' επέκταση στο συμμετρικό μοτίβο, ο προσδιορισμός της δομής ενός μακρομορίου μπορεί να επιτευχθεί με τον προσδιορισμό των θέσεων των ατόμων του μακρομορίου της ασύμμετρης μονάδας στις τρεις διαστάσεις (x,y,z) [100]. Το συμμετρικό μοτίβο μετατοπίζεται προς τις τρεις διαστάσεις σχηματίζοντας το κρυσταλλικό πλέγμα. Τα γειτονικά σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους και να δημιουργήσουν την μοναδιαία κυψελίδα η οποία περιέχει όλα τα άτομα της ασύμμετρης μονάδας και των μοτίβων του κρυσταλλικού πλέγματος [100]. Στην Εικόνα 30 παρουσιάζεται μια τέτοια συστοιχία μορίων με τις γραμμές να χωρίζουν τον κρύσταλλο σε στοιχειώδεις κυψελίδες. Ο προσδιορισμός της θέσης ενός ατόμου στο χώρο γίνεται από ένα σύνολο συντεταγμένων (x,y,z) χρησιμοποιώντας μια από τις κορυφές της στοιχειώδους κυψελίδας ως αρχή του συστήματος των συντεταγμένων [x,y,z = 0 ή απλά (0,0,0)] (Εικόνα 30B) [216].



Εικόνα 30: A) Παρουσιάζονται έξι στοιχειώδεις κυψελίδες σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα. Η κάθε στοιχειώδης κυψελίδα αποτελείται από δύο μόρια αλανίνης. B) Μια στοιχειώδης κυψελίδα που περιγράφει ότι η τοποθέτηση κάθε ατόμου ενός μορίου μέσα στην στοιχειώδη κυψελίδα μπορεί να γίνει προσδιορίζοντας τις συντεταγμένες x,y,z [216].

Οι ακμές της μοναδιαίας κυψελίδας ορίζουν ένα σύνολο διανυσματικών αξόνων (x,y,z) με τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας να ορίζονται από τα αντίστοιχα μήκη a, b, c (Εικόνα 31). Επιπλέον, οι γωνίες α, β και γ (Εικόνα 31) που σχηματίζονται μεταξύ των αξόνων (οι οποίοι δεν είναι απαραίτητο να είναι κάθετοι μεταξύ τους) ορίζουν μαζί με τα μήκη a, b και c το μέγεθος και τη μορφή κάθε στοιχειώδους κυψελίδας [100].



Εικόνα 31: Παρουσιάζεται η στοιχειώδης κυψελίδα σε ένα σύστημα διανυσματικών αξόνων x, y, z. Αναγράφονται τα μήκη a, b, c και οι γωνίες α, β, και γ, στοιχεία τα οποία καθορίζουν τη μορφή κάθε στοιχειώδους κυψελίδας.

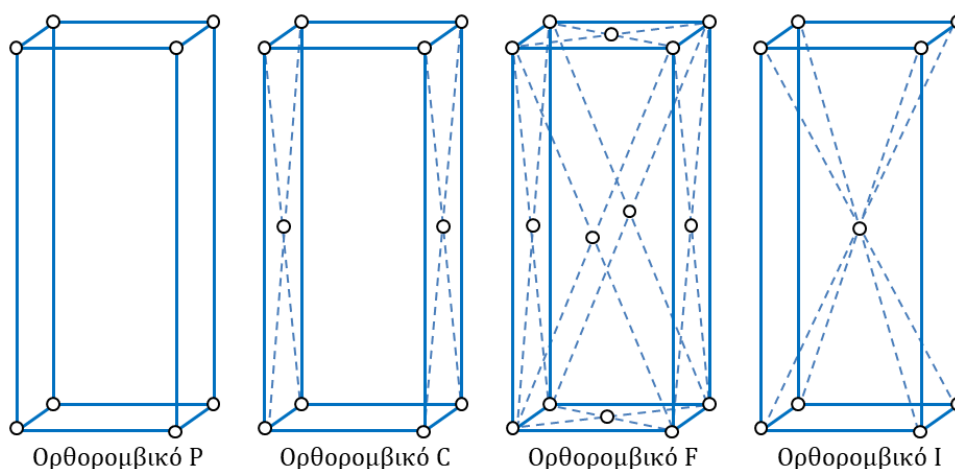
Ανάλογα με τις γωνίες και τα μήκη της μοναδιαίας κυψελίδας υπάρχουν επτά διαφορετικά κρυσταλλικά συστήματα τα οποία χρησιμοποιούνται στην ταξινόμηση των κρυστάλλων (Πίνακας 9) [216].

Πίνακας 9: Τα επτά κρυσταλλικά συστήματα μαζί με τις περιοριστικές παραμέτρους [216].

Σύστημα	Παράμετροι
Κυβικό	$a=b=c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Τετραγωνικό	$a=b\neq c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Ορθορομβικό	$a\neq b\neq c, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Ρομβοεδρικό	$a=b=c, \alpha=\beta=\gamma\neq 90^\circ$
Εξαγωνικό	$a=b=c, \alpha=\beta=90^\circ, \gamma=120^\circ$
Μονοκλινές	$a\neq b\neq c, \alpha=\gamma=90^\circ, \beta\neq 90^\circ$
Τρικλινές	$a\neq b\neq c, \alpha\neq\beta\neq\gamma\neq 90^\circ$

Λόγω των περιορισμών που υπάρχουν για την επιτρεπτή μορφή της στοιχειώδους κυψελίδας, μπορούν να κατασκευαστούν 14 κρυσταλλικά πλέγματα το οποίο ονομάζονται κρυσταλλικά πλέγματα *Bravais*. Ο συνδυασμός των 14 κρυσταλλικών πλεγμάτων *Bravais* και των επιτρεπτών τύπων συμμετρίας που μπορούν να εφαρμοστούν (περιστροφής και ελικώσεως) οδηγούν σε 65 διαφορετικές ομάδες χώρου που μπορούν να υπάρχουν στη φύση (από σύνολο 230 αν μπορούσαν να εφαρμοστούν όλοι οι τελεστές συμμετρίας). Στην Εικόνα 32 παρουσιάζεται ένα δείγμα των κρυσταλλικών πλεγμάτων *Bravais* ως προς το ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα το οποίο μπορεί να εμφανίσει και τους 4 πιθανούς τύπους κρυσταλλικών πλεγμάτων, οι οποίοι αναλύονται αμέσως μετά. Εάν τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος εντοπίζονται μόνο στις κορυφές της στοιχειώδους κυψελίδας, τότε η στοιχειώδης κυψελίδα είναι απλή και το κρυσταλλικό πλέγμα σε αυτή τη περίπτωση συμβολίζεται με P (*primitive*). Εάν σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος βρίσκονται στα κέντρα κάθε μιας από τις δύο παράλληλες έδρες, το κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζεται κεντρωμένο ή κρυσταλλικό πλέγμα C (*centered*) ενώ εάν υπάρχουν και στις έξι έδρες, τότε ονομάζεται κρυσταλλικό πλέγμα F ή αλλιώς κεντρωμένο (*face-centered*). Τέλος, εάν ένα σημείο του κρυσταλλικού πλέγματος βρίσκεται στο κέντρο της στοιχειώδους κυψελίδας, τότε είναι ενδοκεντρωμένη και το κρυσταλλικό πλέγμα ορίζεται ως I. Η συμμετρία της στοιχειώδους κυψελίδας και ο τύπος του κρυσταλλικού πλέγματος ορίζουν την ομάδα συμμετρίας χώρου (*space group*) [100]. Η ομάδα συμμετρίας χώρου περιγράφει την εσωτερική συμμετρία της στοιχειώδους κυψελίδας, χρησιμοποιώντας τελεστές και στοιχεία συμμετρίας. Οι πιο απλοί τελεστές συμμετρίας που χρειάζονται για να περιγράψουν την συμμετρία της στοιχειώδους κυψελίδας είναι η μετακίνηση και η περιστροφή (στοιχείο συμμετρίας: άξονας περιστροφής).

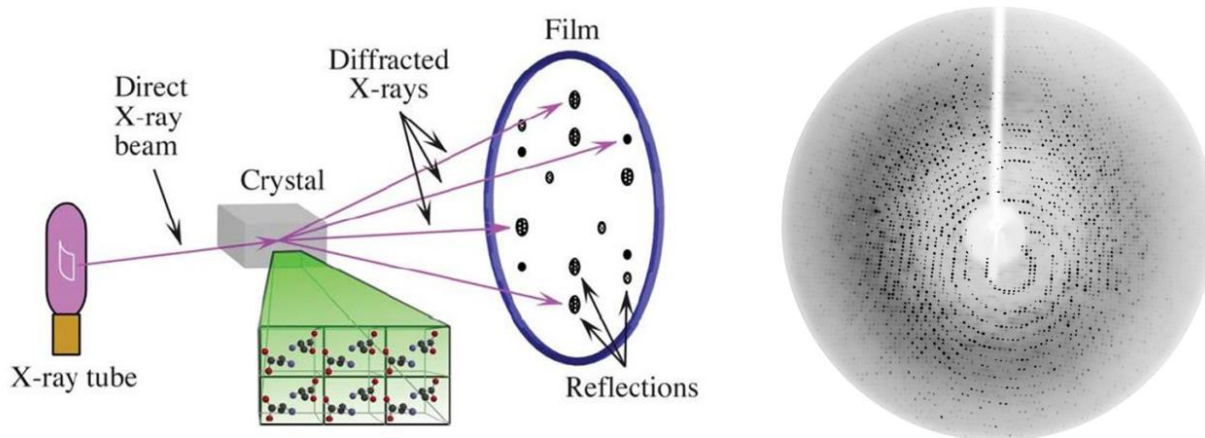
Συνδυασμοί αυτών των στοιχείων συμμετρίας μπορούν να οδηγήσουν σε πιο πολύπλοκα όπως οι κοχλιωτοί άξονες, τα κέντρα συμμετρίας και τα επίπεδα ολίσθησης [216].



Εικόνα 32: Τα 4 από τα 14 δικτυωτά πλέγματα *Bravais*. Παρουσιάζεται το ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα το οποίο μπορεί να εμφανίσει και τους 4 πιθανούς τύπους κρυσταλλικού πλέγματος.

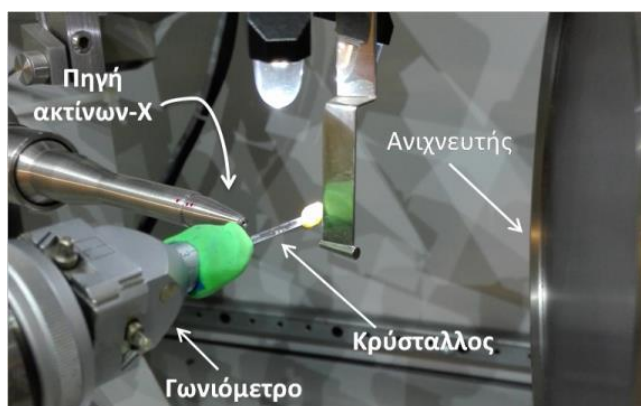
4.1.6.4. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X

Στην Εικόνα 33 παρουσιάζεται μια τυπική διάταξη συλλογής δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X από έναν κρύσταλλο. Παρατηρούμε ότι ουσιαστικά ο κρύσταλλος λειτουργεί σαν ένας ενισχυτής του σήματος, καθώς εάν υπήρχε η δυνατότητα να ακινητοποιήσουμε μια μόνο στοιχειώδη κυψελίδα, τότε το σήμα θα ήταν τόσο ασθενές που δεν θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε τις περιθλάσεις. Στην ίδια εικόνα παρουσιάζεται επίσης ένα περιθλασίγραμμα το οποίο αντιστοιχεί σε μια «φωτογραφία» της πρωτεΐνης στη συγκεκριμένη θέση. Επομένως, προκειμένου να μπορέσουμε να δούμε την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης θα πρέπει περιστρέψουμε τον κρύσταλλο ώστε να συλλέξουμε περιθλασιγράμματα σε διαφορετικές γωνίες και στη συνέχεια να κατασκευάσουμε το τρισδιάστατο είδωλο της πρωτεΐνης [217].



Εικόνα 33: Αριστερά, μια τυπική διάταξη συλλογής δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X από ένα κρύσταλλο [216]. Δεξιά: περιθλασίγραμμα κρυστάλλου της *rmGPb*.

Ο κρύσταλλος της πρωτεΐνης τοποθετείται πάνω σε ένα γωνιόμετρο μεταξύ μιας πηγής ακτίνων-X και ενός ανιχνευτή. Το γωνιόμετρο μας επιτρέπει να περιστρέψουμε τον κρύσταλλο σε συγκεκριμένες μοίρες ώστε να συλλέξουμε δεδομένα περίθλασης από διαφορετικές γωνίες [217]. Εάν η συλλογή δεδομένων γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου, τότε ο κρύσταλλος τοποθετείται εντός τριχοειδών σωλήνων και σφραγίζεται στα άκρα του, όπως φαίνεται στην Εικόνα 34. Συνήθως, επειδή οι κρύσταλλοι είναι μικροί σε μέγεθος, η συλλογή δεδομένων γίνεται με χρήση υγρού αζώτου, το οποίο υαλοποιεί και δεν παγώνει τον κρύσταλλο λόγω παρουσίας κρυοπροστατευτικών αυξάνοντας σημαντικά τον χρόνο ζωής του μέσω μείωσης της βλάβης που προκαλείται από την ακτινοβολία. Για το λόγο αυτό η μεθοδολογία αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για το ~ 90 % των δομών που έχουν κατατεθεί στην *PDB* από περίθλαση ακτίνων-X [218]. Όταν ένα κρύσταλλος τοποθετηθεί μπροστά από μια δέσμη ακτίνων-X, τότε κάθε ηλεκτρόνιο που υπάρχει στον κρύσταλλο ξεκινάει να πραγματοποιεί εξαναγκασμένη ταλάντωση. Δηλαδή, το ηλεκτρόνιο εκπέμπει δευτερογενώς ακτινοβολία σαν σφαιρικό κύμα προς όλες τις διευθύνσεις αλλά με μήκος κύματος ίδιο με της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Το κύμα το οποίο τελικά θα εξέλθει από τον κρύσταλλο προς κάποια κατεύθυνση αποτελεί ένα άθροισμα όλων των κυμάτων από τα ηλεκτρόνια του κρυστάλλου [217].



Εικόνα 34: Πειραματική διάταξη συλλογής δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X στο σύστημα *Oxford Diffraction SuperNova*.

Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιούμε τις ακτίνες-X για τη μελέτη της δομής των μακρομορίων αναφέρθηκε στην αρχή. Εάν ήταν εφικτό να χρησιμοποιήσουμε φακούς όπως γίνεται στη μικροσκοπία, τότε γνωρίζοντας το πλάτος, το μήκος, και την φάση των κυμάτων θα μπορούσαμε να δημιουργήσουμε το ανεστραμμένο και μεγεθυμένο είδωλο του αντικειμένου. Η δράση των φακών είναι ένα προβλέψιμο και μαθηματικά μετρήσιμο φαινόμενο το οποίο μπορεί να περιγραφεί με εξισώσεις (σύνθεση *Fourier*). Ο λόγος που δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε φακούς οφείλεται στην φύση των ακτίνων-X καθώς δεν υπάρχουν φακοί που θα μπορούσαν να αλλάξουν σημαντικά τη διεύθυνση διάδοσης των

ακτίνων. Επιπλέον, η μεγάλη συχνότητα των ακτίνων-X δεν μας επιτρέπει να προσδιορίσουμε την φάση των κυμάτων που περιθλώνται [217].

Οι ιδιότητες των κυμάτων είναι:

- Η διεύθυνση διάδοσης του κύματος.
- Το μήκος του.
- Το πλάτος του (όσο μεγαλύτερο το πλάτος, τόσο πιο «φωτεινό» το κύμα).
- Η φάση η οποία είναι αυτή που περιγράφει την περιοδική μεταβολή του κύματος.

Εάν υπολογιστούν όλες οι ιδιότητες των κυμάτων που σκέδασε ο κρύσταλλος, τότε μπορούμε να κατασκευάσουμε το είδωλο του αντικειμένου. Το πλάτος, το μήκος και η διεύθυνση διάδοσης, είναι ιδιότητες που μπορούν να προσδιοριστούν από το πειραματικό αποτέλεσμα, δηλαδή το περιθλασίγραμμα. Το πόσο έντονη είναι μια αμύρωση στο περιθλασίγραμμα δηλώνει το πλάτος των κυμάτων που έχουν συμβάλει στο συγκεκριμένο σημείο και από την θέση πρόσπτωσης των κυμάτων είναι εφικτό να προσδιοριστεί η διεύθυνση διάδοσης των κυμάτων. Το μήκος κύματος που έχουν τα κύματα τα οποία σκεδάζονται είναι το ίδιο με αυτό που έχει η προσπίπτουσα ακτινοβολία. Επομένως, αν γνωρίζαμε τη φάση θα μπορούσαμε, με εφαρμογή της σύνθεσης *Fourier* να ανακτήσουμε το είδωλο της πρωτεΐνης [217].

4.1.6.5. Το πρόβλημα της φάσης

Όπως αναφέραμε, δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η φάση των κυμάτων των ακτίνων-X καθώς αυτά τα κύματα αλλάζουν φάση αρκετές φορές κάθε δευτερόλεπτο. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί μεθοδολογίες που μας επιτρέπουν να βρούμε τη φάση, όπως:

- Μοριακή αντικατάσταση: Όπως αναφέραμε, εάν γνωρίζουμε όλες τις ιδιότητες των κυμάτων που σκεδάστηκαν από τον κρύσταλλο, μπορούμε να ανασκευάσουμε το είδωλο της πρωτεΐνης. Αυτό δουλεύει και αντίστροφα, δηλαδή εάν γνωρίζουμε το είδωλο της πρωτεΐνης μπορούμε να υπολογίσουμε τις ιδιότητες των κυμάτων που θα σκεδάζονταν από τον κρύσταλλο. Επομένως, εάν η δομή που μελετάμε θεωρούμε ότι μοιάζει αρκετά με μια ήδη γνωστή πρωτεΐνη, τότε με την μοριακή αντικατάσταση μπορούμε να βρούμε κάποιες αρχικές φάσεις για την πρωτεΐνη που μελετάμε και στη συνέχεια να βελτιστοποιήσουμε το μοντέλο [217].
- Η ισόμορφη αντικατάσταση με χρήση βαρέων μετάλλων: Το πρόβλημα προσδιορισμού της φάσης μετατίθεται από τον προσδιορισμό της φάσης των περιθλάσεων όλων των

μορίων της πρωτεΐνης, στον προσδιορισμό της φάσης της περίθλασης ενός ή παραπάνω βαρέων ατόμων που έχουν συνδεθεί στην πρωτεΐνη [217].

- *MAD, SAD*: Στηρίζεται στη συλλογή δεδομένων σε διαφορετικό/ά μήκος/οι κύματος στα οποία ορισμένα άτομα, όπως το σελήνιο μιας σεληνιομεθειονίνης, σκεδάζουν διαφορετικά από τα υπόλοιπα άτομα της πρωτεΐνης. Έτσι το πρόβλημα των φάσεων μετατίθεται σε αυτά τα άτομα [217].

4.1.6.6. Ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Το πειραματικό αποτέλεσμα της περίθλασης ακτίνων-*X* από ένα κρύσταλλο πρωτεΐνης είναι το περιθλασίγραμμα. Το κύμα το οποίο θα «βγει» τελικά από τον κρύσταλλο είναι οργανωμένο σε δέσμες ακτίνων-*X* και διαδίδεται ως προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση. Όταν το κύμα αυτό «πέσει» πάνω στον ανιχνευτή τότε θα παρατηρηθεί μια αμαύρωση η οποία θα αποτελεί το άθροισμα των κυμάτων από κάθε ηλεκτρόνιο του κρυστάλλου (Εικόνα 33). Εάν το άθροισμα των κυμάτων είναι ενισχυτικό, τότε θα παρατηρηθεί η αμαύρωση ενώ αν είναι αναιρετικό τότε δεν θα παρατηρηθεί αμαύρωση. Η κάθε διεύθυνση στην οποία θα παρατηρηθεί περίθλαση καθορίζεται μόνο από τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας ενώ αντίθετα η φάση και το πλάτος των περιθλώμενων κυμάτων καθορίζονται μόνο από τις θέσεις των ηλεκτρονίων στο εσωτερικό του κρυστάλλου. Η διεύθυνση του κάθε περιθλώμενου κύματος, δηλαδή η κάθε αμαύρωση, μπορεί να χαρακτηριστεί από τους ακέραιους αριθμούς *h*, *k*, και *l* οι οποίοι ονομάζονται δείκτες του *Miller* [217].

4.1.6.7. Δείκτες *Miller*

Οι δείκτες *Miller* είναι ακέραιοι αριθμοί οι οποίοι χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν κρυσταλλικά επίπεδα και κρυσταλλικές διευθύνσεις σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα. Αν δούμε την εικόνα Εικόνα 31 μπορούμε να φανταστούμε ότι οι δείκτες *hkl* μας δείχνουν τον αριθμό των επιπέδων που υπάρχουν στους άξονες *x,y,z* αντίστοιχα. Με άλλα λόγια, οι δείκτες *hkl* μας δείχνουν σε πόσα τμήματα τέμνονται οι πλευρές *a*, *b*, και *c* αντίστοιχα από μια οικογένεια επιπέδων. Οποιαδήποτε οικογένεια επιπέδων με δείκτες *hkl* περιλαμβάνει επίπεδα του πλέγματος, μεταξύ τους παράλληλα και σε απόσταση *d* (ανάμεσα σε δύο διαδοχικά επίπεδα). Η απόσταση *d* εξαρτάται από τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας και το κρυσταλλικό σύστημα [217].

Οι δείκτες *Miller* αποτελούν επίσης δείκτες:

- Οι οποίοι «μετρούν» συντεταγμένες στο περιθλασίγραμμα (πλέγμα από ανακλάσεις) [217].

- Οι οποίοι μετρούν τη διαφορά δρόμων μεταξύ των κυμάτων (σε ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος) ώστε αυτά τα κύματα να μπορούν να συμβάλουν θετικά μεταξύ τους [217].
- Οι οποίοι αντιστοιχούν σε διαφορετικές γωνίες περίθλασης με αποτέλεσμα να μετρούν το φαινομενικό λ με το οποίο οι ανακλάσεις συμβάλουν στη δημιουργία του ειδώλου. Αυτό συμβαίνει γιατί κύματα τα οποία διαδίδονται από διαφορετική κατεύθυνση φαίνεται ότι συμβάλουν με διαφορετικό μήκος κύματος, κάτι το οποίο πρακτικά δεν ισχύει και οφείλεται στις διαφορετικές διευθύνσεις διάδοσης [217].
- Οι οποίοι αποτελούν δείκτες ευκρίνειας (Βλ παράγραφο 4.1.6.12). Αυτή η ιδιότητα των δεικτών *Miller* προκύπτει από την προηγούμενη ιδιότητα τους που αναφέρθηκε. Τα μικρά h δηλώνουν μικρές γωνίες περίθλασης ενώ τα μεγάλα h μεγάλες γωνίες περίθλασης. Ως αποτέλεσμα, οι μικρές γωνίες περιέχουν πληροφορία χαμηλής ευκρίνειας ενώ οι μεγάλες γωνίες υψηλής. Αυτό συμβαίνει γιατί οι μικρές γωνίες βρίσκονται κοντά στην αρχή των αξόνων, κοντά στην διεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας [217].

4.1.6.8. Ο νόμος του *Bragg*

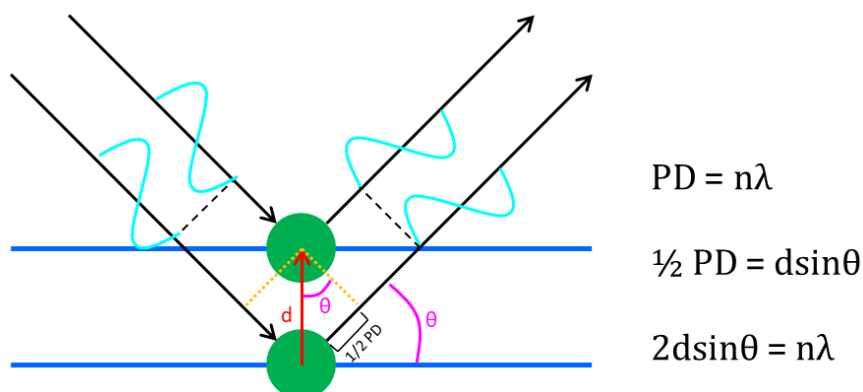
Στο νόμο του *Bragg* βασίζεται όλη η θεωρία της περίθλασης. Όπως αναφέραμε παραπάνω, οι δείκτες *Miller* ορίζουν κρυσταλλογραφικά επίπεδα τα οποία είναι παράλληλα μεταξύ τους σε απόσταση d και τέμνουν την μοναδιαία κυψελίδα στους άξονες a , b και c . Η περίθλαση ερμηνεύεται από αυτά τα παράλληλα νοητά επίπεδα τα οποία διατρέχουν τον κρύσταλλο. Ο νόμος του *Bragg* ερμηνεύει την περίθλαση από ένα επίπεδο συνδέοντας το μήκος κύματος της ακτινοβολίας με τη γωνία πρόσπτωσης στα διάφορα διαδοχικά παράλληλα επίπεδα.

Στην Εικόνα 35 παρουσιάζονται δύο από τα πολλά παράλληλα επίπεδα. Για να παρατηρηθεί θετική συμβολή (ενισχυτική) θα πρέπει τα δύο περιθλώμενα κύματα να έχουν την ίδια φάση, δηλαδή την ίδια χρονική στιγμή πρέπει να εμφανίζουν τα ίδια μέγιστα και ελάχιστα. Για να γίνει αυτό εφικτό, θα πρέπει το μήκος διαδρομής του περιθλώμενου και του προσπίπτοντος κύματος (PD) να είναι ίση με ακέραιο πολλαπλάσιο (n) του λ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Έτσι λοιπόν, εφαρμόζοντας τριγωνομετρία προκύπτει ότι:

$$2d\sin\theta=n\lambda$$

Από αυτή τη σχέση προκύπτει ότι ενισχυτική συμβολή μπορεί να συμβεί για συγκεκριμένες γωνίες περίθλασης (για ακέραιες τιμές του n) [100]. Επιπλέον γίνεται πάλι αντιληπτό ότι οι

διευθύνσεις των κυμάτων που τελικά θα παρατηρηθεί περίθλαση εξαρτώνται μόνο από το d , δηλαδή τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας [217].



Εικόνα 35: Ο νόμος του *Bragg*. Οι μπλε γραμμές είναι τα παράλληλα επίπεδα τα οποία διατρέχουν τον κρύσταλλο και οι πράσινες σφαίρες τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος. Στο κρυσταλλικό πλέγμα θα έπρεπε να παρουσιάζονται περισσότερα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος αλλά για απλοποίηση της εικόνας παρουσιάζονται μόνο δύο. Από αριστερά έρχεται η προσπίπτουσα ακτινοβολία και δεξιά φαίνεται η σκεδαζόμενη δέσμη. Αν η απόσταση μεταξύ των επιπέδων είναι d (από τη στοιχειώδη κυψελίδα), και τα δύο κύματα έχουν διαφορά μήκους διαδρομής ίση με ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος, τότε τα δύο κύματα θα συμβάλουν θετικά στο περιθλασίγραμμα.

4.1.6.9. Μετασχηματισμοί *Fourier*

Ο *Fourier* έδειξε ότι κάθε περιοδική συνάρτηση μπορεί να αναλυθεί σε άθροισμα απλών κυμάτων. Ένας κρύσταλλος είναι μια περιοδική συνάρτηση η οποία αναλύεται σε απλά κύματα όταν πέσουν πάνω του ακτίνες-X οι οποίες στη συνέχεια περιθλώνται και καταγράφονται σε έναν ανιχνευτή. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, εάν γνωρίζουμε όλα τα χαρακτηριστικά του κύματος που περιθλάται (μήκος, πλάτος, διεύθυνση και φάση) μπορούμε μέσω του μετασχηματισμού *Fourier* θα βρούμε το είδωλο του μορίου το οποίο υπάρχει εντός του κρυστάλλου. Αυτή η σχέση, δηλαδή ο προσδιορισμός της δομής ενός μακρομορίου από ένα περιθλασίγραμμα αφού έχουμε προσδιορίσει τις φάσεις, λέγεται σύνθεση *Fourier* (απλά κύματα \rightarrow περιοδική συνάρτηση) και η αντίστροφη πορεία, δηλαδή ο προσδιορισμός των κυμάτων που θα περιθλώνταν από ένα μακρομόριο (σε μορφή κρυστάλλου) εάν αυτό βρισκόταν μπροστά από δέσμη ακτίνων-X λέγεται ανάλυση *Fourier* (περιοδική συνάρτηση \rightarrow απλά κύματα). Με πιο απλά λόγια, αν γνωρίζουμε τη δομή του ειδώλου μπορούμε να υπολογίσουμε το φάσμα περίθλασης που θα έδινε και αντίστροφα. Για το λόγο αυτό ο μετασχηματισμός *Fourier* χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των φάσεων μέσω μοριακής αντικατάστασης, όταν η υπό μελέτη πρωτεΐνη μοιάζει αρκετά με μια πρωτεΐνη της οποίας η δομή είναι γνωστή. Γίνεται σύγκριση του πειραματικού περιθλασιγράμματος της άγνωστης πρωτεΐνης και του θεωρητικού (υπολογιστικού) της γνωστής δομής και ακολουθεί βελτιστοποίηση στα σημεία όπου εντοπίζονται διαφορές [217].

Για κάποιο κύμα hkl ο παράγοντας δομής \vec{F}_{hkl} είναι αυτός που το αναπαριστά τόσο κατά πλάτος ($|F_{hkl}|$) όσο και κατά φάση (φ_{hkl}). Η διεύθυνση σκέδασης ενός κύματος εξαρτάται από τις ιδιότητες της στοιχειώδους κυψελίδας ενώ το πλάτος και η φάση από την εσωτερική δομή του κρυστάλλου. Επομένως, το πλάτος και η φάση αποτελούν άθροισμα της συμβολής όλων των κυμάτων που σκέδασαν όλα τα ηλεκτρόνια του κρυστάλλου σε αυτήν τη διεύθυνση. Σε διαφορετικές διευθύνσεις τα κύματα μπορούν να συμβάλουν με διαφορετικό τρόπο με αποτέλεσμα οι παράγοντες δομής να έχουν διαφορετικά πλάτη και φάσεις. Εφόσον τα ηλεκτρόνια είναι αυτά που σκεδάζουν τις ακτίνες-X, το τελικό προϊόν που προκύπτει από την πειραματική διαδικασία είναι μια κατανομή των ηλεκτρονίων με τη μορφή πυκνότητας ως συνάρτηση της θέσης (x,y,z) μέσα στη μοναδιαία κυψελίδα. Αυτή η συνάρτηση, ονομάζεται συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $\rho(x,y,z)$. Ένας \vec{F}_{hkl} μπορεί να περιγραφεί σαν μια άθροιση ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων στον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας (V) [217]:

$$\vec{F}_{hkl} = \int_x \int_y \int_z \rho(xyz) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV$$

- \vec{F}_{hkl} : Παράγοντας δομής
- dV : Στοιχειώδης όγκος κυψελίδας
- xyz : Συντεταγμένες του στοιχειώδους όγκου
- $2\pi(hx + ky + lz)$: φάση στις συγκεκριμένες κλασματικές συντεταγμένες.
- $\rho(xyz)$: πλάτος του στοιχειώδους κύματος που περιγράφεται ως τιμή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας.
- hkl : Δείκτες *Miller* του παράγοντα δομής.

Η εξίσωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας που προκύπτει από την εφαρμογή της σύνθεσης *Fourier* μοιάζει με την παραπάνω και προσδιορίζει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα κάθε σημείο της μοναδιαίας κυψελίδας:

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} |\vec{F}_{hkl}| e^{i\varphi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

$\rho(xyz)$ = Συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας.

$|\vec{F}_{hkl}|$ = Πλάτος του παράγοντα \vec{F}_{hkl} .

φ_{hkl} = Φάση του παράγοντα \vec{F}_{hkl} .

$-2\pi(hx + ky + lz) =$ Δηλώνει το πόσο συνεισφέρει ο παράγοντας \vec{F}_{hkl} στη διαμόρφωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στη θέση xyz [217].

4.1.6.10. Ενσωμάτωση κρυσταλλογραφικών δεδομένων (*Integration*)

Το πειραματικό αποτέλεσμα της περίθλασης ακτίνων-Χ είναι οι αμαυρώσεις (ανακλάσεις) πάνω σε έναν ανιχνευτή. Επειδή ο κρύσταλλος περιστρέφεται κατά τη συλλογή των δεδομένων, τελικά συλλέγουμε πολλά περιθλασιγράμματα τα οποία αποτελούνται από ένα μεγάλο αριθμό αμαυρώσεων. Η μέτρηση των εντάσεων των αμαυρώσεων ονομάζεται «*integration*» και είναι μια σχετικά απλή διαδικασία εάν δεν υπάρχει καθόλου θόρυβος (*background*) στο περιθλασίγραμμα. Τότε, οι τιμές κάθε ενός εικονοστοιχείου που αποτελεί μια αμαύρωση ενώνονται ώστε να δώσουν την τιμή της έντασης της αμαύρωσης. Όταν υπάρχει θόρυβος, αυξάνεται η δυσκολία αρχικά στο να εντοπιστούν όλες οι αμαυρώσεις με ακρίβεια, ώστε να καθοριστεί ποια εικονοστοιχεία αποτελούν κάθε αμαύρωση και τέλος να ληφθεί υπόψη ο μη μηδενικός θόρυβος του περιθλασιγράμματος. Οπότε, πρέπει να οριστεί κάποιο όριο στο επίπεδο του θορύβου ώστε να είναι δυνατόν να γίνει διαχωρισμός μεταξύ ενός εικονοστοιχείου μιας αμαύρωσης και ενός εικονοστοιχείου του θορύβου. Για τον σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι οι οποίες βοηθούν στο να γίνει διαχωρισμός των αδύναμων αμαυρώσεων από τον θόρυβο. Ο βασικός τρόπος που γίνεται αυτό είναι η χρήση του προφίλ των έντονων αμαυρώσεων ως πρότυπο στο οποίο μπορούν να ταιριάξουν οι γειτονικές αδύναμες. Με τον τρόπο αυτό γίνεται μια καλύτερη εκτίμηση της έντασης μιας αδύναμης αμαύρωσης από το να μετρούσαμε απλά τα εικονοστοιχεία της, όπως γίνεται για τις έντονες αμαυρώσεις [219].

4.1.6.11. Ρύθμιση κλίμακας & συγχώνευση (*Scaling & merging*)

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την παραπάνω διαδικασία (*integration*), για διάφορους φυσικούς λόγους, δεν βρίσκονται όλα στην ίδια κλίμακα, κάτι το οποίο πρέπει να ληφθεί υπόψη όταν τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιηθούν στην ανάλυση δομής. Οι λόγοι για τους οποίους μπορεί να συμβεί αυτό είναι πολλοί όπως, αλλαγές στην ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, βλάβη του κρυστάλλου λόγω ακτινοβολίας, μη ομοιόμορφη απόκριση του ανιχνευτή κ.α.. Επομένως, η ρύθμιση κλίμακας είναι μια προσπάθεια στο να απαλειφθούν όλες αυτές οι αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη συλλογή των δεδομένων περίθλασης και να τοποθετηθούν όλες οι ανακλάσεις στην ίδια κλίμακα εντάσεων. Επιπλέον, επειδή οι κρύσταλλοι εμφανίζουν συμμετρία, είναι αναμενόμενο ότι κάποιες ανακλάσεις θα έχουν την ίδια ένταση και θα πρέπει να συγχωνευτούν. Η συγχώνευση των ισοδύναμων αμαυρώσεων

γίνεται ώστε να προκύψουν τελικά οι μοναδικές ανακλάσεις (με το σφάλμα τους) [219]. Λόγω της υψηλής σημασίας αυτής της διαδικασίας τα στατιστικά της επεξεργασίας των δεδομένων έχουν ιδιαίτερη σημασία σε σχέση με την ευκρίνεια, όπως αναλύεται παρακάτω.

4.1.6.12. Αξιολόγηση των δεδομένων περίθλασης σε σχέση με την ευκρίνεια

Τα στατιστικά της επεξεργασίας των δεδομένων περίθλασης εξαρτώνται από το όριο της μέγιστης ευκρίνειας που χρησιμοποιείται στην ανάλυση των δεδομένων. Τα στατιστικά αυτά μας δείχνουν πόσα καλά είναι τα δεδομένα μας ως προς την ευκρίνεια που χρησιμοποιήσαμε. Η ευκρίνεια (*resolution*) έχει ως μονάδα μέτρησης το *Angstrom* (Å) και ορίζεται ως η ελάχιστη απόσταση των επιπέδων του κρυσταλλικού πλέγματος τα οποία μπορούν να παρέχουν μετρήσιμη περίθλαση ακτίνων-X. Η τιμή αυτή καθορίζει την ελάχιστη απόσταση που μπορεί να υπάρχει μεταξύ δομικών χαρακτηριστικών ώστε αυτά να μπορούν να διακρίνονται σε χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Με άλλα λόγια η ευκρίνεια ορίζει το επίπεδο της λεπτομέρειας αλλά και της αξιοπιστίας της δομής. Όσο χαμηλότερη η τιμή της ευκρίνειας, τόσο υψηλότερης λεπτομέρειας και αξιοπιστίας είναι ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας, διότι υψηλή ευκρίνεια σημαίνει χαμηλή απόσταση d με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλος αριθμός αμαυρώσεων που μετράται και τελικά να διακρίνονται περισσότερες λεπτομέρειες και να είναι πιο αξιόπιστη η κρυσταλλική δομή [220]. Αυτό προκύπτει από το νόμο του *Bragg* καθώς υπάρχει αντίστροφη σχέση μεταξύ της γωνίας και της απόστασης μεταξύ των επιπέδων των επαναλαμβανόμενων μονάδων. Δηλαδή μικρότερες αποστάσεις οδηγούν σε μεγαλύτερες γωνίες περίθλασης και τελικά σε αμαυρώσεις σε μεγαλύτερη ακτίνα από το κέντρο του περιθλασιγράμματος. Αυτός είναι και ένας εμπειρικός τρόπος της γρήγορης αξιολόγησης της ευκρίνειας των δεδομένων περίθλασης καθώς όσο σε μεγαλύτερη απόσταση βρίσκονται οι αμαυρώσεις, τόσο υψηλότερης ευκρίνειας είναι τα δεδομένα [217]. Η υψηλότερη ευκρίνεια που μπορεί να παρατηρηθεί ορίζεται από την ποιότητα του κρυστάλλου και το μήκος κύματος της πηγής ακτίνων-X (όριο ευκρίνειας = $\lambda/2$). Η ατομική ευκρίνεια ορίζεται σε 1.2-0.65 Å, η υψηλή σε 2.0-1.2 Å, η ενδιάμεση σε 2.7-2.0 Å και η χαμηλή ≥ 2.7 Å (πληροφορίες κυρίως για το σχήμα του μακρομορίου). Σε δεδομένα ενδιάμεσης ευκρίνειας μπορούν να παρατηρηθούν μόρια ύδατος (μήκος δεσμών υδρογόνου ~ 2.7 Å) ενώ σε ευκρίνεια χαμηλότερη του 1 Å μπορούν να παρατηρηθούν έως και τα υδρογόνα καθώς ο ομοιοπολικός δεσμός του υδρογόνου έχει μήκος 0.9-1.0 Å. Στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών συνήθως κινούμαστε στην υψηλή και ενδιάμεση ευκρίνεια [220]. Κάποια από τα στατιστικά που μας δείχνουν πόσο

καλά είναι τα δεδομένα για τη συγκεκριμένα ευκρίνεια ως προς την οποία αναλύθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

Πολλαπλότητα (*redundancy* ή *multiplicity*): Με τον όρο αυτό, ορίζεται ο μέσος αριθμός των μετρήσεων για κάθε μια μοναδική αμαύρωση. Όσο πιο μεγάλη είναι η πολλαπλότητα είναι λογικό ότι τόσο πιο ακριβής είναι η μέτρηση του μέσου όρου της έντασης της κάθε αμαύρωσης (καθώς υπάρχουν σφάλματα στον υπολογισμό της έντασης κάθε αμαύρωσης) [220].

R_{merge} (R_{sym} ή R_{int}): Ο παράγοντας R_{merge} εκτιμά το εύρος των εντάσεων των συμμετρικά ισοδύναμων αμαυρώσεων οι οποίες συμβάλουν για τη δημιουργία μιας μόνο και μοναδικής ανάκλασης.

Για να είναι αποδεκτό ένα σύνολο δεδομένων περίθλασης θα πρέπει η τιμή του R_{merge} να είναι μικρότερη από 4 - 5 % ή και μικρότερη για καλά βελτιστοποιημένα πειραματικά συστήματα. Στη στοιβάδα υψηλής ευκρίνειας ο R_{merge} μπορεί να πάρει την τιμή 30 - 40 % για κρυστάλλους με χαμηλή συμμετρία και 60 % για κρυστάλλους με υψηλή συμμετρία γιατί συνήθως η πολλαπλότητα είναι υψηλότερη. Γενικά, είναι επιθυμητό η πολλαπλότητα των μετρήσεων να είναι υψηλή καθώς οδηγεί σε βελτίωση της ποιότητας των δεδομένων συγχώνευσης όσον αφορά την ένταση των αμαυρώσεων και τα εκτιμώμενα σφάλματα (*estimated uncertainties*). Όμως, ο δείκτης R_{merge} δεν είναι ο πιο χρήσιμος δείκτης γιατί δεν λαμβάνει υπόψη τη πολλαπλότητα των μετρήσεων [220].

Δείκτης $\langle I/\sigma I \rangle$: Αποτελεί δείκτη αξιολόγησης της ευκρίνειας των δεδομένων. Η τιμή αυτού του δείκτη ορίζεται ως ο λόγος της έντασης της αμαύρωσης προς το σφάλμα της μέτρησης. Το όριο της ευκρίνειας της περίθλασης ενός κρυστάλλου ορίζεται συνήθως σε εκείνη την ευκρίνεια όπου ο δείκτης αυτός έχει στην μέση τιμή στην εξωτερική στοιβάδα ίση περίπου με 2. Τιμές < 2 ενέχουν την παρουσία σφαλμάτων ενώ τιμές > 2 δηλώνουν ότι υπάρχει η πιθανότητα καλύτερης περίθλασης από τον κρύσταλλο αλλά η ευκρίνεια των δεδομένων περιορίζεται από τις συνθήκες συλλογής τους [220].

$CC^{1/2}$: Παρότι ο δείκτης R_{merge} είναι αυτός ο οποίος χρησιμοποιείται κυρίως, φαίνεται πως δεν είναι ο κατάλληλος για την εύρεση της βέλτιστης ευκρίνειας καθώς αποκλείονται αρκετά σημαντικά δεδομένα. Το $CC^{1/2}$ είναι ένας δείκτης ο οποίος είναι μια στατιστικώς σημαντική τιμή για να αποφασίσουμε ποια δεδομένα είναι σημαντικά. Τα δεδομένα χωρίζονται σε δύο κομμάτια κάθε ένα από τα οποία περιέχει τυχαία τις μισές μετρήσεις των ανακλάσεων για

κάθε μοναδική ανάκλαση. Έπειτα υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης του *Pearson* (CC) μεταξύ της μέσης τιμής των ανακλάσεων από κάθε ένα από τα δύο κομμάτια στα οποία είχαν χωριστεί τα δεδομένα. Η τιμή αυτή ονομάζεται $CC^{1/2}$ και έχει τιμή κοντά στο 1.0 σε χαμηλή ευκρίνεια και κοντά στο 0.1 σε υψηλή ευκρίνεια [221].

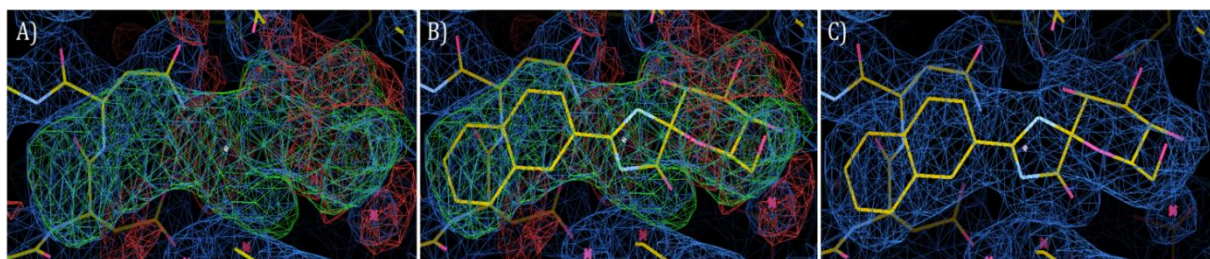
Πληρότητα: Αποτελεί έναν δείκτη αξιολόγησης της ποιότητας των δεδομένων καθώς εκφράζεται από τη πιθανότητα να έχουν μετρηθεί θεωρητικά όλες οι μοναδικές ανακλάσεις σε συγκεκριμένη ευκρίνεια. Υπάρχει περίπτωση κάποιες αμαυρώσεις να μη μετρηθούν λόγω καταστροφής του κρυστάλλου από την ακτινοβολία, με αποτέλεσμα να μην έχουμε πληρότητα 100 % κάτι το οποίο επηρεάζει με αρνητικό τρόπο τους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας [220].

4.1.6.13. Χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας - Βελτιστοποίηση και αξιολόγηση του τελικού μοντέλου

Στην προηγούμενη ενότητα δείξαμε ότι μέσω του μετασχηματισμού *Fourier* μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις πειραματικές ανακλάσεις (F_{obs}) και να υπολογίσουμε ένα χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, εάν γνωρίζουμε τις φάσεις. Όπως αναλύσαμε παραπάνω, οι φάσεις (φ_{calc}) δεν παρέχονται αρχικά από τα πειραματικά δεδομένα αλλά υπολογίζονται συνήθως με τη χρήση ενός μοντέλου (δηλαδή μιας γνωστής ή παρόμοιας δομής), εάν αυτό είναι διαθέσιμο. Οι φάσεις παρέχονται από τη γνωστή δομή με μια διαδικασία που ονομάζεται μοριακή αντικατάσταση όπου η γνωστή δομή τοποθετείται στη στοιχειώδη κυψελίδα αλλάζοντας τη θέση και τον προσανατολισμό της ώστε τα πειραματικά δεδομένα (φάσεις και πλάτη) να ταιριάζουν με αυτά που θα προέκυπταν από τη γνωστή δομή. Στη συνέχεια, γίνεται βελτιστοποίηση των συντεταγμένων των ατόμων στο χώρο (xyz) αλλά και των παραγόντων θερμικής κίνησης (*B-factor*, βλ. παρακάτω) με μια διαδικασία που ονομάζεται βελτιστοποίηση με την εφαρμογή περιορισμών (*restrained refinement*). Η δομή που προκύπτει μετά από αυτή τη διαδικασία είναι το αρχικό μοντέλο όπου μελετώνται οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ένας τέτοιος χάρτης αποτελεί μια προσέγγιση της αληθινής δομής αλλά η ακρίβεια του εξαρτάται από την ακρίβεια των φάσεων του μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε. Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί το μοντέλο της υπό μελέτη δομής, χρησιμοποιείται ένας άλλος χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας, ο οποίος ονομάζεται διαφορικός χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας, και υπολογίζεται με βάση τις διαφορές που υπάρχουν μεταξύ των πειραματικών και τον υπολογισμένων πλατών (εντάσεις των ανακλάσεων) χρησιμοποιώντας και πάλι τις φάσεις του μοντέλου, δηλαδή είναι ο χάρτης $F_{obs}-F_{calc}$, φ_{calc} . Αυτός ο χάρτης ηλεκτρονιακής

πυκνότητας, παρουσιάζει τις διαφορές που υπάρχουν μεταξύ των πειραματικών μετρήσεων και της δομής του μοντέλου. Σε αυτόν τον χάρτη παρατηρούμε δύο τύπους πυκνότητας. Υπάρχει η θετική πυκνότητα που αναφέρεται σε περιοχές που υπάρχουν στα πειραματικά δεδομένα αλλά όχι στη δομή μοντέλο και η υπάρχει η αρνητική πυκνότητα η οποία δηλώνει περιοχές που υπάρχουν στη δομή μοντέλο αλλά δεν εντοπίζονται στα πειραματικά δεδομένα. Πρακτικά χρησιμοποιείται ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, φ_{calc} ο οποίος είναι μια υπέρθεση των δύο τύπων χαρτών που αναφέρθηκαν προηγουμένως, ώστε να παρατηρήσουμε τις βελτιώσεις που πρέπει να κάνουμε στο μοντέλο ώστε να ενσωματωθεί καλύτερα στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα [220]. Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίζονται περιέχουν θόρυβο επειδή τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των χαρτών περιέχουν σφάλματα. Για να αποφύγουμε τυχόν λάθη, πρέπει να χρησιμοποιήσουμε μία καλή μονάδα απεικόνισης η οποία για το χάρτη $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, φ_{calc} είναι το 1σ και για τον $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, φ_{calc} το 3σ . Το σ αντιστοιχεί στην *rmsd* (*root-mean-square deviation*), δηλαδή στη ρίζα της μέσης τετραγωνικής τιμής της απόκλισης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας από τη μέση ηλεκτρονιακή πυκνότητα όλης της μοναδιαίας κυψελίδας [220].

Αναφέρουμε συνοπτικά ένα παράδειγμα. Έστω ότι μελετάμε μια πρωτεΐνη της οποίας η δομή είναι γνωστή και θέλουμε να παρατηρήσουμε την πρόσδεση ενός αναστολέα. Αφού μαζέψουμε δεδομένα από έναν κρύσταλλο ο οποίος είχε εμποτιστεί με τον αναστολέα, θα πρέπει να βρούμε τη δομή της πρωτεΐνης σε σύμπλοκο με τον αναστολέα. Για να το κάνουμε αυτό όμως δεν αρκεί μόνο το περιθλασίγραμμα. Επομένως, χρησιμοποιούμε τη γνωστή δομή της πρωτεΐνης ώστε να βρούμε τις φάσεις και στη συνέχεια υπολογίζουμε τους παραπάνω χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, όπως αναλύθηκε. Έπειτα, μπορούμε να βρούμε που και αν έχει συνδεθεί αυτός ο αναστολέας καθώς και τι αλλαγές έχει επιφέρει η πρόσδεση του στη δομή της πρωτεΐνης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 36 μέσω του διαφορικού χάρτη. Στη συνέχεια βελτιώνουμε το μοντέλο κάνοντας τις απαραίτητες αλλαγές με αποτέλεσμα το μοντέλο να αρχίζει να ταιριάζει στα πειραματικά δεδομένα.



Εικόνα 36: **A)** Η ύπαρξη θετικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας **B)** Η τοποθέτηση του αναστολέα στον θετικό χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας **C)** Το μοντέλο μετά τη βελτιστοποίηση όπου φαίνεται ότι ο αναστολέας ταιριάζει στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκε.

Οι αλλαγές που πραγματοποιούνται στο αρχικό μοντέλο αξιολογούνται στη συνέχεια (μέσω *restrained refinement*) μελετώντας τους παρακάτω δείκτες:

R_{factor} : Αποτελεί δείκτη της ασυμφωνίας μεταξύ των πλατών των παραγόντων δομής που υπολογίζονται από το μοντέλο και από τα πλάτη που μετρήθηκαν από το πείραμα. Ο δείκτης R_{factor} ορίζεται από τη σχέση:

$$\frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{|\sum F_{obs}|} [100]$$

Ουσιαστικά ο δείκτης αυτός εκφράζει την απόκλιση της πραγματικής δομής από αυτή του μοντέλου. Η τιμή του R_{factor} πρέπει να είναι μικρότερη από 20 % για μια καλά προσδιορισμένη δομή. Ωστόσο, μια χαμηλή τιμή του R_{factor} μπορεί να προκύψει τεχνικά για ένα μοντέλο το οποίο δεν είναι ακριβές απλά και μόνο προσθέτοντας περισσότερα μόρια ύδατος ώστε να καλυφθεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα που παρατηρείται. Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί κριτήρια για την αξιολόγηση της συμφωνίας μεταξύ των δεδομένων χωρίς να υπάρχει η προκατάληψη από το ίδιο το μοντέλο [100].

R_{free} : Υπολογίζεται όπως ο δείκτης R_{factor} αλλά για τυχαία επιλεγμένες περιθλάσεις (περίπου 5 % των συνολικών περιθλάσεων) οι οποίες διαχωρίζονται από την αρχή και δεν χρησιμοποιούνται στη βελτιστοποίηση των δεδομένων η οποία γίνεται με βάση τις υπόλοιπες περιθλάσεις. Ο δείκτης αυτός είναι πιο ευαίσθητος από τον R_{factor} και χρησιμοποιείται για την αποφυγή της υπερ-βελτιστοποίησης. Εάν η δομή μοντέλο περιέχει παραμέτρους οι οποίες δεν υποστηρίζονται από τις πειραματικές περιθλάσεις, τότε ο R_{free} δεν θα βελτιστοποιηθεί (παρά το γεγονός ότι η τιμή του R_{factor} ενδέχεται να μειωθεί) κάτι το οποίο δηλώνει την υπερ-προσαρμογή των δεδομένων. Γενικά, στα αρχικά στάδια της βελτιστοποίησης ο R_{free} μπορεί να έχει τιμές υψηλότερες του R_{factor} αλλά στα τελικά στάδια οι δύο δείκτες έχουν παρόμοιες τιμές. Αν υπάρχει υπερ-βελτιστοποίηση τότε η τιμή του R_{free} είναι κατά ~ 7 % μεγαλύτερη από αυτή του R_{factor} . Επιπλέον ο δείκτης R_{free} μπορεί να μας δείξει αν κάποια μόρια ύδατος τα οποία προστέθηκαν στο μοντέλο κατά τη βελτιστοποίηση υπάρχουν όντως στα πειραματικά δεδομένα ή αποτελούν θόρυβο. Η τιμή του R_{free} θα πρέπει να είναι μικρότερη από 28 % και του R_{factor} μικρότερη από 25 % [220].

Πληρότητα: Ένας άλλος παράγοντας ο οποίος μπορεί να επηρεάσει τη βελτιστοποίηση είναι η πληρότητα ενός ατόμου. Η πληρότητα είναι μια τιμή που δείχνει σε πόσα μόρια της μοναδιαίας κυψελίδας ένα συγκεκριμένο άτομο καταλαμβάνει ακριβώς την ίδια θέση. Εάν όλα

τα μόρια στον κρύσταλλο είναι ίδια, τότε η πληρότητα για όλα τα άτομα θα είναι 1.00. Η πληρότητα χρησιμοποιείται γιατί σε κάποιες περιπτώσεις (όπως στην επιφάνεια των πρωτεϊνών) ενδέχεται η πλευρική αλυσίδα κάποιου καταλοίπου να μπορεί να έχει δύο ή περισσότερες διαμορφώσεις. Η βελτιστοποίηση της δομής μπορεί να γίνει πιο αντιπροσωπευτική αν το συγκεκριμένο κατάλοιπο περιγραφεί ανάλογα με τις διαφορετικές του διαμορφώσεις. Αν για παράδειγμα παρατηρούνται δύο διαφορετικές διαμορφώσεις στην ίδια συχνότητα, τότε η πληρότητα για κάθε πιθανή διαμόρφωση είναι 0.5 [216]. Εάν οι δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις παρουσιάζουν διαφορετική συχνότητα εμφάνισης, δηλαδή φαίνεται πως στα περισσότερα μόρια επικρατεί η μία έναντι της άλλης, τότε η πληρότητα μπορεί να τροποποιηθεί κατάλληλα. Σε κάθε περίπτωση δεν γίνεται προσθήκη επιπλέον ατόμου στη δομή αλλά εναλλακτικής διαμόρφωσης της πλευρικής αλυσίδας. Η τροποποίηση της πληρότητας μπορεί να γίνει και για την περίπτωση αναστολέων οι οποίοι φαίνεται να μην έχουν καταφέρει να συνδεθούν σε όλα τα μόρια της πρωτεΐνης του κρυστάλλου.

B-factors: Οι παράγοντες θερμικής κίνησης (*B-factors*) αποτελούν ένα μέτρο με το οποίο τα άτομα ταλαντώνονται στις τρεις διαστάσεις. Το νέφος της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, επηρεάζεται γύρω από τον πυρήνα του κάθε ατόμου επειδή ο *B-factor* επιδρά στον ατομικό παράγοντα σκέδασης:

$$B = 8\pi^2u^2$$

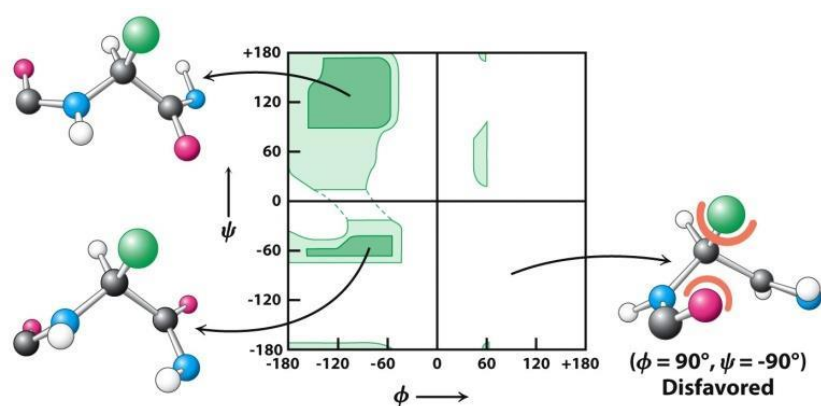
u^2 = δηλώνει το τετράγωνο της μέσης τιμής του εύρους ταλάντωσης ενός ατόμου από τη θέση ηρεμίας. Η ύπαρξη υψηλών τιμών των *B-factor* ειδικά για τα μόρια ύδατος ($> 100 \text{ \AA}^2$) δηλώνει ότι η βελτιστοποίηση των μορίων του διαλύτη δεν έχει γίνει με μεγάλη προσοχή [216].

Ο παράγοντας θερμικής κίνησης Wilson: Ο παράγοντας αυτός προκύπτει από την ανάλυση ενός διαγράμματος της μέσης έντασης της αμαύρωσης ως προς τον λόγο $\sin^2(\theta)/\lambda^2$ (διάγραμμα *Wilson*). Ο παράγοντας θερμικής κίνησης *Wilson* δείχνει τον βαθμό της τάξης εντός του κρυστάλλου. Αποτελεί μια προσέγγιση των μέσων ατομικών *B-factors* που μπορεί να ληφθούν αργότερα κατά τη βελτιστοποίηση. Εάν ο *B-factor* είναι υψηλός ($> 50 \text{ \AA}^2$), υπάρχει σαφής διαταραχή στη κρυσταλλική δομή και ίσως είναι δύσκολο να καθοριστούν όλα τα τμήματα της πρωτεΐνης ακόμα και αν η ευκρίνεια είναι ικανοποιητική [222].

Τετραγωνική ρίζα της μέσης τιμής απόκλισης (*rmsd*): Η *rmsd* είναι μια παράμετρος η οποία μας δείχνει τις αποκλίσεις από τις ιδανικές γεωμετρικές παραμέτρους (μήκη και τις γωνίες) των δεσμών που εντοπίζονται στο μοντέλο. Αυτοί οι γεωμετρικοί παράμετροι

λειτουργούν ως περιορισμοί κατά τη διαδικασία βελτιστοποίησης της δομής. Για τα μήκη των δεσμών η τιμή της *rmsd* θα πρέπει να είναι μικρότερη από 0.02 Å και για τις γωνίες μικρότερη από 4 °.

Διάγραμμα *Ramachandran*: Όπως διαπιστώθηκε από τον *Ramachandran N. G.*, πολλοί συνδυασμοί γωνιών ϕ και ψ μεταξύ των ατόμων δεν είναι επιτρεπτοί λόγω στερικών συγκρούσεων. Ένα διάγραμμα *Ramachandran* μας δείχνει αν κάθε κατάλοιπο της πρωτεΐνης εμφανίζει σωστές γωνίες ϕ και ψ . Εάν οι γωνίες δεν είναι επιτρεπτές, τότε το κατάλοιπό αυτό θα βρίσκεται σε μη επιτρεπτή θέση στο διάγραμμα και θα πρέπει να επανεξεταστεί (Εικόνα 37) [12].



Εικόνα 37: Μια αναπαράσταση του διαγράμματος *Ramachandran* [12]

***PDB-REDO*:** Παραπάνω αναλύθηκαν κάποιοι τρόποι αξιολόγησης της ποιότητας της δομής που προκύπτει από τα στάδια βελτιστοποίησης. Υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που μπορούν να ελεγχθούν και παρέχονται από τα προγράμματα βελτιστοποίησης όπως τα εργαλεία *density fit* και *geometry analysis* που μας δείχνουν πόσο ταιριάζουν τα κατάλοιπα στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, αλλά και πόσο σωστή είναι η γεωμετρία τους με βάση τους περιορισμούς. Επιπλέον, πριν την κατάθεση μιας δομής στη βάση δεδομένων για πρωτεΐνες (*Protein Data Bank*) γίνεται επιπλέον έλεγχος του μοντέλου που κατατίθεται όπου ελέγχεται μεταξύ άλλων και η απόσταση μεταξύ των πλευρικών ομάδων μεταξύ δύο αμινοξέων καθώς υπάρχουν και εκεί περιορισμοί. Το *PDB-REDO* αποτελεί ένα εργαλείο το οποίο χρησιμοποιεί μια σειρά προγραμμάτων με αυτοματοποιημένο τρόπο ώστε να βελτιστοποιήσει τη γεωμετρία της δομής και τις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ των καταλοίπων της πρωτεΐνης, όπως οι δεσμοί υδρογόνου κ.α.. Επιπλέον, επιλέγει μια στρατηγική βελτιστοποίησης της δομής όπως για παράδειγμα τόσο πόσοι κύκλοι βελτιστοποίησης θα γίνουν και τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει η βελτιστοποίηση των *B-factors* (ισοτροπική, ανισοτροπική, χρήση TLS κ.α.). Τέλος, παράγονται τα νέα στατιστικά, τα

οποία συνήθως είναι βελτιωμένα και ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να ελέγξει κάθε μια από τις αλλαγές που έγιναν στη δομή ώστε να επιλέξει αν κάποιες είναι ανεπιθύμητες [223-225].

4.2.Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση A308L CgGDE

Το πλασμίδιο όπου βρισκόταν κλωνοποιημένη η νουκλεοτιδική αλληλουχία που κωδικοποιεί το CgGDE L308A ήταν ευγενική προσφορά του καθηγητή S. Xiang, από το Shanghai Jiaotong University Medical School. Η κλωνοποίηση της αλληλουχίας είχε γίνει σε φορέα έκφρασης pET26b μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης από τα περιοριστικά ένζυμα NdeI/XhoI [44]. Η επιλογή αυτής της θέσης κλωνοποίησης έγινε ώστε να απομακρυνθεί η αλληλουχία pelB η οποία οδηγεί σε μεταφορά της πρωτεΐνης στον περιπλασματικό χώρο του βακτηρίου (Βλ. παράγραφο 4.1.1.2). Με αυτό τον τρόπο η πρωτεΐνη μπορεί να παραχθεί, να αναδιπλωθεί και να παραμείνει στο κυτταρόπλασμα. Επομένως, προκειμένου να δουλέψουμε με το φυσιολογικό ένζυμο έπρεπε να κάνουμε τη στοχευμένη μεταλλαξιγένεση A308L. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του CgGDE βρέθηκε στη βάση δεδομένων που περιέχει το γονιδίωμα του Candida (Candida Genome Database) [226] και σχεδιάστηκαν οι εκκινητές των οποίων η σύνθεση έγινε από την εταιρεία Eurofins Genomics:

Εμπρόσθιος: 5' GTGATTGGAGAAATTGAAATTGTGGGAATTCTATGTAG 3'

Οπίσθιος: 5' CTACATAGAATTCCCACAATTTCAAATTCTCCAATCAC 3'

Για τη δημιουργία της μετάλλαξης ακολούθησαν οι παρακάτω αντιδράσεις PCR. Τα συστατικά της αντίδρασης PCR αναγράφονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Συστατικά της αντίδρασης PCR για τη στοχευμένη μεταλλαξιγένεση.

	Αντίδραση εμπρόσθιου εκκινητή	Αντίδραση οπίσθιου εκκινητή
KAPA High Fidelity HotStart	22.2 μ L	22.2 μ L
Εμπρόσθιος εκκινητής (10 μ M)	1.3 μ L	-
Οπίσθιος εκκινητής (10 μ M)	-	1.3 μ L
CgGDE-pET26b	1.5 μ L	1.5 μ L
ddH ₂ O	25 μ L	25 μ L

Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR τα θερμικά πρότυπα των οποίων αναφέρονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 11: Το θερμικό πρότυπο της πρώτης αντίδρασης PCR.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	95 °C	3 min	
Αποδιάταξη	98 °C	20 sec	16 κύκλους
Υβριδοποίηση	64 °C	1 min	
Επέκταση	72 °C	10 min	

Οι δύο διαφορετικές αντιδράσεις *PCR* των εκκινητών ενώθηκαν σε μια και ακολούθησε αντίδραση *PCR* το θερμικό πρότυπο της οποίας παρουσιάζεται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Το θερμικό πρότυπο της δεύτερης αντίδρασης *PCR*.

	Θερμοκρασία	Χρόνος	
Αρχική αποδιάταξη	98 °C	3 min	
Αποδιάταξη	98 °C	20 sec	18 κύκλους
Υβριδοποίηση	60 °C	1 min	
Επέκταση	72 °C	10 min	
Τελική επέκταση	72 °C	20 min	

Ακολούθησε πέψη με το ένζυμο *Dnp1* ώστε να διαχωριστούν οι κλώνοι που περιέχουν τη νέα μετάλλαξη καθώς η *Dnp1* αναγνωρίζει και πέπτει το *DNA* μόνο εάν αυτό περιέχει μεθυλιώσεις. Επομένως, το μητρικό δείγμα *DNA* καταστρέφεται γιατί είναι μεθυλιωμένο ενώ το νεοσυντιθέμενο *DNA* δεν καταστρέφεται αφού δεν έχει μεθυλιώσεις. Η αντίδραση αυτή εξελίχθηκε σε θερμοκρασία 37 °C για 5 h και τα συστατικά της αντίδρασης αναγράφονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Συστατικά της αντίδρασης πέψης με το ένζυμο *Dnp1*.

Συστατικά	Όγκος (μL)
Dnp1	1
10x Buffer	5
Αντίδραση μεταλλαξιγένεσης	44

Έπειτα, το προϊόν της αντίδρασης κατακρημνίστηκε με αιθανόλη προσθέτοντας *NaCl* σε τελική συγκέντρωση 0.25 M και 3 όγκους παγωμένης αιθανόλης. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και το δείγμα τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία - 80 °C για χρονικό διάστημα 30 min. Στη συνέχεια, προστέθηκε 70 % (v/v) παγωμένη αιθανόλη και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση (15000 rpm, 5 min, 4 °C). Τέλος, το ίζημα αφέθηκε ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη και διαλυτοποιήθηκε σε 10 μL ddH₂O.

Ο πολλαπλασιασμός του πλασμιδίου έγινε με μετασηματισμό βακτηριακών κυττάρων *XI1-Blue* και η απομόνωση και καθαρισμός του πλασμιδίου με το kit *NucleoSpin plasmid* (*Macherey-Nagel*). Η επιτυχία της μεταλλαξιγένεσης ελέγχθηκε με αλληλούχιση.

4.3. Παρασκευή υλικού β-CD sepharose 6B για χρωματογραφία συγγένειας

Η παρασκευή της β-CD sepharose 6B έγινε όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία [199, 200] και στο εγχειρίδιο χρήσης της *GE HealthCare*. 4 g epoxy-activated sepharose 6B τοποθετήθηκαν σε ύδωρ (~ 20 mL) και αναδεύτηκαν για περίπου 1 h ώστε να μην υπάρχουν συσσωματώματα. Το υλικό μεταφέρθηκε σε στήλη βαρύτητας, πλύθηκε με περίπου 500 mL απιονισμένο ύδωρ και έπειτα με περίπου 200 mL NaOH 0.1 M. Ακολούθως, 400 mg β-κυκλοδεξτρίνης (β-CD) διαλυτοποιήθηκαν σε 12 mL NaOH 0.1 M (pH ~12) και τέλος το υλικό (~12 mL) αναμίχθηκε με

τα 12 mL β-CD. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα τύπου *falcon* χωρητικότητας 50 mL και αφέθηκε υπό ανάδευση σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 45 °C για 15 h. Την επόμενη ημέρα το υλικό μεταφέρθηκε σε στήλη βαρύτητας, πλύθηκε με ~200 mL NaOH 0.1 M ώστε να απομακρυνθεί η β-CD που δεν ενσωματώθηκε στο υλικό και στη συνέχεια η στήλη πλύθηκε με 500 mL απιονισμένου ύδατος. Έπειτα, έγινε προσθήκη διαλύματος 15 mL αιθανολαμίνης 1 M, pH 8.0, και το μίγμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα τύπου *falcon* 50 mL και παρέμεινε σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 45 °C για 16 h. Την επόμενη ημέρα το υλικό μεταφέρθηκε σε στήλη βαρύτητας, πλύθηκε αρχικά με απιονισμένο ύδωρ και στη συνέχεια με 200 mL εναλλάσσοντας τα διαλύματα 0.1 M οξικού νατρίου pH 4.0 /0.5 M NaCl, και 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 /0.5 M NaCl, για τουλάχιστον 4 φορές. Τέλος το υλικό (~ 12 mL) τοποθετήθηκε σε στήλη XK 16/20 (GE, HealthCare).

4.4. Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Η εισαγωγή ενός πλασμιδιακού φορέα σε βακτηριακά κύτταρα ονομάζεται μετασηματισμός. Οι πιο συνήθεις τρόποι μετασηματισμού είναι ο χημικός μετασηματισμός, ο ηλεκτρικός μετασηματισμός (ηλεκτροδιάτρηση), η βαλλιστική μέθοδος και ο μετασηματισμός με χρήση υπερήχων.

4.4.1. Χημικός μετασηματισμός

Η χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG) και χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$) αποτελούν τις πιο γνωστές μεθόδους χημικού μετασηματισμού. Βακτηριακά κύτταρα τα οποία είχαν επεξεργαστεί με $CaCl_2$ ώστε να είναι δεκτικά σε εισαγωγή πλασμιδίου, επώαστηκαν με το επιθυμητό πλασμίδιο στον πάγο για ~ 20 min, στη συνέχεια για 45 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία 42 °C και έπειτα ξανά σε πάγο. Αυτή η απότομη διαδοχή στην αλλαγή της θερμοκρασίας οδηγεί σε εκπόλωση της βακτηριακής μεμβράνης των δεκτικών κυττάρων ώστε το πλασμίδιο να εισέλθει εντός του κυττάρου. Έπειτα η μεταφορά των κυττάρων σε πάγο οδηγεί σε επαναφορά της κυτταρικής μεμβράνης στην αρχική της κατάσταση ώστε το πλασμίδιο που εισήχθη να εγκλωβιστεί στο εσωτερικό του βακτηρίου [227]. Ακολούθως, προστέθηκαν 900 μL υγρού θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 rpm) για μια ώρα. Τέλος, ποσότητα των κυττάρων επιστρώθηκε σε τρυβλία *Petri* σε στερεό θρεπτικό υλικό παρουσία αντιβιοτικού για επιλογή των βακτηριών στα οποία εισήχθη το πλασμίδιο. Αποικίες αναπτύχθηκαν έπειτα από 16 h επώαση σε θερμοκρασία 37 °C.

4.4.2. Ηλεκτρικός μετασχηματισμός (ηλεκτροδιάτρηση)

Η εφαρμογή υψηλής ηλεκτρικής τάσης στα βακτήρια οδηγεί σε προσωρινή κατάρρευση της μεμβράνης τους και σε δημιουργία πόρων, αρκετά μεγάλων ώστε μεγάλα μακρομόρια να μπορούν να εισέλθουν ή να εξέλθουν του κυττάρου [228].

Ηλεκτρικός μετασχηματισμός κυττάρων *BL21Gold (DE3)* για συν-έκφραση του *hGDE* με μοριακές συνοδούς

Μια κυψελίδα κατάλληλη για ηλεκτροδιάτρηση τοποθετήθηκε σε καταψύκτη το προηγούμενο βράδυ. Στη συνέχεια, 1 μL πλασμίδιο προστέθηκε σε 40 μL κύτταρα τα οποία είχαν ήδη μετασχηματιστεί με πλασμίδια που κωδικοποιούν μοριακές συνοδούς (*chaperone plasmid set, TaKaRa*) και έμειναν για 2 *min* στον πάγο. Έπειτα τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα και ακολούθησε ηλεκτρικός μετασχηματισμός. Τα κύτταρα διαλυτοποιήθηκαν σε 960 μL θρεπτικό υλικό *LB-Broth* και ακολούθησε επώαση για 1 *h* σε θερμοκρασία 37 °C σε επωαστήρα με ανακίνηση (210 *rpm*). Έπειτα 30 μL κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία *Petri* που περιείχαν 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ καναμυκίνη και 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ χλωραμφενικόλη αφού πρώτα αραιώθηκαν σε αναλογία 1/200. Αποικίες αναπτύχθηκαν σε 16 *h* σε θερμοκρασία 37 °C.

4.5. ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ α -1,4 ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΩΝ

4.5.1. *rmGPb*: Απομόνωση της *rmGPb* από σκελετικούς μύες κονίκλων.

Η *rmGPb* απομονώθηκε από σκελετικούς μύες αρσενικών κονίκλων ακολουθώντας την μέθοδο των *Fisher & Krebs* με ελαφρά τροποποίηση καθώς χρησιμοποιήθηκε β-μερκαπτοαιθανόλη αντί για *L*-κυστεΐνη [229]. Η διαδικασία χωρίζεται κυρίως σε έξι βήματα και η καθαρότητα του ενζύμου αυξάνεται κατά τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων. Μετά το τέλος κάθε βήματος, κρατήσαμε δείγμα το οποίο στη συνέχεια αναλύσαμε σε *SDS-PAGE*.

1^ο Βήμα: Εκχύλιση της *rmGPb* με κατεργασία του μυϊκού ιστού

Οι σκελετικοί μύες από τρεις αρσενικούς κονίκλους ομογενοποιήθηκαν με παγωμένη χειροκίνητη μηχανή και ο ομογενοποιημένος ιστός ζυγίστηκε ώστε να γίνουν τρεις εκχυλίσσεις με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Για τις δύο πρώτες εκχυλίσσεις προστέθηκε ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος με το βάρος του ομογενοποιημένου ιστού, ενώ για την τρίτη εκχύλιση έγινε προσθήκη του μισού όγκου απιονισμένου ύδατος. Πιο αναλυτικά, μετά την προσθήκη του απιονισμένου ύδατος εφαρμόστηκε μηχανική πίεση στο ομογενοποίημα για περίπου 25 *min* και έπειτα έγινε διήθηση μέσω γάζας εν ψυχρώ. Η διάρκεια της κάθε εκχύλισης δεν

ξεπέρασε τα 30 min. Τέλος, το εκχύλισμα φιλτραρίστηκε με χρήση υαλοβάμβακα ώστε να απομακρυνθούν αιωρούμενα σωματίδια.

2^ο Βήμα: Καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών με όξινη καταβύθιση.

Με χρήση CH_3COOH 1 N ρυθμίσαμε το pH του εκχυλίσματος που προέκυψε από το 1^ο βήμα στο 5.1-5.2 με ελαφρά ανάδευση. Έπειτα, αφήσαμε το εκχύλισμα σε πάγο για 5 min και παρατηρήσαμε ότι η θολρότητα του εκχυλίσματος είχε αυξηθεί λόγω της κατακρήμνισης πρωτεϊνών. Για να απομακρυνθούν αυτές οι πρωτεΐνες ακολούθησε φυγοκέντρηση (4225 g, 30 min, 4 °C) και στη συνέχεια το υπερκείμενο διηθήθηκε εν ψυχρώ με χρήση αντλίας κενού *Buchner*. Το pH του εκχυλίσματος ρυθμίστηκε στο 6.8 με προσθήκη κεκορεσμένου διαλύματος $KHCO_3$ και ογκομετρήθηκε ώστε να προστεθεί ο κατάλληλος όγκος θειικού αμμωνίου.

3^ο Βήμα: Καταβύθιση της *rmGPb* με προσθήκη θειικού αμμωνίου.

Η *rmGPb* καταβυθίστηκε με προσθήκη θειικού αμμωνίου σε κορεσμό 41 %. Ο όγκος του θειικού αμμωνίου που προστέθηκε ήταν 0.837 L θειικού αμμωνίου κορεσμένο κατά 90 % για κάθε λίτρο εκχυλίσματος. Η προσθήκη του θειικού αμμωνίου έγινε με αργό ρυθμό υπό ελαφρά ανάδευση και το τελικό διάλυμα αφέθηκε σε θερμοκρασία 4 °C για 36 ώρες. Σε αυτό το στάδιο δημιουργήθηκαν δύο φάσεις, μια υδατική και μία στερεή με την *rmGPb* να βρίσκεται στην στερεή λόγω της καταβύθισης. Μετά τις 36 ώρες, ο περισσότερος όγκος του υπερκείμενου υγρού αναρροφήθηκε με χρήση αντλίας και το ίζημα το οποίο συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση (5110 g, 40 min, 4 °C) διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο όγκο απιονισμένου ύδατος. Τέλος, έγινε διαπίδυση του πρωτεϊνικού διαλύματος έναντι 20 L διαλύματος 1 mM *Tris-HCl*, pH 7.5 για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4 °C υπό ανάδευση.

4^ο Βήμα: Θερμική κατεργασία του πρωτεϊνικού διαλύματος σε υψηλό pH.

Το πρωτεϊνικό διάλυμα που υπέστη διαπίδυση φυγοκεντρήθηκε σε υψηλές στροφές (34540 g, 15 min, 4 °C) ώστε να απομακρυνθούν συσσωματώματα.

Στο υπερκείμενο, προστέθηκε:

- Φρέσκο διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M, pH 7.0 σε αναλογία 1/9 του όγκου του υπερκείμενου.
- Διάλυμα *EDTA* 0.1 M, pH 7.0 όγκου ίσου με 5×10^{-3} του υπερκείμενου ύστερα από την προσθήκη της β-μερκαπτοαιθανόλης.

Έπειτα, έγινε ρύθμιση του *pH* του πρωτεϊνικού διαλύματος στο 8.8 με προσθήκη διαλύματος *Tris* 2 M. Το μίγμα στη συνέχεια επωάστηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C για μία ώρα με ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Το πρωτεϊνικό διάλυμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε ρύθμιση του *pH* στο 7.0 με προσθήκη διαλύματος CH_3COOH 1 N. Το πρωτεϊνικό διάλυμα φυγοκεντρήθηκε (34540 g, 10 min, 4 °C) και το υπερκείμενο ογκομετρήθηκε.

5^ο Βήμα: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της *rmGPb*

Η κρυστάλλωση της *rmGPb* επετεύχθη με προσθήκη 1 mL διαλύματος AMP 0.1 M, *pH* 7.0 και διαλύματος $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1 M, *pH* 7.0 για κάθε 100 mL υπερκείμενου διαλύματος. Το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετήθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρωσης και αφέθηκε σε θερμοκρασία 4 °C για 16 ώρες ώστε να κρυσταλλωθεί. Την επόμενη μέρα, οι κρύσταλλοι συλλέχτηκαν με φυγοκέντρωση (28710 g, 10 min, 4 °C) και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με τον ελάχιστο δυνατό όγκο διαλύματος 50:50:1 (50 mM β-φωσφορική γλυκερόλη, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM EDTA, *pH* 6.8) σε θερμοκρασία 30 °C και ακολούθησε διαύγαση με φυγοκέντρωση (28710 g, 10 min, 30 °C). Η πρώτη ανακρυστάλλωση έγινε με την προσθήκη διαλύματος AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ όπως ακριβώς και η κρυστάλλωση. Το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετήθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρωσης και αφέθηκε σε θερμοκρασία 4 °C για τουλάχιστον 6 ώρες. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε τρεις φορές με προσθήκη διαλύματος AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ και δύο φορές απουσία διαλύματος AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

6^ο Βήμα: Αποθήκευση της *rmGPb*

Μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση, οι κρύσταλλοι της *rmGPb* συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση όπως και προηγουμένως και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστον δυνατό όγκο διαλύματος 50:50:1 (χρειάστηκαν 1 - 3 mL). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της *rmGPb* έγινε με φασματοφωτομέτρηση του δείγματος σε μήκος κύματος 280 nm και εφαρμογή του νόμου Beer-Lambert γνωρίζοντας ότι για την *rmGPb*, $\epsilon = 1.32 \text{ mL} \times \text{cm}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. Τέλος, η αποθήκευση του ενζύμου έγινε σε θερμοκρασία -20 °C ύστερα από την προσθήκη ίσου όγκου γλυκερόλης

4.5.2. *hlGPb*: Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης *hlGPb* στο *E. coli*

Η βελτιστοποιημένη νουκλεοτιδική αλληλουχία που κωδικοποιεί την ανθρώπινη ηπατική GP (*Eurofins genomics*), βρίσκεται κλωνοποιημένη σε φορέα έκφρασης *pETM-11* ο οποίος

προσδίδει στη συντιθέμενη πρωτεΐνη μια ετικέτα έξι ιστιδινών (*His*)₆ που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης.

4.5.2.1. Παραγωγή της ανασυνδυασμένης *hlGPb* στο *E. coli*

Το πλασμίδιο εισήχθη σε χημειοδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* στελέχους *BL21-GOLD (DE3)* μέσω θερμικού σοκ και ποσότητα των κυττάρων επιστρώθηκε σε τρυβλία *Petri* σε στερεό θρεπτικό υλικό (*LB-Agar*) παρουσία καναμυκίνης σε συγκέντρωση $34 \mu\text{g}/\text{mL}$. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στην στερεή καλλιέργεια διαλέξαμε μια και την αφήσαμε να αναπτυχθεί σε υγρό θρεπτικό υλικό (*LB-broth*, κατά *Miller*) παρουσία $34 \mu\text{g}/\text{mL}$ καναμυκίνης, $600 \text{ mg}/\text{L}$ MnCl_2 και $100 \text{ mg}/\text{L}$ πυριδοξίνης. Η υγρή καλλιέργεια αναπτύχθηκε σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 rpm) σε θερμοκρασία 37°C για 16 h . Την επόμενη ημέρα, 10 mL από την καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη με αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό *LB-Broth*, όγκου 1 L αφού πρώτα έγινε η προσθήκη $34 \mu\text{g}/\text{mL}$ καναμυκίνης, $600 \text{ mg}/\text{L}$ MnCl_2 και $100 \text{ mg}/\text{L}$ πυριδοξίνης. Από το παραπάνω μίγμα, πριν την προσθήκη των βακτηριακών κυττάρων, έγινε λήψη 1 mL ως τυφλού μάρτυρα για την παρακολούθηση της ανάπτυξης της καλλιέργειας μέσω φασματοφωτομετρίας ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε επωαστήρα υπό ανακίνηση, όπως και πριν, έως ότου η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm έφτασε την τιμή $0.6 - 0.7$. Τότε, η κωνική φιάλη απομακρύνθηκε από τον επωαστήρα και τοποθετήθηκε σε πάγο για να ψυχθεί έως ότου η θερμοκρασία της έφτασε περίπου τους $15-18^\circ\text{C}$. Για να επιτευχθεί η υπερέκφραση του γονιδίου έγινε προσθήκη *IPTG* σε συγκέντρωση 0.5 mM και η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 rpm) σε θερμοκρασία 16°C για 16 h . Η συλλογή των βακτηριακών κυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση (6000 rpm , 30 min , 4°C).

4.5.2.2. Καθαρισμός και απομόνωση της ανασυνδυασμένης *hlGPb*

Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης που περιείχε 20 mM $\beta\text{-glycerol phosphate}$, 0.5 M NaCl , 20 mM imidazole , $\text{pH } 6.8$. Πριν την έναρξη της λύσης προστέθηκε 1 mM PMSF (αναστολέας πρωτεασών). Η λύση των κυττάρων έγινε με εφαρμογή υπερήχων ($70\% \text{ amplitude}$, 30 sec εφαρμογή / 30 sec παύση, 4°C για πέντε κύκλους) και στη συνέχεια προστέθηκε βενζονάση και το μίγμα έμεινε για 10 min σε θερμοκρασία 4°C . Ακολούθησε φυγοκέντρηση (19000 rpm , 45 min , 4°C) και το υπερκείμενο, αφού πρώτα πέρασε από φίλτρο με πόρους διαμέτρου $0.45 \mu\text{m}$, υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών *AKTA-FPLC (GE, HealthCare)*. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα

στάδια είχαν φιλτραριστεί από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.2 μm και απαερωθεί σε υδατόλουτρο υπερήχων. Η διαδικασία του καθαρισμού πραγματοποιήθηκε στους 4 °C.

1^ο Βήμα καθαρισμού: HiTrap TALON crude (IMAC με ακινητοποιημένα Co^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης, GE HealthCare)

Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα A (Πίνακας 14) με τουλάχιστον δέκα όγκους στήλης. Η εφαρμογή του κυτταρολύματος έγινε με ροή 0.3 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL (*flow through*). Η πλύση της στήλης έγινε με 10 - 15 όγκους στήλης με εφαρμογή διαλύματος A με ροή 0.5-0.7 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL (*wash*). Η έκλυση των προσδεμένων πρωτεϊνών έγινε με εφαρμογή διαλύματος B (Πίνακας 14) και συλλέχθηκαν δείγματα του 1 mL . Η πορεία του καθαρισμού αξιολογήθηκε με ανάλυση των κλασμάτων σε SDS-PAGE. Τα κλάσματα τα οποία περιείχαν την πρωτεΐνη συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιείχε 20 mM Tris-HCl και 1 mM DTT, pH 7.5.

Πίνακας 14: Σύσταση διαλυμάτων για το πρώτο βήμα καθαρισμού της hIGPb.

Διάλυμα A, pH 6.8	Διάλυμα B, pH 6.8
20 mM β -glycerol phosphate	20 mM β -glycerol phosphate
0.5 M NaCl	0.5 M NaCl
20 mM imidazole	0.5 M imidazole

2^ο Βήμα καθαρισμού: Resource Q (Στήλη ανιοανταλλαγής, GE HealthCare)

Η στήλη resource Q εξισορροπήθηκε με διάλυμα A (Πίνακας 15) για τουλάχιστον δέκα όγκους στήλης. Η εφαρμογή του δείγματος έγινε με ροή 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL (*flow through*). Η πλύση της στήλης έγινε με διάλυμα A για 10 - 15 όγκους στήλης και έγινε συλλογή κλασμάτων όγκου 5 mL (*wash*). Η έκλυση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος B (Πίνακας 15). Πιο συγκεκριμένα η έκλυση έγινε με 0 - 40 % διαλύματος B σε χρονικό διάστημα 40 min και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 mL δηλαδή, σε κάθε κλάσμα η συγκέντρωση του NaCl αυξανόταν κατά 20 mM .

Πίνακας 15: Σύσταση διαλυμάτων για το δεύτερο βήμα καθαρισμού της hIGPb.

Διάλυμα A, pH 7.5	Διάλυμα B, pH 7.5
20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl
1 mM DTT	1 mM DTT
	1 M NaCl

Η πορεία του καθαρισμού αξιολογήθηκε με ανάλυση των κλασμάτων σε SDS-PAGE. Τα κλάσματα που περιείχαν την hIGPb συλλέχθηκαν και προστέθηκε σε αυτά η πρωτεάση TEV-(His)₆ σε αναλογία 1 mg πρωτεάση TEV-(His)₆ για 40 mg ολικών πρωτεϊνών ώστε να

επιτευχθεί η τμήση της ετικέτας συγγένειας. Η επώαση με την πρωτεάση *TEV-(His)₆* έγινε για 16 h σε θερμοκρασία 4 °C.

3^ο Βήμα καθαρισμού: HisTrap FF, 5 mL (IMAC με ακινητοποιημένα Ni²⁺, GE HealthCare)

Μετά την επώαση με την πρωτεάση *TEV-(His)₆* ακολούθησε εφαρμογή του δείγματος σε στήλη IMAC με ακινητοποιημένα Ni²⁺ ώστε να απομακρυνθεί η άτμητη *hIGPb*. Η επιλογή της στήλης με Ni²⁺ αντί για Co²⁺, που χρησιμοποιήθηκε πριν, έγινε λόγω της μεγάλης ευαισθησίας της τελευταίας σε ισχυρούς αναγωγικούς παράγοντες όπως το DTT. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα A (Πίνακας 16) για τουλάχιστον δέκα όγκους στήλης. Η εφαρμογή του δείγματος έγινε με ροή 0.3 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL (*flow through*). Η πλύση της στήλης έγινε για 10-15 όγκους στήλης με εφαρμογή διαλύματος A με ροή 0.5-0.7 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL (*wash*). Η έκλουση της άτμητης πρωτεΐνης και της πρωτεάσης *TEV-(His)₆* έγινε με εφαρμογή διαλύματος B (Πίνακας 16) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL.

Πίνακας 16: Σύσταση διαλυμάτων για το τρίτο βήμα καθαρισμού της *hIGPb*.

Διάλυμα A, pH 7.5	Διάλυμα B, pH 7.5
20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl
1 mM DTT	1 mM DTT
0.3 M NaCl	0.3 M NaCl
	0.5 M imidazole

Η πορεία του καθαρισμού αξιολογήθηκε με ανάλυση των κλασμάτων σε SDS-PAGE. Τα κλάσματα τα οποία περιείχαν την πρωτεΐνη συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης (με κατώφλι 30 kDa) και αφού έγινε προσθήκη ίσου όγκου γλυκερόλης, η πρωτεΐνη αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -20 °C

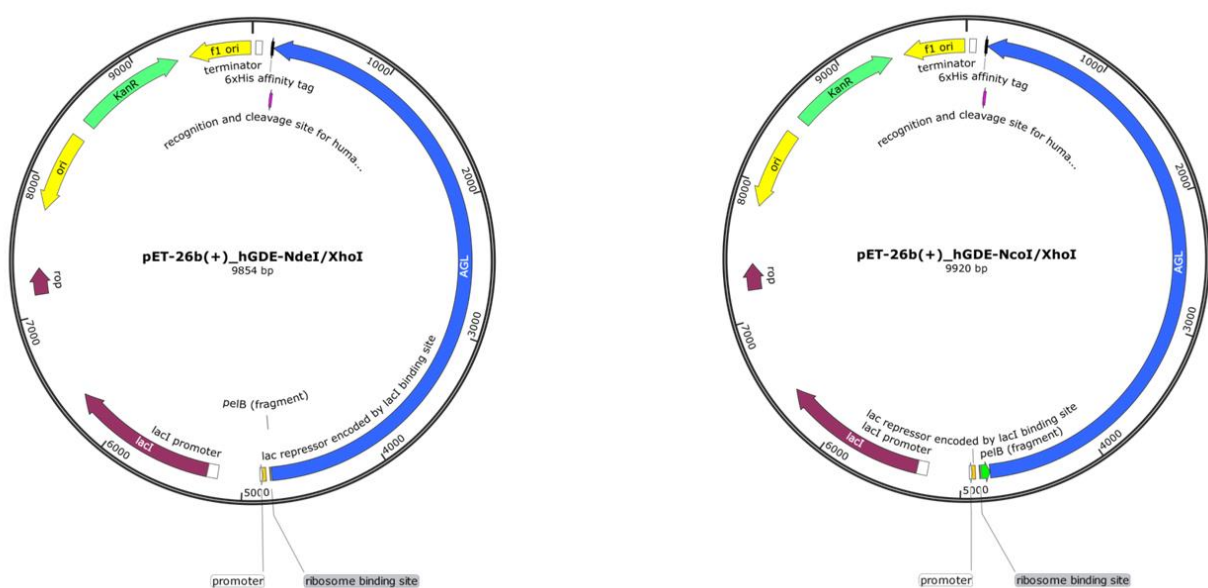
4.6. ΠΑΡΑΓΩΓΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΑΠΟΔΙΑΚΛΑΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

4.6.1. *hGDE*: Δοκιμές έκφρασης και παραγωγής διαλυτής πρωτεΐνης. Απομόνωση και καθαρισμός του *hGDE*

4.6.1.1. Δοκιμές έκφρασης και διαλυτότητας στο *hGDE* για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης

Η βελτιστοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που κωδικοποιεί την ισομορφή 1 του *hGDE* έγινε από την εταιρεία GenScript ώστε να αποφευχθούν τυχόν προβλήματα που δημιουργούνται από τη παρουσία των σπάνιων κωδικονίων, όπως αναλύθηκε παραπάνω (Βλ

παράγραφο 4.1.1.1.1). Η αλληλουχία αυτή κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης *pET26b* ο οποίος προσδίδει στην πρωτεΐνη μια σηματοδοτική αλληλουχία (*pelB*) για μεταφορά της πρωτεΐνης στο περίπλασμα (Βλ παράγραφο 4.1.1.1.2) και μια ετικέτα (*His*)₆ στο C-τελικό της άκρο για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης μέσω χρωματογραφίας. Επιπλέον, κατά τη σύνθεση του γονιδίου τοποθετήθηκε μια αλληλουχία αναγνώρισης και τμήσης από τη πρωτεάση 3C μεταξύ της πρωτεΐνης και της ετικέτας των ιστιδινών, ώστε να είναι εφικτή η απομάκρυνση τους εάν είναι επιθυμητό. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία κλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης είτε μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *NcoI/XhoI* για έκκριση και αναδίπλωση της πρωτεΐνης περίπλασμα είτε μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων *NdeI/XhoI* για αναδίπλωση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 38). Δοκιμάστηκαν οι βακτηριακές κυτταρικές σειρές *E. coli*: *BL21Gold*, *B834*, *B834pLysS*, *Rosetta 2* και *Origami*. Το γονίδιο εισήχθη στα βακτήρια μέσω χημικού μετασχηματισμού και ποσότητα των κυττάρων επιστρώθηκε σε τρυβλία *Petri* με στερεό θρεπτικό υλικό *LB-agar* παρουσία 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ καναμυκίνης. Για τις δοκιμές με τα στελέχη *B834pLysS* και *Rosetta 2*, στο στερεό θρεπτικό υλικό είχε προστεθεί επίσης 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ χλωραμφαινικόλη.



Εικόνα 38: Οι δύο φορείς στους οποίους κλωνοποιήθηκε το *hGDE* (το γονίδιο αναφέρεται ως *AGL*). Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε μεταξύ των θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων **Αριστερά**, *NdeI/XhoI* και **Δεξιά**, των *NcoI/XhoI*.

Την επόμενη ημέρα μια αποικία μεταφέρθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό *LB-broth* παρουσία των ίδιων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών αλλά και παρουσία 1 % w/v γλυκόζης. Η γλυκόζη προστέθηκε σε όλα τα πειράματα εκτός από εκείνα που έγινε χρήση του στελέχους *B834pLysS*, μιας και αυτά τα κύτταρα ενδείκνυνται για προβλήματα με διαρρέον πλασμίδιο (Βλ.

παράγραφο 4.1.1.1.2). Διάλυμα 50 % w/v γλυκόζης παρασκευάστηκε σε αποστειρωμένο ζεστό υγρό θρεπτικό υλικό *LB-broth* το οποίο έπειτα φιλτραρίστηκε από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.2 μm και προστέθηκαν τα αντιβιοτικά στις ίδιες συγκεντρώσεις με τις υγρές καλλιέργειες. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C για 16 h σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 rpm).

Έπειτα ποσότητα κυττάρων μεταφέρθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό σε αναλογία 1:100 παρουσία των ίδιων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών και γλυκόζης. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 rpm) έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600 nm έφτασε την τιμή ~ 0.6 . Η καλλιέργεια χωρίστηκε σε αποστειρωμένες υάλινες κωνικές φιάλες (10 mL σε κάθε κωνική φιάλη) και ακολούθησε προσθήκη *IPTG* σε συγκέντρωση 1 mM και επαγωγή της υπερέκφρασης σε θερμοκρασία 37 °C για 4 h σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 rpm). Υπερέκφραση έγινε επίσης σε θερμοκρασία 16 °C για 16 h σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 rpm). Σε αυτή τη περίπτωση η καλλιέργεια τοποθετήθηκε πρώτα σε πάγο και έπειτα έγινε η προσθήκη του *IPTG* σε συγκέντρωση 0.1 mM. Σε κάθε περίπτωση, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση μετά το πέρας της διάρκειας της επαγωγής της υπερέκφρασης (6000 rpm, 10 min, 4 °C). Το ίζημα από τα 10 mL καλλιέργειας διαλυτοποιήθηκε σε 1 mL διαλύματος λύσης το οποίο περιείχε 20 mM *Tris-HCl*, 0.3 M *NaCl*, 2 mM β -*Mercaptoethanol*, 1 mM *PMSF*, pH 7.5. Η λύση των κυττάρων έγινε με υπερήχους [(25 % amplitude, 10 sec εφαρμογή/ 10 sec παύση) x 2, 4 °C] και το διαλυτό κλάσμα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση (13000 rpm, 45 min, 4 °C). Σε δείγματα πριν και μετά τη φυγοκέντρηση, δηλαδή στο ολικό κυτταρόλυμα αλλά και στο διαλυτό κλάσμα έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο *Bradford*. Έπειτα, 30 μg πρωτεϊνών αναλύθηκαν σε *SDS-PAGE*. Η παρουσία της πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα δηλώνει την παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης ενώ η παρουσία της μόνο στο ολικό κυτταρόλυμα δηλώνει ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται στα έγκλειστα σώματα.

4.6.1.1.1. Βελτιστοποίηση της διαλυτότητας του *hGDE*.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (βλ. παράγραφο 4.1.1.1.2), η χρήση του κατάλληλου διαλύματος λύσης μπορεί να επηρεάσει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό ελέγξαμε διάφορα διαλύματα λύσης (Πίνακας 17) τα οποία βρίσκονται στον ιστότοπο του *EMBL* [196]. Η διαδικασία λύσης των βακτηριών έγινε όπως στην προηγούμενη παράγραφο.

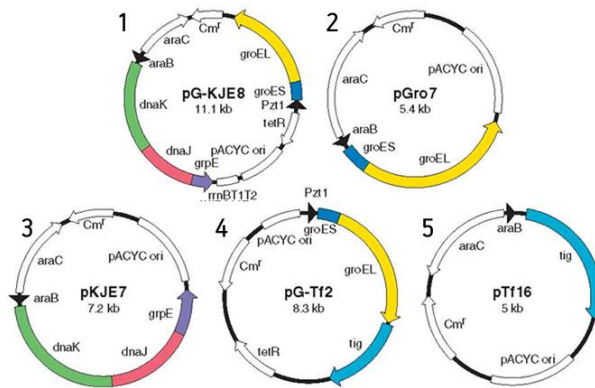
Πίνακας 17: Τα διάφορα διαλύματα λύσης που χρησιμοποιήθηκαν [196].

0-: (-IPTG) 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.3 M NaCl, 2mM β-Merc	11: 10: 50 mM Tris pH 7.5, 1 M KCl
0+: (+IPTG) 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.3 M NaCl, 2mM β-Merc	12: 50 mM Tris pH 7.5, 0.5 M Urea, 50 mM NaCl
1: 50 mM Na Acetate pH 5, 50 mM NaCl	13: 50 mM Tris pH 7.5, 1 M Urea, 50 mM NaCl
2: 50 mM MES pH 6, 50 mM NaCl	14: 50 mM Tris pH 7.5, 2 M Urea, 50 mM NaCl
3: 50 mM Tris pH 7, 50 mM NaCl	15: 50 mM Tris pH 7.5, 3 M Urea, 50 mM NaCl
4: 50 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl	16: 50 mM Tris pH 7.5, 4 M Urea, 50 mM NaCl
5: 50 mM Tris pH 9, 50 mM NaCl	17: 50 mM Tris pH 7.5, 5 M Urea, 50 mM NaCl
6: 50 mM Tris pH 7.5, 0.1 M NaCl	18: 50 mM Tris pH 7.5, 6 M Urea, 50 mM NaCl
7: 50 mM Tris pH 7.5, 0.5 M NaCl	19: 20mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.2 % v/v Triton X-100
8: 50 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl	20: 20mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.2 % v/v Tween-20
9: 50 mM Tris pH 7.5, 2 M NaCl	21: 20mM Tris HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 10 % v/v Glycerol
10: 50 mM Tris pH 7.5, 0.1 M KCl	22: 20mM Tris HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 50 % Glycerol

4.6.1.1.2. Συν-έκφραση με μοριακές συνοδούς

Η συν-έκφραση με μοριακές συνοδούς έγινε με σκοπό να επιτύχουμε την παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης. Χρησιμοποιήσαμε το *chaperone plasmid set* της εταιρείας *TaKaRa*, το οποίο αποτελείται από πέντε διαφορετικά πλασμίδια που κωδικοποιούν μοριακές συνοδούς ή συνδυασμό διαφορετικών μοριακών συνοδών όπως φαίνεται στην Εικόνα 39. Κύτταρα *E. coli BL21Gold* στα οποία είχαν εισαχθεί τα πλασμίδια για τις μοριακές συνοδούς (ένα κάθε φορά), μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο που κωδικοποιεί για το *hGDE* με ηλεκτροδιάτρηση. Κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία *Petri* σε στερεό θρεπτικό υλικό *LB-agar* παρουσία 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ καναμυκίνη, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ χλωραμφαινικόλη και αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C για 16 h. Την επόμενη ημέρα, μια αποικία μεταφέρθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό *LB-broth* παρουσία των ίδιων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών και 1 % (w/v) γλυκόζης. Επιπλέον, ανάλογα το πλασμίδιο (Εικόνα 39), έγινε προσθήκη L-αραβινόζης σε συγκέντρωση 0.5 mg/mL ή/και τετρακυκλίνης σε συγκέντρωση 5 ng/mL ώστε να ξεκινήσει η παραγωγή των μοριακών συνοδών πριν την επαγωγή της έκφρασης του *hGDE*. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C για 16 h σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 *rpm*) [168]. Την επόμενη η μέρα, ποσότητα κυττάρων προστέθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό *TB (Terrific Broth)* σε αναλογία 1:100 παρουσία των ίδιων συνθηκών. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 *rpm*) έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600 *nm* έφτασε την τιμή ~ 0.5. Τότε, οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν για λίγη ώρα σε πάγο και η υπερέκφραση έγινε με *IPTG* σε συγκέντρωση 0.1 *mM*, σε θερμοκρασία 16 °C για 16 h σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 *rpm*).

No.	Πλασμίδιο	Μοριακές συνοδοί	Υποκινητής	Επαγωγέας	Αντιβιοτικό επιλογής
1	pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL	araB Pzt-1	L-Αραβινόζη Τετρακυκλίνη	Χλωραμφαινικόλη
2	pGro7	groES-groEL	araB	L-Αραβινόζη	Χλωραμφαινικόλη
3	pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	araB	L-Αραβινόζη	Χλωραμφαινικόλη
4	pG-Tf2	groES-groEL-tig	Pzt-1	Τετρακυκλίνη	Χλωραμφαινικόλη
5	pTf16	tig	araB	L-Αραβινόζη	Χλωραμφαινικόλη



Εικόνα 39: Τα πλασμίδια που κωδικοποιούν τις μοριακές συνοδούς (*TaKaRa Chaperone plasmid set*).

Οι μοριακές μάζες των μοριακών συνοδών είναι:	<i>GroEL</i>	60 kDa
	<i>GroES</i>	10 kDa
	<i>DnaK</i>	70 kDa
	<i>DnaJ</i>	40 kDa
	<i>Tf</i>	56 kDa
	<i>GrpE</i>	22 kDa

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 10 min, 4 °C) και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης το οποίο περιείχε 20 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 2 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, pH 7.5. Η λύση των κυττάρων έγινε με υπερήχους [(25 % amplitude, 10 sec εφαρμογή/ 10 sec παύση) x2, 4 °C] και το διαλυτό κλάσμα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση (13000 rpm, 45 min, 4 °C). Σε δείγματα πριν και μετά τη φυγοκέντρηση, δηλαδή το ολικό κυτταρόλυμα αλλά και το διαλυτό κλάσμα έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Έπειτα 30 μg πρωτεϊνών αναλύθηκαν σε SDS-PAGE. Η παρουσία της πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα δηλώνει την παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης ενώ η παρουσία της μόνο στο ολικό κυτταρόλυμα δηλώνει ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται στα έγκλειστα σώματα.

4.6.1.1.3. Παραγωγή του ανασυνδυασμένου *hGDE* στον περιπλασματικό χώρο του *E. coli*

Για την παραγωγή του *hGDE* στον περιπλασματικό χώρο του *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο στο οποίο το γονίδιο του *hGDE* έχει κλωνοποιηθεί στις θέσεις που αναγνωρίζονται

από τα περιοριστικά ένζυμα *NcoI/XhoI*. Η πρωτεΐνη έφερε στο *N*-τελικό της άκρο μια σηματοδοτική αλληλουχία ώστε να μεταφερθεί στο περίπλασμα για να αναδιπλωθεί (Βλ. παράγραφο 4.1.1.2). Εκεί, η σηματοδοτική αλληλουχία θα αποκοπεί και η πρωτεΐνη θα αναδιπλωθεί. Το πλασμίδιο εισήχθη στα διάφορες βακτηριακές κυτταρικές σειρές *E. coli* (*BL21Gold*, *B834*, *B834pLysS*, *Rosetta 2*) και η διαδικασία χειρισμού και ανάπτυξης τους είναι ίδια όπως αναφέρεται παραπάνω (Βλ. παράγραφο 4.6.1.1). Η εξαγωγή των πρωτεϊνών από τον περιπλασματικό χώρο δεν έγινε με εφαρμογή υπερήχων αλλά με ωσμωτική λύση. Αρχικά, τα βακτήρια διαλυτοποιήθηκαν και επωάστηκαν για ~ 20 min σε θερμοκρασία 4 °C σε υπέρτονο διάλυμα (25 mL για 1 L καλλιέργεια) το οποίο περιείχε 30 mM *Tris-HCl* pH 8.0, 20 % w/v σουκρόζη, 1 mM *EDTA*. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (13000 rpm, 4 °C, 30 min), φυλάξαμε το διαλυτό κλάσμα και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε και επωάστηκε σε υπότονο διάλυμα το οποίο περιείχε 5 mM *MgSO₄* σε θερμοκρασία 4 °C για ~ 20 min (25 mL για 1 L καλλιέργεια). Με φυγοκέντρηση (13000 rpm, 4 °C, 30 min), παραλάβαμε το διαλυτό κλάσμα το οποίο αναμίχθηκε με το αντίστοιχο κλάσμα από την λύση με το υπέρτονο διάλυμα. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε *SDS-PAGE*. Επιπλέον, έγιναν δοκιμές για αύξηση της απόδοσης της παραγωγής της πρωτεΐνης στο περίπλασμα και της έκκρισης της στο θρεπτικό υλικό, με προσθήκη 1 % w/v γλυκίνης ή μίγματος 1 % w/v γλυκίνης, 5 % w/v σουκρόζης, 1 % w/v *Triton X-100*, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [188-190]. Τα πυκνά διαλύματα των παραπάνω συστατικών είχαν διαλυτοποιηθεί σε υγρό θρεπτικό υλικό *TB* ώστε η προσθήκη τους να μην επηρεάσει τη σύσταση του θρεπτικού υλικού. Η γλυκίνη προστέθηκε όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600 nm ήταν ~0.3 ενώ η σουκρόζη και το *Triton X-100* όταν η οπτική πυκνότητα ήταν ~ 0.6-0.7, πριν την επαγωγή της υπερέκφρασης. Η προσθήκη της γλυκίνης έγινε περίπου στη μέση της φάσης ανάπτυξης των βακτηρίων καθώς φαίνεται να οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκκρισης στο θρεπτικό υλικό [230]. Με τη μέθοδο αυτή, πρέπει να εκτιμηθεί και η βιωσιμότητα των κυττάρων καθώς και αν έχει αποκοπεί η σηματοδοτική αλληλουχία κατά τη μεταφορά της πρωτεΐνης στον περιπλασματικό χώρο.

4.6.1.2. Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ανασυνδυασμένου *hGDE* στο κυτταρόπλασμα των βακτηριακών κυττάρων

4.6.1.2.1. Παραγωγή του ανασυνδυασμένου *hGDE* στο κυτταρόπλασμα των βακτηριακών κυττάρων

Η βελτιστοποιημένη νουκλεοτιδική αλληλουχία (*GenScript*) που κωδικοποιεί την ισομορφή 1 του *hGDE* βρίσκεται κλωνοποιημένη σε φορέα έκφρασης *pET-26b* μεταξύ των θέσεων που αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα *NdeI/XhoI*. Ο φορέας έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε στο C-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης που θα παραχθεί και πριν την ετικέτα (*His*)₆ να υπάρχει μια περιοχή αναγνώρισης και τμήσης από την πρωτεάση 3C ώστε να αποκοπεί η ετικέτα (*His*)₆ εάν το επιθυμούμε. Οι ετικέτα (*His*)_{x6} θα χρησιμοποιηθεί κατά τον καθαρισμό του ενζύμου. Το πλασμίδιο εισήχθη με ηλεκτροδιάτρηση σε κύτταρα *BL21Gold* τα οποία είχαν πρώτα μετασχηματιστεί με άλλα πλασμίδια ώστε να επιτευχθεί συνέκφραση με τη μοριακή συνοδό *trigger factor* ή τις μοριακές συνοδούς *GroES/EL* (πλασμίδιο 5 και 2 αντίστοιχα, βλ. παράγραφο 4.6.1.1.2 και 4.1.1.1.2). Ποσότητα των κυττάρων επιστρώθηκε σε τρυβλία *Petri* σε στερεό θρεπτικό υλικό *LB-Agar* παρουσία 34 $\mu\text{g/ml}$ καναμυκίνης και 20 $\mu\text{g/ml}$ χλωραμφαινικόλης. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C για 16 h. Την επόμενη ημέρα, μια αποικία μεταφέρθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό *LB-Broth* (κατά *Miller*) και τα βακτήρια αναπτύχθηκαν παρουσία των ίδιων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών με επιπλέον προσθήκη 0.5 mg/mL L-αραβινόζης (για την επαγωγή της υπερέκφρασης της/των μοριακών συνοδών) και 1 % w/v γλυκόζης (για προβλήματα με διαρρέον πλασμίδιο, βλ. παράγραφο 4.1.1.1.2 και 4.6.1.1.2) για 16 h σε θερμοκρασία 37 °C σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 rpm). Την επόμενη ημέρα 7.5 mL από την καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό *Terrific broth* όγκου 750 mL στο οποίο είχαν πρώτα προστεθεί 34 $\mu\text{g/ml}$ καναμυκίνη, 20 $\mu\text{g/ml}$ χλωραμφαινικόλη, 0.5 mg/mL L-αραβινόζη και 1 % w/v γλυκόζη. Το μίγμα τοποθετήθηκε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 rpm) σε θερμοκρασία 37 °C έως ότου η οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 600 nm έφτασε την τιμή 0.5. Τότε, οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε πάγο και η επαγωγή της υπερέκφρασης του γονιδίου έγινε με προσθήκη *IPTG* σε συγκέντρωση 0.1 mM. Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 rpm) για 16 h σε θερμοκρασία 15 °C. Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε συλλογή των βακτηριακών κυττάρων με φυγοκέντρηση (6000 rpm, 30 min, 4 °C).

4.6.1.2.2. Καθαρισμός και απομόνωση του *hGDE*

Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων διαλυτοποιήθηκε σε ~ 20 mL διαλύματος λύσης το οποίο περιείχε 50 mM *sodium phosphate pH 8.0*, 0.3 M *NaCl*, 2 mM *DTT*, 5 % (v/v) γλυκερόλη, 10 mM υιδαζόλιο. Το pH του διαλύματος λύσης ρυθμίστηκε στο 8.0, φιλτραρίστηκε με φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.2 μm και πριν την διαλυτοποίηση των κυττάρων έγινε προσθήκη 1 mM *PMSF*. Η διαλυτοποίηση των κυττάρων έγινε σε θερμοκρασία 4 °C και η λύση τους με

εφαρμογή υπερήχων (70 % *amplitude*, 30 *sec* εφαρμογή / 30 *sec* παύση, 4 °C για πέντε κύκλους). Στη συνέχεια προστέθηκε βενζονάση και το δείγμα έμεινε για 10 *min* σε θερμοκρασία 4 °C. Ακολούθως, παραλάβαμε το διαλυτό κλάσμα με φυγοκέντρηση (19000 *rpm*, 45 *min*, 4 °C) και το φιλτράραμε με φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.45 μm . Το τελικό δείγμα υποβλήθηκε σε καθαρισμό με χρήση του συστήματος *AKTA-FPLC* (GE, HealthCare) σε θερμοκρασία 4 °C. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα στάδια είχαν φιλτραριστεί από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.2 μm και απαερωθεί σε υδατόλουτρο υπερήχων.

1^ο Βήμα καθαρισμού: HisTrap FF, 5 mL (IMAC με ακινητοποιημένα Ni²⁺, GE HealthCare)

Η εξισορρόπηση του υλικού της στήλης έγινε με διάλυμα A (Πίνακας 18) με τουλάχιστον δέκα όγκους στήλης. Το δείγμα εφαρμόστηκε στη στήλη με ροή 0.3 *mL/min* και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 *mL* (*flow through*). Ακολούθησε πλύση της στήλης με διάλυμα A με ροή 0.5 – 0.7 *mL/min* για ~ 10-15 όγκους στήλης και έγινε συλλογή κλασμάτων όγκου των 5 *mL* (*wash*). Η έκλυση των προσδεσμένων πρωτεϊνών από τη στήλη έγινε με διάλυμα B (Πίνακας 18) και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 *mL*.

Πίνακας 18: Σύσταση διαλυμάτων για το πρώτο βήμα καθαρισμού του *hGDE*.

Διάλυμα A, pH 8.0	Διάλυμα B, pH 8.0
50 <i>mM sodium phosphate pH 8.0</i>	50 <i>mM sodium phosphate pH 8.0</i>
0.3 <i>M NaCl</i>	0.3 <i>M NaCl</i>
2 <i>mM DTT</i>	2 <i>mM DTT</i>
5 % (v/v) <i>glycerol</i>	5 % (v/v) <i>glycerol</i>
10 <i>mM imidazole</i>	250 <i>mM imidazole</i>

Η πορεία του καθαρισμού αξιολογήθηκε με ανάλυση των κλασμάτων σε *SDS-PAGE*. Επιπλέον, στα κλάσματα που περιείχαν το *hGDE* έγιναν δοκιμές δραστηριότητας ώστε να ταυτοποιηθεί αν η πρωτεΐνη ήταν καταλυτικά ενεργή. Τα δραστικά κλάσματα συγκεντρώθηκαν και υποβλήθηκαν σε διαπίδυση για 16 *h* σε θερμοκρασία 4 °C έναντι διαλύματος το οποίο περιείχε 20 *mM Tris-HCl*, 50 *mM NaCl*, 2 *mM DTT* και 5 % (v/v) γλυκερόλη, pH 8.0 με χρήση μεμβρανών διαπίδυσης με πόρους διαμέτρου 10 *kDa*.

2^ο Βήμα καθαρισμού: HiTrap Q HP, 5 mL (IEC, GE HealthCare)

Η στήλη εξισορροπήθηκε με διάλυμα A (Πίνακας 19) για τουλάχιστον δέκα όγκους στήλης. Το δείγμα εφαρμόστηκε με ροή 0.5 *mL/min* και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 *mL* (*flow through*). Η πλύση της στήλης έγινε με ροή 1 - 1.7 *mL/min* με εφαρμογή διαλύματος A για 10-15 όγκους στήλης και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 *mL* (*wash*). Η έκλυση των συνδεσμένων πρωτεϊνών έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος B (Πίνακας 19). Πιο συγκεκριμένα, η έκλυση έγινε με εφαρμογή 0 - 50 % διαλύματος B, με ροή 1.25 *mL/min* σε συνολικό χρονικό

διάστημα 132 *min* και συλλέχθηκαν κλάσματα των 2.5 *mL*. Η αξιολόγηση της πορείας καθαρισμού έγινε με ανάλυση των κλασμάτων σε *SDS-PAGE* και δοκιμές δραστηριότητας. Τα δραστικά κλάσματα τα οποία περιείχαν το *hGDE* συμπυκνώθηκαν με φυγοκέντρηση με φίλτρο συμπύκνωσης (με κατώφλι 30 *kDa*) ώστε το ένζυμο να χρησιμοποιηθεί για κινητικές μελέτες και δοκιμές κρυστάλλωσης.

Πίνακας 19: Σύσταση διαλυμάτων για το δεύτερο βήμα καθαρισμού του *hGDE*.

Διάλυμα Α, pH 8.0	Διάλυμα Β, pH 8.0
20 <i>mM</i> Tris-HCl	20 <i>mM</i> Tris-HCl
50 <i>mM</i> NaCl	1 <i>M</i> NaCl
2 <i>mM</i> DTT	2 <i>mM</i> DTT
5 % (v/v) glycerol	5 % (v/v) glycerol

4.6.2. *CgGDE*: Παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός του ανασυνδυασμένου *CgGDE* στο *E. coli*

Το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου από *Candida glabrata* απομονώθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στη βιβλιογραφία με τροποποιήσεις [44] αλλά και με μια διαφορετική μεθοδολογία. Η αλληλουχία που κωδικοποιεί το *CgGDE* βρίσκεται κλωνοποιημένη σε φορέα έκφρασης *pET-26b(+)* ο οποίος προσδίδει στη πρωτεΐνη μια αλληλουχία (*His*)₆ στο C-τελικό της άκρο ώστε να χρησιμοποιηθεί κατά τον καθαρισμό της.

4.6.2.1. Παραγωγή, του ανασυνδυασμένου *CgGDE* στο *E. coli*

Το πλασμίδιο εισήχθη σε χημειοδεκτικά κύτταρα *E. coli*, στελέχους *Rosetta-2* μέσω θερμικού σοκ και ποσότητα κυττάρων επιστρώθηκε σε τρυβλία *Petri* σε στερεό θρεπτικό υλικό *LB-Agar* παρουσία 34 $\mu\text{g/ml}$ καναμυκίνης και 25 $\mu\text{g/ml}$ χλωραμφαινικόλης. Μια αποικία μεταφέρθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό *LB-broth* (κατά *Miller*) και τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύχθηκαν για 16 *h* σε θερμοκρασία 37 °C σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 *rpm*) παρουσία των ίδιων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών. Την επόμενη ημέρα, 10 *mL* από την καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε 1 *L* υγρού θρεπτικού μέσου *LB-Broth* παρουσία των ίδιων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών και τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 *rpm*) έως ότου η οπτική πυκνότητα ($\lambda = 600 \text{ nm}$) έφτασε την τιμή 0.6-0.7. Τότε, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πάγο και η επαγωγή της υπερέκφρασης έγινε με την προσθήκη *IPTG* σε τελική συγκέντρωση 0.3 *mM*. Η επαγωγή της υπερέκφρασης έγινε σε θερμοκρασία 16 °C σε επωαστήρα υπό ανακίνηση (210 *rpm*) για 16 *h* και τα βακτηριακά κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (6000 *rpm*, 30 *min*, 4 °C).

4.6.2.2. Καθαρισμός και απομόνωση του ανασυνδυασμένου CgGDE σε τρία βήματα (IMAC, IEC, SEC).

Το CgGDE απομονώθηκε με βάση τη διαδικασία που αναφέρεται στη βιβλιογραφία με τροποποιήσεις [44]. Το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης που περιείχε 20 mM Tris-HCl, 0.3 M NaCl, 2 mM β-Μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM PMSF, pH 7.5. Η λύση των βακτηριακών κυττάρων έγινε με εφαρμογή υπερήχων (70 % amplitude, 30 sec εφαρμογή / 30 sec παύση, 4 °C για πέντε κύκλους) και ακολούθως προστέθηκε βενζονάση και το μίγμα έμεινε για 10 min σε θερμοκρασία 4 °C. Στη συνέχεια έγινε λήψη του διαλυτού κλάσματος με φυγοκέντρηση (19000 rpm, 45 min, 4 °C), το δείγμα πέρασε από φίλτρο με μέγεθος πόρων 0.45 μm και υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό με χρήση του συστήματος ÄKTA-FPLC (GE, HealthCare). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα στάδια είχαν φιλτραριστεί από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.2 μm και απαερωθεί σε υδατόλουτρο υπερήχων. Η διαδικασία του καθαρισμού πραγματοποιήθηκε στους 4 °C.

1^ο Βήμα καθαρισμού: HiTrap TALON crude 1 mL (IMAC με ακινητοποιημένα Co²⁺ σε σφαιρίδια σεφαρόζης, GE HealthCare)

Η εξισορρόπηση του υλικού της στήλης έγινε με διάλυμα A (Πίνακας 20) με τουλάχιστον δέκα όγκους στήλης. Η εφαρμογή του δείγματος έγινε με ροή 0.3 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL (flow through).

Πίνακας 20: Σύσταση διαλυμάτων για το πρώτο βήμα καθαρισμού του CgGDE.

Διάλυμα A, pH 7.5	Διάλυμα B, pH 7.5
20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl
0.3 M NaCl	0.3 M NaCl
	0.5 M imidazole

Η πλύση της στήλης έγινε με διάλυμα A με ροή 0.5 – 0.7 mL/min για 10 - 15 όγκους στήλης και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL (wash). Η έκλουση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών από τη στήλη έγινε εφαρμογή διαλύματος B (Πίνακας 20) και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 mL. Η πορεία του καθαρισμού αξιολογήθηκε με ανάλυση των κλασμάτων σε SDS-PAGE. Τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη συγκεντρώθηκαν και υποβλήθηκαν σε διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιείχε 20 mM Tris-HCl, 2 mM β-Μερκαπτοαιθανόλης και 5 % (v/v) γλυκερόλη, pH 7.5 με χρήση μεμβρανών διαπίδυσης με πόρους διαμέτρου 10 kDa, για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4 °C.

2^ο Βήμα καθαρισμού: HiTrap Q HP, 5 mL (IEC, GE HealthCare)

Η στήλη εξισορροπήθηκε με διάλυμα A (Πίνακας 21) για τουλάχιστον δέκα όγκους στήλης. Το δείγμα εφαρμόστηκε στη στήλη με ροή 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL (flow

through). Η πλύση της στήλης έγινε με ροή 2 mL/min με εφαρμογή διαλύματος A για 10-15 όγκους στήλης και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL (wash). Η έκλουση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος B (Πίνακας 21).

Πίνακας 21: Σύσταση διαλυμάτων για το δεύτερο βήμα καθαρισμού του CgGDE.

Διάλυμα A, pH 7.5	Διάλυμα B, pH 7.5
20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl
2 mM β-Mercaptoethanol	2 mM β-Mercaptoethanol
5 % (v/v) glycerol	5 % (v/v) glycerol
	1 M NaCl

Πιο συγκεκριμένα, η έκλουση έγινε με εφαρμογή 0 - 50 % διαλύματος B, με ροή 1.5 mL/min σε συνολικό χρονικό διάστημα 200 min. Η αξιολόγηση της πορείας καθαρισμού έγινε με SDS-PAGE και τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη συμπυκνώθηκαν με φυγοκέντρηση με φίλτρο συμπύκνωσης (με κατώφλι 100 kDa) στα 300 μL.

3^ο Βήμα καθαρισμού: Superdex S200 (SEC, GE HealthCare)

Το συμπυκνωμένο δείγμα υποβλήθηκε σε διάγνωση (16000 rpm, 4 °C, 30 min) και εφαρμόστηκε στη στήλη μοριακής διήθησης. Η στήλη εξισορροπήθηκε με διάλυμα που περιείχε 20 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 5 % (v/v) γλυκερόλη, 0.2 M NaCl, pH 7.5 με ροή 0.5 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με ροή 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Η αξιολόγηση της πορείας του καθαρισμού έγινε με SDS-PAGE και τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης (με κατώφλι 30 kDa).

4.6.2.3. Καθαρισμός και απομόνωση του CgGDE σε δύο βήματα (AC, SEC)

1^ο Βήμα καθαρισμού: β-CD sepharose 6B, ~ 12 mL

Η απομόνωση διεξήχθη σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στη βιβλιογραφία [199] καθώς το CgGDE αλλά και το αντίστοιχο ένζυμο από σακχαρομύκητα έχουν παρόμοιο μοριακό βάρος, ισοηλεκτρικό σημείο και μοιράζονται 70 % ομοιότητα στην αλληλουχία (Βλ. παράρτημα). Η διαδικασία παρασκευής της β-CD sepharose 6B αναφέρεται στην παράγραφο 4.3 και η διαδικασία της υπερέκφρασης του CgGDE είναι η ίδια που αναφέρεται στην προηγούμενη παράγραφο (4.6.2.1). Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης το οποίο περιείχε 20 mM Tris-HCl, 0.7 M Ammonium Sulfate, pH 7.5 και 1 mM PMSF. Η λύση των κυττάρων έγινε με χρήση υπερήχων (70 % amplitude, 30 sec εφαρμογή / 30 sec παύση, 4 °C για πέντε κύκλους) και ακολούθως προστέθηκε βενζονάση. Το μίγμα έμεινε για 10 min σε θερμοκρασία 4 °C και το διαλυτό κλάσμα παρελήφθη με φυγοκέντρηση (19000 rpm, 45 min, 4 °C). Το διαλυτό κλάσμα αφού φιλτραρίστηκε, με φίλτρο με μέγεθος πόρων 0.45 μm, υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό με χρήση του συστήματος ÄKTA-FPLC (GE,

HealthCare). Το διαλυτό κλάσμα εφαρμόστηκε σε στήλη β-CD sepharose 6B με ροή 0.3 mL/min και ακολούθησε η πλύση της στήλης με διάλυμα A (Πίνακας 22) με ροή 0.5 - 0.7 mL/min για ~ 10 όγκους στήλης.

Πίνακας 22: Σύσταση διαλυμάτων για το πρώτο βήμα καθαρισμού του CgGDE με χρήση στήλης β-CD sepharose 6B.

Διάλυμα A, pH 7.5	Διάλυμα B, pH 7.5
20 mM Tris-HCl	20 mM Tris-HCl
0.7 M Ammonium Sulfate	

Η έκλουση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών από τη στήλη έγινε με αύξηση διαβάθμισης διαλύματος B (Πίνακας 22). Πιο συγκεκριμένα, έγινε έκλουση με εφαρμογή 0 - 100 % διαλύματος B, με ροή 0.5 mL/min, για συνολικό διάστημα 200 min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 2 mL. Η αξιολόγηση της πορείας καθαρισμού έγινε με SDS-PAGE και τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη συγκεντρώθηκαν, συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης (με κατώφλι 30 kDa) σε συγκέντρωση ~ 12 mg/ml αφού πρώτα έγινε αλλαγή του διαλύματος σε 20 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 5 % (v/v) glycerol, 0.2 M NaCl, pH 7.5 με τη χρήση του φίλτρου.

2ο Βήμα καθαρισμού: Superdex S200 (SEC, GE HealthCare)

Το συμπυκνωμένο δείγμα υποβλήθηκε σε διαύγαση (16000 rpm, 4 °C, 30 min) και εφαρμόστηκε σε στήλη μοριακής διήθησης Superdex S200 η οποία είχε εξισορροπηθεί με διάλυμα το οποίο περιείχε 20 mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 5 % (v/v) glycerol, 0.2 M NaCl, pH 7.5 με ροή 0.5 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Η αξιολόγηση της πορείας του καθαρισμού έγινε με SDS-PAGE και τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης (με κατώφλι 30 kDa). Η πρωτεΐνη εμφάνισε υψηλή καθαρότητα και έγιναν δοκιμές κρυστάλλωσης.

4.7. ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

4.7.1. Κινητικές μελέτες στη GP

4.7.1.1. Φωσφορυλίωση των GPs από την rmPhK-γ-trunc

Η φωσφορυλίωση των α-1,4 φωσφορυλασών έγινε με χρήση της rmPhK-γ-trunc που παράγεται στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας σύμφωνα με πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί [231].

Για την φωσφορυλίωση της rmGPb και hIGPa χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο rmPhK-γ-trunc. Η φωσφορυλίωση έγινε σε θερμοκρασία 30 °C για 4 h και οι συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης φωσφορυλίωσης αναφέρονται στον Πίνακας 23. Η rmPhK-γ-trunc αραιώθηκε

αρχικά σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8.2 το οποίο περιείχε 50 mM Hepes, 50 mM Tris-HCl, 10 mM $(CH_3COO)_2Mg$, 0.5 mM $CaCl_2$, 2 mM DTT και 5 mg/ml BSA. Η ATP προστέθηκε τελευταία ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Για την *rmGPa* ο τερματισμός της αντίδρασης φωσφορυλίωσης έγινε με προσθήκη του μίγματος της αντίδρασης στον πάγο, ενώ για την *hlGPa* με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TEA pH 6.8 με κατάλληλο όγκο ώστε η συγκέντρωση του ενζύμου να γίνει 10 $\mu g/mL$. Όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, για τις κινητικές μελέτες, η *rmGPa* αραιώνεται επιπλέον με ρυθμιστικό διάλυμα και γλυκογόνο, ενώ στην *hlGPa* προστίθεται μόνο γλυκογόνο. Αυτή η διαφορά στον τρόπο τερματισμού της αντίδρασης οφείλεται στο γεγονός ότι οι ποσότητες της *hlGP* που απομονώνουμε και οι όγκοι που χρησιμοποιούμε είναι σημαντικά χαμηλότεροι από τους αντίστοιχους της *rmGP*. Επομένως, η αραιώση της αντίδρασης φωσφορυλίωσης της *hlGPa* με ρυθμιστικό διάλυμα TEA pH 6.8 εξασφαλίζει την αλλαγή του pH αλλά και τη μη περαιτέρω αραιώση του δείγματος με προσθήκη άλλου ρυθμιστικού διαλύματος (Βλ. παράγραφο 4.7.1.4). Ο έλεγχος της επιτυχίας της φωσφορυλίωσης για την *rmGPb* γίνεται με κινητικές μελέτες. Η *rmGPb* δεν είναι καθόλου δραστική απουσία της AMP ενώ η *rmGPa* εμφανίζει αύξηση στη δραστικότητα έως ~ 20 % παρουσία 1 mM AMP και 20 mM G1P συγκριτικά με δείγμα ελέγχου χωρίς AMP (Βλ. παράρτημα Διάγραμμα 6).

Πίνακας 23: Οι συνθήκες διεξαγωγής της φωσφορυλίωσης των *GPb*.

Συνθήκες της αντίδρασης φωσφορυλίωσης των <i>GPb</i>			
$\Theta = 30\text{ }^\circ\text{C}$, $T = 4\text{ h}$, $pH\ 8.2$			
<i>rmGPa</i>		<i>hlGPa</i>	
50 mM Tris-HCl	Ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.2	50 mM Tris-HCl	Ρυθμιστικό διάλυμα pH 8.2
50 mM Hepes		50 mM Hepes	
10 mM $(CH_3COO)_2Mg$		10 mM $(CH_3COO)_2Mg$	
0.5 mM $CaCl_2$		0.5 mM $CaCl_2$	
2 mM DTT		2 mM DTT	
2 mM ATP		1 mM ATP	
10 ng/ml <i>rmPhK-γ-trunc</i>		16 ng/ml <i>rmPhK-γ-trunc</i>	
0.5 mg/ml <i>rmGPb</i>		0.45 mg/ml <i>hlGPb</i>	
0.1 mg/ml BSA		0.3 mg/ml BSA	
~ 1000 μL		~ 50 μL	

4.7.1.2. Παρασκευή γλυκογόνου ελεύθερο νουκλεοτιδίων

45 g γλυκογόνο διαλυτοποιήθηκαν σε 900 mL απιονισμένου ύδατος και προστέθηκαν 2 g ενεργού άνθρακα. Ακολούθησε ανάδευση για 10 min και στη συνέχεια φυγοκέντρωση (5000 rpm, 5 $^\circ\text{C}$, 10 min). Στο υπερκείμενο προστέθηκαν ξανά 2 g ενεργού άνθρακα και επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία για άλλες δύο φορές. Το υπερκείμενο φιλτραρίστηκε σε συσκευή διήθησης υπό κενό και στο υπερκείμενο προστέθηκε 1.5 όγκος παγωμένης αιθανόλης. Αφήσαμε το διάλυμα σε πάγο για 15 min και ακολούθησε φυγοκέντρωση (5000

rpm, 5 °C, 10 min). Το ίζημα τοποθετήθηκε σε υάλινα σωληνάκια σε λυοφιλοποιητή έως ότου απομακρυνθεί όλη η υγρασία και το γλυκογόνο αποκτήσει τη μορφή σκόνης. Τέλος, το γλυκογόνο ζυγίστηκε και διαλυτοποιήθηκε σε κατάλληλο όγκο απιονισμένου ύδατος ώστε να αποκτήσει συγκέντρωση 10 % (w/v).

4.7.1.3. Ποσοτικός προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ομάδων

Κατά την αντίστροφη πορεία που καταλύει η *GP* (Εικόνα 4), μόρια *G1P* ενσωματώνονται στο μακρομόριο του γλυκογόνου με απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων των οποίων η ποσότητα μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά με τη μέθοδο των *Saheki, S.*, και συνεργατών [232]. Σύμφωνα με τη μέθοδο γίνεται παρασκευή διαλύματος 1 που περιέχει 10 % w/v ασκορβικού οξέος (φρέσκο κάθε φορά) και διαλύματος 2 που περιλαμβάνει 100 mM οξικό ψευδάργυρο και 15 mM μολυβδαινικό αμμώνιο. Το pH και των δύο διαλυμάτων ρυθμίζεται στο 5.0 με πυκνό *HCl* ή *NaOH*. Ακολουθεί ανάμιξη των διαλυμάτων σε αναλογία 4[διάλυμα 2]/1[διάλυμα 1] και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί μια έγχρωμη ένωση. Έπειτα, 700 μ L προστίθενται στα δείγματα για τον προσδιορισμό της ποσότητας των ορθοφωσφορικών ομάδων. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για 15 min. Τέλος, διεξάγεται φασματοφωτομέτρηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 850 nm μηδενίζοντας με τυφλό διάλυμα που περιείχε νερό. Επιπλέον γίνεται προσδιορισμός κάθε φορά και δύο προτύπων δειγμάτων ώστε να προσδιοριστεί στη συνέχεια, η ποσότητα του φωσφόρου στα υπόλοιπα δείγματα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι τα ορθοφωσφορικά ιόντα που παράγονται από την δράση της *GP* σχηματίζουν σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία Zn^{2+} το οποίο ανάγεται με την προσθήκη ασκορβικού οξέος με αποτέλεσμα να παράγεται τελικά ένα χρωμοφόρο το οποίο σε μήκος κύματος 850 nm παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση [232].

4.7.1.4. Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων των GP's

Οι παρασκευές των *rmGPa* (0.5 mg/ml) και *hlGPa* (10 μ g/ml) αναφέρονται στην παράγραφο 4.7.1.1. Για τα πειράματα που έγιναν με την *rmGPb*, το ένζυμο αραιώθηκε από το πυκνό ένζυμο (50 % v/v γλυκερόλη, - 20 °C) σε συγκέντρωση 0.5 mg/mL με τη χρήση διαλύματος 50:50:1. Με τον όρο ενζυμικό διάλυμα εννοούμε ένα μίγμα το οποίο περιέχει ένζυμο, γλυκογόνο και ρυθμιστικό διάλυμα, μέρος από το οποίο προστέθηκε στη συνέχεια στο υπόστρωμα. Τα ενζυμικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν για τα τρία διαφορετικά ένζυμα, παρουσιάζονται στον Πίνακα 24. Αφού παρασκευάσαμε το ενζυμικό διάλυμα, το τοποθετήσαμε σε

υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C για 15 λεπτά ώστε το ένζυμο να συνδεθεί με το γλυκογόνο. Παράλληλα, ετοιμάσαμε τα διαλύματα των υποστρωμάτων (Πίνακας 25).

Πίνακας 24: Ποσότητες και συγκεντρώσεις για την παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος. Εφόσον οι συγκεντρώσεις της *rmGPa* και *rmGPb* ήταν ίδιες, στο πίνακα αναφέρονται και οι δύο περιπτώσεις ως *rmGP*. Στην *hlGPa* δεν προστίθεται εκ νέου ρυθμιστικό διάλυμα *TEA* γιατί το ένζυμο βρίσκεται ήδη αραιωμένο σε αυτό το διάλυμα.

Ποσότητες και αρχικές συγκεντρώσεις		Τελικές συγκεντρώσεις	
<i>rmGP</i>	<i>hlGPa</i>	<i>rmGP</i>	<i>hlGPa</i>
24 μL γλυκόγονο 10 % w/v	120 μL γλυκογόνο 2 % w/v	1 % w/v γλυκογόνο	
12 μL ρυθ. διάλυμα 50:50:1		Ρυθ. διάλυμα 2.5:2.5:0.05	Ρυθ. διάλυμα <i>TEA</i>
7.2 μL <i>rmGP</i> 0.5 mg/mL	120 μL <i>hlGPa</i> 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ <i>rmGP</i>	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ <i>hlGPa</i>
194.8 μL dH ₂ O			
V_{τελ}: 240 μL			

Στις κινητικές μελέτες ως προς την *GP* μελετήσαμε την ενσωμάτωση της *G1P* στο γλυκογόνο με απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων. Επομένως, χρησιμοποιήσαμε ως υπόστρωμα την α -D-1-φωσφορική γλυκόζη. Τα πυκνά διαλύματα των υποστρωμάτων βρίσκονταν αραιωμένα σε διάλυμα με τιμή *pH* 6.8 το οποίο περιείχε: 270 mM *KCl*, 135 mM ιμιδαζόλιο, 2.7 mM *DTT*, 2.7 mM *EDTA*. Οι συγκεντρώσεις της *G1P* που χρησιμοποιήσαμε στην αντίδραση ($V = 180 \mu\text{L}$) ήταν 2, 3, 4, 6, και 10 mM για την *rmGP* και 1, 2, 3, 4, και 6 mM για την *hlGPa*. Επίσης, στα διαλύματα των υποστρωμάτων για την *rmGPb* προσθέσαμε επιπλέον *AMP* σε συγκέντρωση 1 mM ώστε το ένζυμο να βρίσκεται στην στερεοδιαμόρφωση-*R* κατά την εξέλιξη της αντίδρασης. Η *GPa* δεν χρειάζεται *AMP* για την ενεργοποίηση της καθώς τα φωσφορυλιωμένα ένζυμα βρίσκονται στην στερεοδιαμόρφωση-*R*².

Πίνακας 25: Τα διαλύματα των υποστρωμάτων.

G1P (πυκνό mM)	40 μL (4.5)	40 μL (9)	40 μL (13.5)	40 μL (18)	40 μL (27)	40 μL (45)	40 μL (90)
dH₂O (μL)	100.4 μL	100.4 μL	100.4 μL	100.4 μL	100.4 μL	100.4 μL	100.4 μL
Αναστολέας (100 % v/v DMSO)	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL
V_{τελ}: 144 μL							
Συγκεντρώσεις G1P στα 144 μL							
(mM)	1.25	2.5	3.75	5	7.5	12.5	25
Συγκεντρώσεις G1P στα 180 μL της αντίδρασης							
(mM)	1	2	3	4	6	10	20

* Η *G1P* προστέθηκε πριν την έναρξη της αντίδρασης ώστε να αποφευχθεί η υδρόλυση της.

* Σε κάθε πείραμα η συγκέντρωση της *G1P* μεταβαλλόταν ενώ του αναστολέα έμεινε σταθερή.

* Για τα πειράματα της *rmGPb*: Από πυκνό διάλυμα της *AMP* [25 mM] προστέθηκαν 7.2 μL και ο όγκος του dH₂O ήταν 93.2 μL .

* Οι αναστολείς ήταν διαλυμένοι σε *DMSO*. Η συγκέντρωση του *DMSO* στην αντίδραση ήταν τελικά 2 % v/v.

Τέλος, οι διάφοροι αναστολείς (διαλυμένοι σε *DMSO*) προστέθηκαν επίσης στα διαλύματα των υποστρωμάτων. Επομένως, τα διαλύματα υποστρωμάτων περιείχαν *G1P*, *DMSO*/αναστολέα ή/και *AMP* (Πίνακας 25). Τα διαλύματα των υποστρωμάτων τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο

² Έγινε προσδιορισμός της δραστηριότητας της *rmGPa* σε 20 mM *G1P* \pm 1 mM *AMP* για να επιβεβαιώσουμε ότι η φωσφορυλίωση της *rmGPa* είχε γίνει με επιτυχία (βλ. παράγραφο 4.7.1.1).

σε θερμοκρασία 30 °C πέντε λεπτά πριν το πέρας του χρόνου επώασης του ενζυμικού διαλύματος.

4.7.1.4.1. Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού κινητικών παραμέτρων (K_M , V_{max} , K_i)

Για τον προσδιορισμό της K_i έγινε αρχικά ο προσδιορισμός της σταθεράς K_M (παρουσία 2 % v/v *DMSO*) και στη συνέχεια ο προσδιορισμός των $K_{M(app)}$. Για τον προσδιορισμό των $K_{M(app)}$ χρησιμοποιήθηκαν πέντε συγκεντρώσεις υποστρωμάτων, όπως και για την K_M , αλλά κάθε φορά προστέθηκε μια σταθερή συγκέντρωση από τον αναστολέα. Τέλος, ο προσδιορισμός της K_i έγινε με 4 έως 6 διαφορετικές $K_{M(app)}$.

Μετά από την προετοιμασία των παραπάνω διαλυμάτων (παράγραφος 4.7.1.4), έγινε λήψη 36 μL από το ενζυμικό διάλυμα τα οποία μεταφέρθηκαν στο πρώτο διάλυμα υποστρώματος ($t = 0$). Η ενζυμική αντίδραση εξελίχθηκε σε όγκο $v = 180 \mu L$, pH 6.8, σε θερμοκρασία 30 °C παρουσία 0.6 mM *EDTA*, 0.6 mM *DTT*, 30 mM ιμιδαζόλιο, και 60 mM *KCl*. Κατά την εξέλιξη της αντίδρασης, 40 μL από το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρθηκαν σε 1, 2, 3, και 4 λεπτά για την *rmGP* και σε 5, 10, 15, και 20 λεπτά για την *hlGPa* σε 10 μL 1 % w/v *SDS* ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C έως ότου παρασκευαστεί το διάλυμα φωτομέτρησης. Επιπλέον, παρασκευάσαμε δείγματα με ρόλο «τυφλού μάρτυρα». Τα δείγματα αυτά περιείχαν το μίγμα ή την ένωση της οποίας θέλαμε να προσδιορίσουμε την οπτική πυκνότητα. Για το λόγο αυτό παρασκευάσαμε εις διπλούν τα παρακάτω δείγματα:

Τυφλό H_2O	40 μL dH_2O + 10 μL <i>SDS</i>
Τυφλό ενζυμικού διαλύματος	32 μL dH_2O + 8 μL ενζυμικού διαλύματος + 10 μL <i>SDS</i>
Τυφλό <i>G1P</i>	31.1 μL dH_2O + 8.9 μL από τη πιο μεγάλη συγκέντρωση <i>G1P</i> , συνήθως 45 mM + 10 μL <i>SDS</i>
Τυφλό φωσφορικών	30 μL dH_2O + 10 μL <i>Pi</i> 1 mM + 10 μL <i>SDS</i>

Επομένως, στα 40 μL των τυφλών μαρτύρων έγινε προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας του ενζυμικού διαλύματος (1 $\mu g/mL$ *hlGPa*, 3 $\mu g/mL$ *rmGP*, 1 % ρυθ. διαλ/μα 50:50:1 και 0.2 % w/v γλυκογόνο), της *G1P* (10 mM, αραιωμένη στο ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο βρισκόταν στην αντίδραση) και ενός πρότυπου δείγματος φωσφορικών. Από την οπτική πυκνότητα που βρέθηκε για τα 10 mM *G1P* υπολογίστηκε με αναγωγή η απορρόφηση για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε και έγινε ανάμιξη του διαλύματος φωτομέτρησης όπως αναλύεται στην παράγραφο 4.7.1.3. Μετά τον χρόνο επώασης του μίγματος (15 min) προστέθηκε σε όλα τα δείγματα 700 μL από το διάλυμα φωτομέτρησης. Ακολούθησε έντονη ανάδευση και τοποθέτηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 30 °C σε

υδατόλουτρο για 15 min. Τέλος, έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων σε $\lambda = 850 \text{ nm}$ χρησιμοποιώντας ως τιμή μηδέν την απορρόφηση του τυφλού του H_2O .

4.7.1.4.2. Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων, ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων και η παραγωγή των διαγραμμάτων έγινε με το πρόγραμμα *GraFit* [233]. Για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων έγινε αρχικά η εύρεση της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος. Με βάση την απορρόφηση του πρότυπου δείγματος των φωσφορικών υπολογίσαμε την ποσότητα των ορθοφωσφορικών (μmoles) σε κάθε χρονική στιγμή όπου σταματήσαμε την αντίδραση. Ως ειδική δραστηριότητα ορίζεται η ποσότητα (μmole) του προϊόντος που παράγεται ή του υποστρώματος που καταναλώνεται ανά μονάδα χρόνου (min) ως προς την ποσότητα της πρωτεΐνης στην αντίδραση (mg), δηλαδή $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$. Η ειδική δραστηριότητα υπολογίστηκε με εφαρμογή των δύο παρακάτω παραμέτρων:

$$\text{limit} = 0.78 \cdot [\text{G1P}] \cdot 0.04 \quad (1)$$

Όπου,

- 0.78: Το επί τοις εκατό ποσοστό του υποστρώματος το οποίο έχει καταναλωθεί όταν η αντίδραση έχει έρθει σε ισορροπία.
- [G1P]: Η συγκέντρωση του υποστρώματος στην αντίδραση.
- 0.04: Ο όγκος που απομακρύνθηκε από την αντίδραση ($40 \mu\text{L}$) και μεταφέρθηκε σε 1 %

w/v SDS.

Και,

$$f = \frac{\text{limit}}{0.04 \cdot C} \quad (2)$$

Όπου,

- C: Η συγκέντρωση της GP στην αντίδραση (mg/ml)

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 26) αναγράφονται οι τιμές για τα *limit* και *f* που χρησιμοποιήσαμε. Για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων K_M , $K_{M(\text{app})}$, V_{max} , $V_{\text{max}(\text{app})}$ για τις ενώσεις που στόχευαν το καταλυτικό κέντρο χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση *Michaelis-Menten* (από το διάγραμμα *Lineweaver-Burk*), ενώ για τις ενώσεις που στόχευαν το κέντρο αναστολής χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο του *Hill*.

Ο προσδιορισμός της K_i έγινε από ένα διάγραμμα όπου στον άξονα x τοποθετήθηκαν οι τιμές της συγκέντρωσης του αναστολέα, $[I]$, και στον άξονα των y οι τιμές των $K_{M(app.)}$. Το σημείο στο οποίο η ευθεία που ενώνει αυτά τα σημεία τέμνει τον άξονα x είναι η τιμή $-K_i$. Η ευθεία αυτή είναι η κλασική γραμμική εξίσωση της μορφής:

$$y = ax + b$$

Όπου,

- a : Η κλίση της ευθείας (*slope*)
- b : Η τεταγμένη επί της αρχής (*intercept*)

Τις ενώσεις που στόχευαν το κέντρο αναστολής τις χειριστήκαμε ως αλλοστερικούς αναστολείς του ενζύμου χρησιμοποιώντας το πρότυπο του *Hill*. Κατασκευάσαμε το διάγραμμα του *Hill* όπου στον άξονα των x τοποθετήσαμε τις τιμές $\text{Log}[G1P]$ και στον άξονα των y τις τιμές $\log\left(\frac{v}{V_{max}-v}\right)$. Από τις ευθείες που προέκυψαν ($y = ax + b$) υπολογίσαμε τις τιμές των $K_{M(app.)}$.

$$K_{M(app.)} = \left(\frac{1}{10^{\frac{a}{b}}}\right), mM$$

Όπου,

- a : Η κλίση της ευθείας (*slope*)
- b : Η τεταγμένη επί της αρχής (*intercept*)

Τελικά υπολογίσαμε την τιμή της K_i όπως αναφέραμε σε αυτή τη παράγραφο.

Πίνακας 26: Υπολογισμοί των *limit* και *f* για κάθε συγκέντρωση *G1P*. Με το σύμβολο (-) εννοούμε ότι η συγκριμένη συγκέντρωση *G1P* δεν χρησιμοποιήθηκε για το συγκεκριμένο ένζυμο. Τα 20 mM *G1P* χρησιμοποιήθηκαν ως προς την *rmGPa* για την αξιολόγηση της διαδικασίας της φωσφορυλίωσης.

[G1P] _{τελική} , mM	rmGP		hlGPa	
	limit	f	limit	f
1	-	-	0.0312	780
2	0.0624	520	0.0624	1560
3	0.0936	780	0.0936	2340
4	0.1248	1040	0.1248	3120
6	0.1872	1560	0.1872	4680
10	0.312	2600	-	-
20	0.624	5200	-	-

4.7.1.5. Κινητικές μελέτες με δύο αναστολείς

Όπως αναλύθηκε και προηγουμένως (βλ. παράγραφο 4.1.5.3.1) κινητικές μελέτες με δύο αναστολείς ή έναν αναστολέα και έναν ενεργοποιητή μπορούν να μας δείξουν αν τα μόρια αυτά προσδένονται στο ίδιο κέντρο στο ένζυμο. Για το λόγο αυτό ενώσεις που δεν

προβλεπόταν να προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο, μελετήθηκαν περαιτέρω (εκτός από τον προσδιορισμό των K_i) για τον προσδιορισμό του κέντρου πρόσδεσης τους στο ένζυμο. Για το κέντρο αναστολής επιλέχθηκε η καφεΐνη, για το αλλοστερικό κέντρο η AMP (ενεργοποιητής) και για το καταλυτικό κέντρο η α -D-γλυκόζη. Οι κινητικές μελέτες έγιναν ως προς την *rmGPb* και η προετοιμασία της διαδικασίας είναι ίδια με αυτή που αναφέρθηκε παραπάνω (παράγραφοι 4.7.1.4 και 4.7.1.4.1) με τη διαφορά ότι προστέθηκε ένας ακόμη αναστολέας. Σε κάθε πείραμα διατηρούταν σταθερή η συγκέντρωση του πρώτου αναστολέα και άλλαζε η συγκέντρωση του δεύτερου αναστολέα. Επιπλέον, η συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν σταθερή σε όλα τα πειράματα (10 mM) όπως και η συγκέντρωση της AMP (1 mM), εκτός από το πείραμα όπου έγιναν μελέτες ως προς το αλλοστερικό κέντρο της GP όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις της AMP. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 27) αναφέρονται οι διάφορες συγκεντρώσεις των αναστολέων ή του ενεργοποιητή που χρησιμοποιήθηκαν. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε πάλι με το πρόγραμμα *GraFit* και οι ειδικές δραστικότητες υπολογίστηκαν με τον ίδιο τρόπο. Στη συνέχεια κατασκευάσαμε τα διαγράμματα *Dixon* όπου στον άξονα y' τοποθετήθηκαν οι τιμές $1/v$ και στον άξονα x' τις τιμές $1/[\text{Διαφοροποιούμενο αναστολέα}]$. Η ύπαρξη συνέργειας μεταξύ του αναστολέα και της α -D-γλυκόζης έγινε με τον προσδιορισμό της σταθεράς αλληλεπίδρασης (Βλ. παράγραφο 4.1.5.3.1).

Πίνακας 27: Οι συγκεντρώσεις των αναστολέων ή ενεργοποιητή που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες εύρεσης του κέντρου πρόσδεσης των αναστολέων στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

Κέντρο αναστολής	Συγκεντρώσεις Αναστολέα, μM (Διαφοροποιούμενος αναστολέας)	Συγκεντρώσεις καφεΐνης, mM (Σταθερός αναστολέα)
	0, 0.5, 1, 1.5, 2	0.1, 0.2, 0.4, 0.8
Αλλοστερικό κέντρο	Συγκεντρώσεις Αναστολέα, μM (Διαφοροποιούμενος αναστολέας)	Συγκεντρώσεις AMP, mM (Σταθερός αναστολέα)
	0, 0.5, 1, 1.5, 2	0.05, 0.1, 0.2, 1
Καταλυτικό κέντρο	Συγκεντρώσεις Αναστολέα, μM (Διαφοροποιούμενος αναστολέας)	Συγκεντρώσεις α -D-γλυκόζης, mM (Σταθερός αναστολέα)
	0, 0.5, 1, 1.5, 2	0, 2, 4, 6, 9, 12

* Η καφεΐνη, η α -D-γλυκόζη και η AMP ήταν διαλυμένες σε $d\text{H}_2\text{O}$. Επομένως, η προσθήκη τους δεν επηρέασε τη τελική συγκέντρωση του DMSO στο οποίο βρισκόταν διαλυτοποιημένος ο αναστολέας.

4.7.2. Κινητικές μελέτες στο *hgDE*

4.7.2.1. Παρασκευή *GPa limit rate dextrin* (φ -*dextrin*)

Η παρασκευή της φ -*dextrin* έγινε όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία [44, 234] με μικρές τροποποιήσεις. Αρχικά, έγινε φωσφορυλίωση της *rmGPb* σε *rmGPa* σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/mL όπως αναφέρεται στην παράγραφο 4.7.1.1. Παρασκευάστηκε διάλυμα 4 % (w/v)

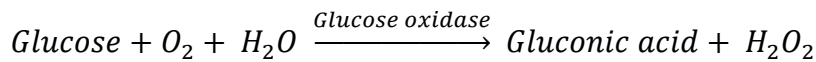
γλυκογόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH 6.8, όγκου 20 mL και προστέθηκαν 120 μg *rmGPa*. Το διάλυμα του γλυκογόνου με την *rmGPa* τοποθετήθηκε σε σακουλάκι διαπίδυσης με κατώφλι 10 kDa και υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου pH 6.8. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα και η διαπίδυση εξελίχθηκε σε θερμοκρασία 37 °C, για 16 ώρες. Την επόμενη ημέρα προστέθηκαν άλλα 240 μg *rmGPa* και το διάλυμα υποβλήθηκε ξανά σε διαπίδυση έναντι φρέσκου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου pH 6.8 για 16 ώρες. Μετά τις 16 ώρες της διαπίδυσης, το διάλυμα του γλυκογόνου ήρθε σε θερμοκρασία βρασμού για 5 min ώστε να προκληθεί μετουσίωση της φωσφορυλάσης και ακολούθησε φυγοκέντρηση. Στο υπερκείμενο προστέθηκαν δύο όγκοι παγωμένη αιθανόλη και το γλυκογόνο συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση (4200 *rcf*, 4 °C, 10 min). Το ίζημα τοποθετήθηκε σε λυοφιλοποιητή έως ότου απομακρυνθεί όλη η υγρασία και το γλυκογόνο αποκτήσει τη μορφή σκόνης. Τέλος, το γλυκογόνο ζυγίσθηκε και διαλύθηκε σε απιονισμένο ύδωρ ώστε να σχηματιστεί διάλυμα συγκέντρωσης 10 % (w/v) και η ϕ -dextrin αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία - 20 °C.

4.7.2.2. Μεθοδολογία προσδιορισμού α -D-γλυκόζης

Όπως έχουμε αναφέρει το *GDE* καταλύει τελικά την απομάκρυνση της α -1,6 γλυκόζης με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερης α -D-γλυκόζης. Μια απλή, εύκολη και οικονομική μέθοδος για τον προσδιορισμό της γλυκόζης αποτελεί η μέθοδος *GOD-POD* η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος. Το αντιδραστήριο αποτελείται από ένα μίγμα με τα εξής συστατικά:

- *Phosphate buffer pH 7.5*
- *Phenol*
- *4-aminophenazone*
- *Glucose oxidase*
- *Peroxidase*
- *Mutarotase*

Σύμφωνα με τη μέθοδο, η α -D-γλυκόζη που υπάρχει σε δείγμα μετατρέπεται σε β -D-γλυκόζη από το ένζυμο *mutarotase* [235] και στη συνέχεια λαμβάνουν χώρα οι δύο παρακάτω αντιδράσεις:



Η γλυκόζη οξειδώνεται από την οξειδάση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ με απελευθέρωση υπεροξειδίου. Το υπεροξείδιο αντιδρά με τη φαινόλη και την 4-aminophenazone δημιουργώντας ένα σύμπλοκο με κόκκινο χρώμα (*quinoneimine*) η απορρόφηση του οποίου μπορεί να προσδιοριστεί σε μήκος κύματος 510 nm. Συνεπώς, η συγκέντρωση της γλυκόζης σε ένα άγνωστο δείγμα μπορεί να προσδιοριστεί με χρήση ενός πρότυπου δείγματος γλυκόζης μετρώντας την οπτική πυκνότητα μήκος κύματος 510 nm [236].

4.7.2.3. Πρότυπες καμπύλες γλυκόζης

Το εγχειρίδιο χρήσης του κιτ προσδιορισμού γλυκόζης αναφέρει το εξής σε ότι αφορά τη διαδικασία: σε 20 μL δείγμα προστίθενται 2 mL αντιδραστήριο. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 20 – 25 °C ή για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 37 °C. Τέλος, γίνεται μέτρηση των απορροφήσεων σε μήκος κύματος 510 nm εντός μιας ώρας από την έναρξη της αντίδρασης. Η αντίδραση αυτή είναι γραμμική μέχρι 22.2 mM γλυκόζης.

Δεδομένου ότι το *GDE* δεν θα μπορούσε να παράγει τόσο μεγάλες ποσότητες γλυκόζης οι οποίες θα ήταν ανιχνεύσιμες από αυτό το κιτ, ελέγξαμε τη γραμμικότητα της αντίδρασης σε ένα εύρος διάφορων συγκεντρώσεων πρότυπου διαλύματος (όγκου 10 μL) με χρήση 1000 μL ή 500 μL αντιδραστήριου προσδιορισμού της γλυκόζης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο παράρτημα (Διάγραμμα 7). Δεν επιλέξαμε να αυξήσουμε τον όγκο του προς ανάλυση δείγματος (πχ 20 μL αντί για 10 μL) διότι δεν θέλαμε να επηρεαστεί η δράση των ενζύμου του αντιδραστήριου από συστατικά του διαλύματος αντίδρασης του *GDE*, όπως το *DTT*.

4.7.2.4. Δοκιμές δραστηριότητας στα στάδια απομόνωσης και καθαρισμού του *hGDE*

Σε κάθε στάδιο καθαρισμού του *hGDE* έγινε ανάλυση της δραστηριότητας των κλασμάτων. Αρχικά παρασκευάστηκαν τα δείγματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 28. Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 37 °C σε υδατόλουτρο για 10 min. Ο τερματισμός της αντίδρασης επιτεύχθηκε με τοποθέτηση των δειγμάτων σε θερμομαντική πλάκα σε θερμοκρασία 95 °C για 10 λεπτά. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C και ακολούθησε προσθήκη 500 μL από το διάλυμα προσδιορισμού γλυκόζης. Έπειτα, έγινε

ήπια ανάδευση και επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 37 °C για 10 λεπτά. Προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν στερεά από τη μετουσίωση των πρωτεϊνών λόγω θερμικής κατεργασίας, έγινε φυγοκέντρωση (16000 rpm, 10 min, R.T.) και προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων σε $\lambda = 510 \text{ nm}$ αφού πρώτα μηδενίσαμε με το τυφλό. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης στα δείγματα έγινε έχοντας ως οδηγό την απορρόφηση του πρότυπου διαλύματος.

Πίνακας 28: Προετοιμασία των δειγμάτων για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του hGDE στα στάδια της απομόνωσης.

	Κλάσμα απομόνωσης	Τυφλό	Τυφλό φ-dextrin	Πρότυπο γλυκόζης
Κλάσμα απομόνωσης	10 μL			
Διάλυμα που περιέχει το hGDE		10 μL	10 μL	10 μL
φ-dextrin [10 % w/v]	5 μL	-	5 μL	-
Πρότυπο γλυκόζης [5.5 mM]		-	-	5 μL
dH ₂ O		5 μL	-	-
V _{τελ} : 15 μL				

4.7.2.5. Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης για το hGDE.

4.7.2.5.1. Προσδιορισμός βέλτιστης τιμής pH δράσης του hGDE

Αρχικά, προσδιορίσαμε το βέλτιστο pH δράσης του hGDE μελετώντας τη δραστηριότητα του ενζύμου σε ένα εύρος τιμών pH (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Προετοιμάσαμε τα δείγματα που φαίνονται στον παρακάτω Πίνακας 29. Επομένως, η αντίδραση εξελίχθηκε σε 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα, 2.5 % w/v φ-dextrin και 0.05 mg/mL hGDE. Η φ-dextrin προστέθηκε τελευταία και αφήσαμε την αντίδραση να εξελιχθεί σε θερμοκρασία 37 °C σε υδατόλουτρο για 15 min. Προκειμένου να εξασφαλίσουμε ότι οι διάφορες τιμές pH δεν επηρεάζουν τη μεθοδολογία προσδιορισμού της γλυκόζης αλλά και ότι δεν προκαλούν κάποια βλάβη στο υπόστρωμα (όπως η υδρόλυση του), πραγματοποιήσαμε παράλληλα τρεις σειρές αντιδράσεων ελέγχου τροποποιώντας τον Πίνακας 29. Στη πρώτη σειρά η ποσότητα του hGDE αντικαταστάθηκε από το διάλυμα στο οποίο ήταν αποθηκευμένο το hGDE και επιπρόσθετα, στη δεύτερη σειρά, εκτός από την αντικατάσταση του hGDE από το διάλυμα αποθήκευσης του, η ποσότητα της φ-dextrin αντικαταστάθηκε με τον ίδιο όγκο πρότυπου διαλύματος γλυκόζης με συγκέντρωση 5.5 mM.

Πίνακας 29: Παρασκευή δειγμάτων για τον προσδιορισμό του βέλτιστου pH δράσης του hGDE.

	0.2 M	0.2 M	0.2 M	0.2 M	0.2 M	0.2 M	0.2 M
Ρυθ. διάλ./μα	Na-acetate pH 4.0	Na-acetate pH 5.0	MES pH 6.0	Tris-HCl pH 7.0	Tris-HCl pH 8.0	Glycine-NaOH pH 9.0	Glycine-NaOH pH 10.0
	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL	4 μL
Φ-dextrin [10 %]	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
hGDE [2mg/mL]	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
dH ₂ O	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL
V _{τελ} = 40 μL							

Τέλος, στην τρίτη σειρά ο όγκος του *hGDE* αντικαταστάθηκε από το διάλυμα στο οποίο ήταν αποθηκευμένο το *hGDE* και ο όγκος της *φ-dextrin* από *dH₂O*. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με μεταφορά 10 μL από τις αντιδράσεις σε καθαρό δοχείο και τοποθέτηση τους σε θερμοκρασία 95 °C για 10 λεπτά. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C και ακολούθησε προσθήκη 500 μL από το διάλυμα προσδιορισμού γλυκόζης. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 37 °C για 10 λεπτά. Προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν στερεά από τη μετουσίωση των πρωτεϊνών λόγω θερμικής κατεργασίας, έγινε φυγοκέντρηση (16000 *rpm*, 10 *min*, *R.T.*) και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων σε $\lambda = 510 \text{ nm}$ αφού πρώτα μηδενίσαμε με το τυφλό (10 μL *dH₂O* + 500 μL αντιδραστήριο προσδιορισμού γλυκόζης). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης στα δείγματα έγινε έχοντας ως οδηγό την απορρόφηση των πρότυπων.

4.7.2.5.2. Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του *hGDE*

Προσδιορίσαμε τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του *hGDE* υπολογίζοντας τη δραστηριότητα του ενζύμου σε *pH* 6.0 σε διαφορετικές θερμοκρασίες (4, 20, 30, 37 και 45 °C). Παρασκευάσαμε ένα ενζυμικό διάλυμα το οποίο περιείχε τα συστατικά που φαίνονται στον Πίνακα 30. Όπως και πριν, θελήσαμε να ελέγξουμε αν οι διάφορες θερμοκρασίες θα επηρεάσουν τη σταθερότητα του υποστρώματος ή του προϊόντος. Για το λόγο αυτό παρασκευάσαμε το δείγμα ελέγχου και το πρότυπο διάλυμα γλυκόζης (Πίνακα 30) όπου ο όγκος του *hGDE* είχε αντικατασταθεί από το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο ήταν αποθηκευμένο το *hGDE*. Για κάθε θερμοκρασία, 5 μL από το ενζυμικό διάλυμα ή το δείγμα ελέγχου αναμίχθηκαν με 5 μL *φ-dextrin* 5 % *w/v* και ακολούθησε επώαση στις συγκεκριμένες θερμοκρασίες για 15 *min*. Επομένως, οι συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης ήταν 20 *mM* *MES* *pH* 6.0, 0.05 *mg/mL* *hGDE* και 2.5 % *w/v* *φ-dextrin*. Επιπλέον, το πρότυπο διάλυμα γλυκόζης και το τυφλό διαμοιράστηκαν σε πέντε διαφορετικά καθαρά δοχεία (10 μL σε κάθε δοχείο) και κάθε ένα από αυτά τοποθετήθηκε για επώαση σε διαφορετική θερμοκρασία.

Πίνακας 30: Παρασκευή δειγμάτων για προσδιορισμού της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του *hGDE*.

	Ενζυμικό διάλυμα	Δείγμα ελέγχου	Πρότυπο γλυκόζης	Τυφλό
<i>hGDE</i> [2 <i>mg/mL</i>]	2 μL	-	-	-
Ρυθ. διάλ./μα <i>hGDE</i>	-	2 μL	2 μL	2 μL
0.2 <i>M</i> <i>MES</i> , <i>pH</i> 6.0	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL
<i>dH₂O</i>	30 μL	30 μL	30 μL	70 μL
Πρότυπο γλυκόζης [5.5 <i>mM</i>]			40 μL	-
	$V_{\text{τελ}} = 40 \mu\text{L}$		$V_{\text{τελ}} = 80 \mu\text{L}$	$V_{\text{τελ}} = 80 \mu\text{L}$

Ο τερματισμός της αντίδρασης επιτεύχθηκε με τοποθέτηση όλων των δειγμάτων σε θερμοκρασία 95 °C για 10 λεπτά. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C και ακολούθησε προσθήκη 500 μL από το αντιδραστήριο προσδιορισμού γλυκόζης. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 37 °C για 10 λεπτά. Προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν στερεά από τη μετουσίωση των πρωτεϊνών λόγω θερμικής κατεργασίας, έγινε φυγοκέντρηση (16000 *rpm*, 10 *min*, *R.T.*) και προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων σε $\lambda = 510 \text{ nm}$ αφού πρώτα μηδενίσαμε με το τυφλό. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης στα δείγματα έγινε έχοντας ως οδηγό την απορρόφηση του πρότυπου διαλύματος.

4.7.2.6. Εκτίμηση της κινητικής συμπεριφοράς του *hGDE*

Εφόσον προσδιορίσαμε τη βέλτιστη τιμή του *pH* και της θερμοκρασίας για την αντίδραση που καταλύει το *hGDE*, θελήσαμε να προσδιορίσουμε αν το ένζυμο ακολουθεί κινητική *Michaelis-Menten*. Αρχικά, ετοιμάσαμε το ενζυμικό διάλυμα και το δείγμα ελέγχου όπως φαίνεται στον Πίνακα 30 σε διπλάσια ποσότητα ενώ το πρότυπο γλυκόζης και το τυφλό παρασκευάστηκαν στη μισή ποσότητα. Έπειτα, παρασκευάσαμε τα διαλύματα των υποστρωμάτων όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα εις διπλούν (Πίνακας 31):

Πίνακας 31: Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για κινητικές μελέτες στο *hGDE*.

	4 mg/mL <i>φ-dextrin</i>	8 mg/mL <i>φ-dextrin</i>	10 mg/mL <i>φ-dextrin</i>	15 mg/mL <i>φ-dextrin</i>	30 mg/mL <i>φ-dextrin</i>	40 mg/mL <i>φ-dextrin</i>	50 mg/mL <i>φ-dextrin</i>
[100 mg/mL] <i>φ-dextrin</i>	-	-	-	3 μL	6 μL	8 μL	10 μL
[20 mg/mL] <i>φ-dextrin</i>	4 μL	8 μL	10 μL	-	-	-	-
<i>dH₂O</i>	6 μL	2 μL	-	7 μL	4 μL	2 μL	-
	<i>V</i> = 10 μL						

Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 5 *min* σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37 °C ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία. Στη συνέχεια, 10 μL από το ενζυμικό διάλυμα ή το δείγμα ελέγχου μεταφέρθηκαν σε κάθε διάλυμα υποστρώματος και η αντίδραση εξελίχθηκε σε όγκο $v = 20 \mu\text{L}$ στην ίδια θερμοκρασία για 20 *min*. Οι συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης ήταν 20 *mM* *MES* *pH* 6.0, 0.05 *mg/mL* *hGDE* και 4, 8, 10, 15, 30, 40, 50, *mg/mL* *φ-dextrin*. Ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με μεταφορά 10 μL από όλα τα δείγματα σε καθαρό δοχείο και τοποθέτηση τους σε θερμοκρασία 95 °C για 10 λεπτά. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C και ακολούθησε προσθήκη 500 μL από το διάλυμα προσδιορισμού γλυκόζης. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 37 °C για 10 λεπτά. Προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν στερεά από τη μετουσίωση των πρωτεϊνών λόγω θερμικής κατεργασίας, έγινε φυγοκέντρηση (16000 *rpm*, 10

min, R.T.) και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων σε $\lambda = 510 \text{ nm}$ αφού πρώτα μηδενίσαμε με το τυφλό.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης στα δείγματα έγινε με αναγωγή ως προς την τιμή του πρότυπου διαλύματος αφού πρώτα αφαιρέθηκαν οι τιμές των απορροφήσεων της *φ-dextrin* για κάθε μια από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

4.8. ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ENZYMΩΝ-ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

4.8.1. Κρυστάλλωση *rmGPb*

Η *rmGPb* μετά το πέρας της διαδικασίας της απομόνωσης υποβλήθηκε σε κατεργασία με ενεργό άνθρακα. Η κατεργασία οδηγεί στην απομάκρυνση της *AMP*, η οποία υπάρχει από τα στάδια της απομόνωσης, ώστε το ένζυμο να κρυσταλλωθεί στην στερεοδιαμόρφωση *-T* καθώς η *AMP* μετατοπίζει την ισορροπία στην στερεοδιαμόρφωση *-R*. Αρχικά, έγινε διαπίδυση του ενζύμου έναντι διαλύματος που αποτελούταν από 10 mM *BES*, 0.02 (w/v) % *NaN₃*, 1 mM *EDTA* και 2 mM *DTT* pH 6.8 στο οποίο είχε προστεθεί ενεργός άνθρακας σε αναλογία [1 mg *rmGPb*]/[2 mg ενεργό άνθρακα]. Ο ενεργός άνθρακας πριν προστεθεί στη διαπίδυση είχε πλυθεί πρώτα δύο φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα της διαπίδυσης ώστε να μην επηρεαστεί η σύσταση του διαλύματος. Η διαπίδυση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h, ώστε να αποφευχθεί η κρυστάλλωση του ενζύμου λόγω της *AMP*, και έπειτα για 16 h σε θερμοκρασία 4 °C. Την επόμενη ημέρα έγινε κατεργασία του ενζύμου απευθείας με ενεργό άνθρακα. Σε αυτή τη περίπτωση ο ενεργός άνθρακας προστέθηκε σε αναλογία [1 mg *rmGPb*]/[1.2 mg ενεργό άνθρακα] αφού πρώτα είχε πλυθεί δύο φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα. Ο ενεργός άνθρακας προστέθηκε στο ένζυμο και ακολούθησε ανάδευση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, ο ενεργός άνθρακας διαχωρίστηκε από το ενζυμικό διάλυμα με φυγοκέντρηση (17000 rpm) σε θερμοκρασία δωματίου. Για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του ενεργού άνθρακα το ενζυμικό διάλυμα πέρασε από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.45 μm . Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε ο λόγος της οπτικής απορρόφησης του ενζύμου στα μήκη κύματος [260 nm/280 nm] ο οποίος έπρεπε να είναι μικρότερος του 0.53. Σε περίπτωση που ο λόγος ήταν υψηλότερος, τότε η διαδικασία με ενεργό άνθρακα απευθείας στο ένζυμο επαναλαμβανόταν.

Η κρυστάλλωση της *rmGPb* έγινε με την μέθοδο *batch* η οποία βασίζεται στην προσθήκη του διαλύματος της πρωτεΐνης μαζί με το διάλυμα καταβύθισης δημιουργώντας μια κατάσταση υψηλού κορεσμού. Το ενζυμικό διάλυμα που παραλάβαμε μετά την κατεργασία με ενεργό άνθρακα αραιώθηκε σε κατάλληλο όγκο ώστε η συγκέντρωση του ενζύμου να ήταν 25 mg/ml

και έπειτα προστέθηκαν 3 mM DTT, 1 mM spermine, 6 mM IMP και πυρήνες κρυστάλλων της *rmGPb* (*seeding*). Τέλος, το μίγμα τοποθετήθηκε εντός υάλινων σωλήνων (μήκος ~ 3 cm και διαμέτρου 2-3 mm) των οποίων οι άκρες ασφαλίστηκαν καλά με *parafilm*. Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της *rmGPb* πρωτοεμφανίστηκαν σε θερμοκρασία 16 °C σε χρονικό διάστημα 24 h και η πλήρης ανάπτυξη τους ολοκληρώθηκε εντός ενός μήνα.

4.8.2. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων για την *rmGPb* σε σύμπλοκο με αναστολείς

Κρύσταλλοι της *rmGPb* που είχαν αναπτυχθεί σε μικρούς σωλήνες τοποθετήθηκαν μικρό τρυβλίο *Petri* με προσθήκη διαλύματος 10 mM BES pH 6.8 ώστε να παραμείνουν ενυδατωμένοι. Στη συνέχεια μονοκρύσταλλοι απομακρύνθηκαν από το διάλυμα με βοήθεια υάλινης πιπέτας παστέρ και τοποθετήθηκαν σε υάλινα τριχοειδή. Ακολούθως, απομακρύνθηκε η περίσσεια διαλύματος γύρω από τον κρύσταλλο και έγινε προσθήκη διαλύματος που περιείχε τον αναστολέα (συνήθως 10 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM BES pH 6.8, παρουσία DMSO (10-30 % v/v) καθώς οι αναστολείς ήταν διαλυτοποιημένοι σε αυτό τον διαλύτη. Η επώαση του κρυστάλλου εντός του τριχοειδούς με τον αναστολέα έγινε σε θερμοκρασία δωματίου από 5 ώρες έως 5 ημέρες, ανάλογα την περίπτωση, ώστε να επιτευχθεί η πρόσδεση του αναστολέα στη πρωτεΐνη. Οι ακριβείς συνθήκες για κάθε ένωση παρουσιάζονται στην ενότητα αποτελέσματα-συζήτηση. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας χρησιμοποιώντας συμβατή πηγή παραγωγής ακτίνων-X (*CuK α*). Το σύστημα συλλογής δεδομένων περίθλασης ($\lambda = 1.5419 \text{ \AA}$, *Oxford Diffraction SuperNova*, *Agilent Technologies*) είναι εξοπλισμένο με γωνιόμετρο 4k και ανιχνευτή *ATLAS CCD 135 nm* (*Agilent Technologies*). Πριν τη συλλογή των δεδομένων συλλέχθηκε το διάλυμα του αναστολέα από τον τριχοειδές και υπολείμματα του διαλύματος απομακρύνθηκαν με χρήση λεπτών απορροφητικών χαρτιών. Τέλος, τοποθετήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα στις άκρες του τριχοειδούς οι οποίες σφραγίστηκαν με κερί. Αυτή η διαδικασία γίνεται ώστε κατά τη διάρκεια της συλλογής των δεδομένων να διατηρηθεί η εσωτερική υγρασία και να μην υπάρξει εξάτμιση του διαλύτη που περιέχει ο κρύσταλλος, κάτι το οποίο θα οδηγήσει στην καταστροφή του. Τέλος, το τριχοειδές τοποθετήθηκε στο γωνιόμετρο με τη βοήθεια πλαστελίνης και προσανατολίστηκε ως προς την πηγή ακτίνων-X. Οι βασικές παράμετροι της συλλογής δεδομένων περίθλασης είναι οι εξής:

Θερμοκρασία (° C)	25
Χρόνος έκθεσης (sec)	2 x 20
Απόσταση ανιχνευτή (cm)	82.5
Περιστροφή ανά εικόνα, Δφ (°)	0.8

Επειδή η συλλογή των δεδομένων έγινε σε θερμοκρασία δωματίου και προκειμένου να αποφευχθεί καταστροφή του κρυστάλλου από την ακτινοβολία ακτίνων-Χ, έγιναν ~ 3 μετατοπίσεις του κρυστάλλου κατά τον άξονα περιστροφής του. Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης έγινε με το πρόγραμμα *CrysAlisPro* [237]. Η συγχώνευση των εντάσεων των περιθλάσεων έγινε με το πρόγραμμα *Aimless* [238] και η βέλτιστη ευκρίνεια προσδιορίστηκε με το κριτήριο $CC^{1/2}$ [239]. Ο προσδιορισμός των φάσεων έγινε με διεργασίες *Fourier* και το πρόγραμμα *REFMAC* [238] χρησιμοποιώντας την γνωστή δομή της στερεοδιαμόρφωσης-Τ της *rmGPb* ελεύθερη από προσδέτες η οποία είχε προσδιοριστεί σε ευκρίνεια 1.9 Å (*Leonidas et al.*, μη δημοσιευμένα αποτελέσματα). Η βελτιστοποίηση των συντεταγμένων των ατόμων του μορίου στο χώρο (xyz) αλλά και των παραγόντων θερμικής κίνησης (*B-factor*) έγινε επίσης με το πρόγραμμα *REFMAC* [238] (10 κύκλοι *restrained refinement*). Η μελέτη των χαρτών $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ έδειξε την ύπαρξη θετικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας κάτι το οποίο σημαίνει την πρόσδεση του αναστολέα στο συγκεκριμένο κέντρο του ενζύμου. Η κατασκευή του δομικού μοντέλου του αναστολέα έγινε με το πρόγραμμα *AceDRG* [240] ή με το πρόγραμμα *JLigand* [241]. Η προσθήκη του αναστολέα στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, αλλά και η γενική αναπροσαρμογή του μοντέλου όπως η μετακίνηση πλευρικών αλυσίδων ορισμένων καταλοίπων, η προσθήκη εναλλακτικών διαμορφώσεων των πλευρικών αλυσίδων κάποιων καταλοίπων και η προσθήκη ή διαγραφή μορίων ύδατος έγινε με το πρόγραμμα *Coot* [242, 243]. Ακολούθησε περαιτέρω βελτιστοποίηση με το πρόγραμμα *REFMAC* (*restrained refinement*) και οι αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν αξιολογήθηκαν από το ταίριασμα τους στους νέους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, από τη γεωμετρία, από το διάγραμμα *Ramachandran* και από τους *B-factors* (κυρίως για τα μόρια του διαλύτη και του αναστολέα). Τέλος, η πληρότητα των αναστολέων στο κέντρο πρόσδεσης τους αξιολογήθηκε μέσω «βελτιστοποίησης της πληρότητας» (*occupancy refinement*) με το πρόγραμμα *REFMAC*. Η εγκυρότητα της πορείας βελτιστοποίησης ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τον διαδικτυακό διακομιστή *PDB_REDO* [223-225]. Επειδή υπήρχαν διαθέσιμες περισσότερες από πέντε ανακλάσεις για κάθε άτομο, εξετάστηκε τόσο το ιστροπικό όσο και το ανιστροπικό μοντέλων των *B-factors* και το

ισοτροπικό μοντέλο επιλέχθηκε βασισμένοι στη τιμή του λόγου του παράγοντα R του *Hamilton*. Η στερεοχημεία των καταλοίπων της πρωτεΐνης ελέγχθηκε με το πρόγραμμα *MolProbity* [244]. Οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις *van der Waals* αναλύθηκαν με το πρόγραμμα *CONTACT* που εμπεριέχεται στη σειρά προγραμμάτων του *CCP4* εφαρμόζοντας ως μέγιστες αποστάσεις τα 3.3 Å για δεσμούς υδρογόνου και τα 4.0 Å για αλληλεπιδράσεις *van der Waals*. Τέλος, έγινε κατάθεση των δομών στη βάση δεδομένων για πρωτεΐνες *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). Η κατασκευή εικόνων για αναπαράσταση των τρισδιάστατων δομών έγινε με το πρόγραμμα *CCP4 Molecular graphics* [122].

Για τη συλλογή δεδομένων περίθλασης που έγινε σε πηγή συγχροτρονικής ακτινοβολίας στο σταθμό *ID911-2* ($\lambda = 1.0403$ Å) στο *MAX-Lab Synchrotron Radiation Source* στο *Lund* της Σουηδίας, χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής *MAR CCD* (165 mm). Σε αυτή τη περίπτωση η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης διεξήχθη με τα προγράμματα *Mosflm* [245] και *Aimless* [238].

4.8.3. Κρυστάλλωση του *CgGDE*

Η κρυστάλλωση του *CgGDE* είχε επιτευχθεί με τη μέθοδο διάχυσης ατμών (καθήμενη σταγόνα) σε θερμοκρασία 20 °C όπως αναλύεται στη σχετική δημοσίευση [44]. Το ένζυμο είχε συμπυκνωθεί σε συγκέντρωση 20 mg/mL και η συνθήκη κρυστάλλωσης περιείχε 10 % *PEG 5000 mme (monometyl ether)*, 0.1 M *Hepes pH 7.0* και 5 % *tacsimate pH 7.0*. Πριν την κρυστάλλωση προστέθηκε στην πρωτεΐνη 0.3 mM *TCEP* [44]. Στις δοκιμές κρυστάλλωσης που επιχειρήσαμε δεν μπορέσαμε να επαναλάβουμε την παραγωγή κρυστάλλων σε αυτή τη συνθήκη χωρίς την προσθήκη *tacsimate*. Το *tacsimate* αποτελεί σήμα κατατεθέν της *Hampton Research* και αποτελείται από 1.8305 M *Malonic acid*, 0.25 M *Ammonium citrate tribasic*, 0.12 M *Succinic acid*, 0.3 M *DL-Malic acid*, 0.4 M *Sodium acetate trihydrate*, 0.5 M *Sodium formate*, 0.16 M *Ammonium tartrate dibasic* και διατίθεται σε pH 4, 5, 6, 7, 8, και 9 [246]. Για το λόγο αυτό έγινε σάρωση 96 συνθηκών του κιτ *JBScreen Basic 1, 2, 3 και 4* της εταιρείας *Jena Biosciences* με τη χρήση ρομποτικού συστήματος *OryxNano (Douglas Instruments)*. Η βέλτιστη συγκέντρωση της πρωτεΐνης για πειράματα κρυστάλλωσης εκτιμήθηκε σε 20 mg/mL με το κιτ *pre-crystallization test* της εταιρείας *Hampton Research*. Το κάθε βοθρίο του πιάτου 96 θέσεων περιείχε 50 μ L από την κάθε συνθήκη και ακολούθησε προσθήκη 0.4 μ L πρωτεΐνης με 0.4 μ L από την συνθήκη στη θέση εναπόθεσης της σταγόνας. Οι ανάπτυξη των κρυστάλλων έγινε σε θερμοκρασία 16 °C.

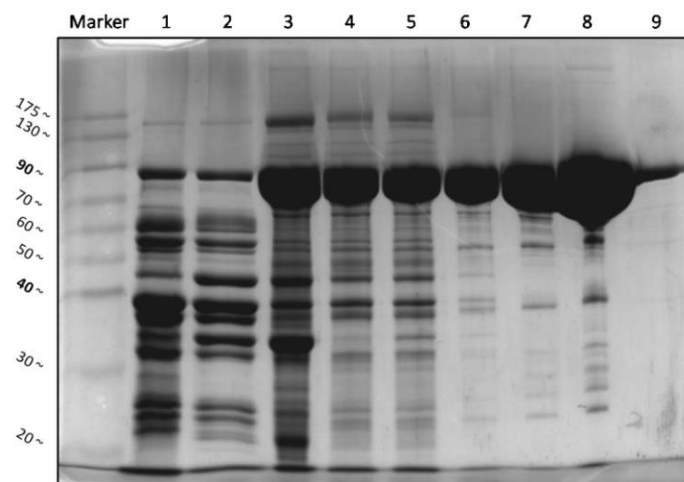
4.8.4. Κρυστάλλωση *hGDE*

Έγινε σάρωση 384 συνθηκών κρυστάλλωσης χρησιμοποιώντας τα κιτ σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης: *JBScreen Basic 1, 2, 3, 4* και *JBScreen Kinase 1, 2, 3, 4* της εταιρείας *Jena Biosciences*, *Structure Screen 1* και *2* της εταιρείας *Molecular Dimensions*, και *PEG4000-Malonate* της εταιρείας *Molecular Dimensions (custom screen)*. Η εκτίμηση της βέλτιστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης για πειράματα κρυστάλλωσης έγινε με το κιτ *pre-crystallization test* της εταιρείας *Hamton Research* και προσδιορίστηκε στα 5 mg/ml . Το κάθε βοθρίο του πιάτου 96 θέσεων περιείχε $50 \mu\text{L}$ από την κάθε συνθήκη και ακολούθησε προσθήκη $0.3 \mu\text{L}$ πρωτεΐνης με $0.3 \mu\text{L}$ από την συνθήκη στη θέση εναπόθεσης της σταγόνας. Οι ανάπτυξη των κρυστάλλων έγινε σε θερμοκρασία $16 \text{ }^\circ\text{C}$.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

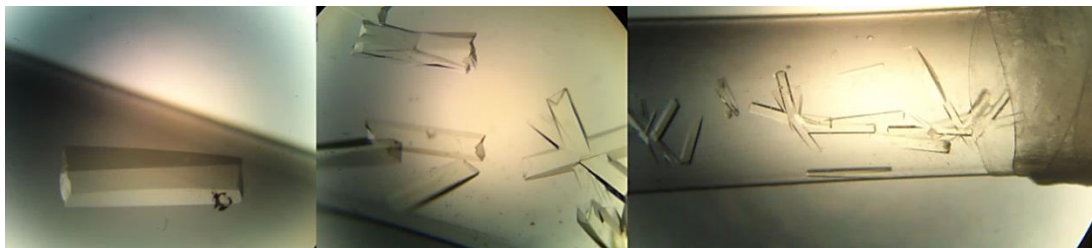
5.1. Απομόνωση και καθαρισμός και κρυστάλλωση της *rmGPb*

Η διαδικασία του καθαρισμού της *rmGPb* από σκελετικούς μύες κονίκλων περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.5.1. Στην Εικόνα 40 παρουσιάζεται η ανάλυση των δειγμάτων που λάβαμε κατά τα στάδια του καθαρισμού σε *SDS-PAGE*. Παρατηρούμε ότι η ποσότητα και η βιοχημική καθαρότητα της *rmGPb* αυξάνονται κατά τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων. Η συνολική απόδοση της μεθόδου ήταν 0.8 g *rmGPb* ανά kg σκελετικών μυών κονίκλων.



Εικόνα 40: 10 % *SDS-PAGE*, από την απομόνωση της *rmGPb* (97 kDa). Αρχικά, παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Έπειτα, διαδρομή 1: μετά την ολοκλήρωση του πρώτου βήματος, διαδρομή 2: μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο, διαδρομή 3: πριν τη διαπίδυση, διαδρομή 4: με τη διαπίδυση και τη φυγοκέντρηση, διαδρομή 5: πριν την πρώτη κρυστάλλωση, διαδρομή 6: μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 7: μετά τη δεύτερη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 8: μετά την τρίτη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 9: τελικό προϊόν.

Το ένζυμο που προέκυψε από το τελευταίο βήμα χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή κρυστάλλων της *rmGPb* όπως αναλύεται στην παράγραφο 4.8.1. Κρύσταλλοι της *rmGPb* παρουσιάζονται στην Εικόνα 41.

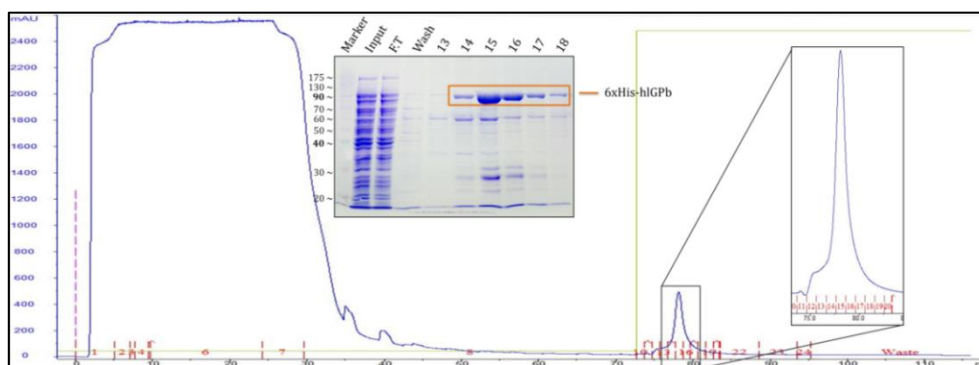


Εικόνα 41: Κρύσταλλοι της *rmGPb*.

5.2. Απομόνωση και καθαρισμός της *hlGPb*

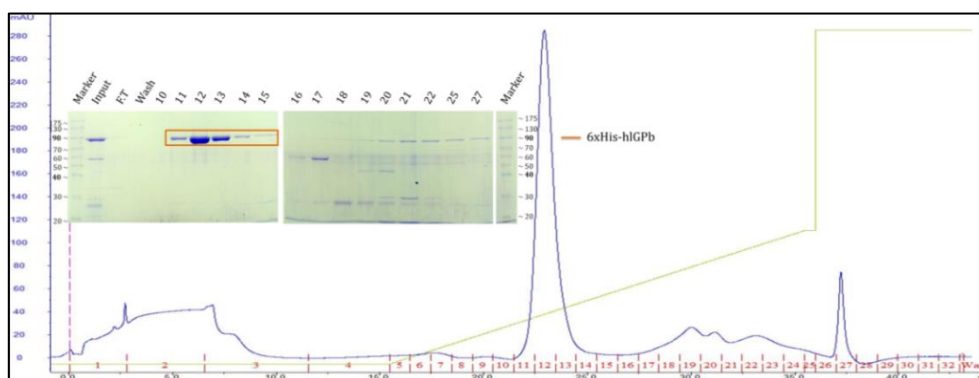
Η διαδικασία αναγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.5.2. Παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα και οι αναλύσεις σε *SDS-PAGE* κατά την πορεία του καθαρισμού.

1^ο Βήμα καθαρισμού: HiTrap TALON crude (IMAC με ακινητοποιημένα Co^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης, GE HealthCare)



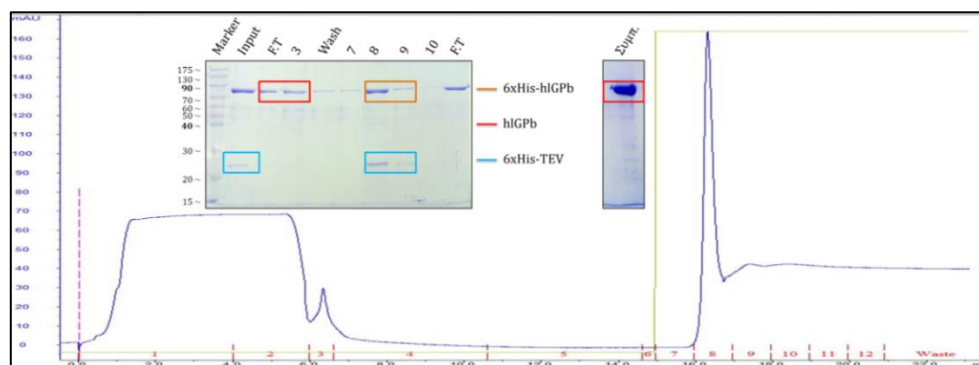
Εικόνα 42: Το χρωματογράφημα και η ανάλυση SDS-PAGE που προέκυψε από τον καθαρισμό της *hIGPb* με στήλη με ακινητοποιημένα Co^{2+} . Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε στα κλάσματα 14-18. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του UV (280 nm) του δείγματος που έβγαине από τη στήλη και η πράσινη γραμμή το επί τοις εκατό ποσοστό του διαλύματος B.

2^ο Βήμα καθαρισμού: Resource Q (Στήλη άνιο-ιοντοανταλλαγής, GE HealthCare)



Εικόνα 43: Το χρωματογράφημα και η ανάλυση SDS-PAGE που προέκυψε από τον καθαρισμό της *hIGPb* με στήλη με άνιο-ιοντοανταλλαγής. Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε στα κλάσμα 11-15 (~ 15 % διαλύματος B, δηλαδή ~ 150 mM NaCl). Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του UV (280 nm) του δείγματος που έβγαине από τη στήλη και η πράσινη γραμμή το επί τοις εκατό ποσοστό του διαλύματος B.

3^ο Βήμα καθαρισμού: HisTrap FF, 5 mL (IMAC με ακινητοποιημένα Ni^{2+} , GE HealthCare)



Εικόνα 44: Το χρωματογράφημα και η ανάλυση SDS-PAGE που προέκυψε από τον καθαρισμό της *hIGPb* με στήλη με ακινητοποιημένα Ni^{2+} με σκοπό το διαχωρισμό της τμημένης πρωτεΐνης από την άτμητη και την TEV-*His_{x6}*. Η *hIGPb* δεν προσδέθηκε στη στήλη (F.T.) ενώ η άτμητη *hIGPb* (*hIGPb-His_{x6}*) και η πρωτεάση TEV-*His_{x6}* προσδέθηκαν στη στήλη και η έκλυση τους έγινε στα κλάσματα 8-9. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του UV (280 nm) του δείγματος που έβγαине από τη στήλη και η πράσινη γραμμή το επί τοις εκατό ποσοστό του διαλύματος B. Επιπλέον, παρουσιάζεται και μια διαδρομή με το απομονωμένο και συμπυκνωμένο ένζυμο (Συμπ.).

Η απόδοση της μεθόδου ήταν 50 μg *hIGPb* ανά λίτρο υγρής βακτηριακής καλλιέργειας.

5.3. ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗ GP

5.3.1. Γλυκοπυρανοσυλιδενο-σπείρο-ιμιδαζολινόνες ως αναστολείς της *hIGP*

Οι τρεις κύριες κατηγορίες αναλόγων γλυκόζης που έχουν μελετηθεί και οδηγούν σε αναστολή της GP με τιμές των K_i της τάξης μικρών μM είναι ανάλογα: α) c-γλυκοπυρανόσυλο-ετεροκυκλικών ενώσεων [161] β) N-άκυλο-N'-γλυκοπυρανόσυλο-ουρίας [82, 162, 163] και γ) γλυκοπυρανοσυλιδενο-σπείρο-ετεροκυκλικών ενώσεων [82]. Η χορήγηση γλυκοπυρανοσυλιδενο-σπείρο-θειουδαντοΐνης (TH) σε διαβητικούς αρουραίους *Zucker* [158] οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και σε αύξηση της ευαισθησίας των ιστών στόχων στην ινσουλίνη [159]. Οι γλυκοπυρανοσυλιδενο-σπείρο-θειουδαντοΐνες εμφανίζουν K_i σε επίπεδα χαμηλών μM και μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X έδειξαν ότι αυτή η αναστολή φαίνεται οφείλεται στη σπειροδικυκλική δομή. Στις ενώσεις αυτές το άτομο NH συμμετέχει σε ένα δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο *His377*, το οποίο βρίσκεται κοντά στο καταλυτικό κέντρο. Επιπλέον, οι πολικές ομάδες της υδαντοΐνης συμμετέχουν σε διαμεσολαβούμενες από μόρια ύδατος αλληλεπιδράσεις με κατάλοιπα της πρωτεΐνης [29, 247]. Αργότερα, μελετήθηκαν άλλες σπειροκυκλικές ενώσεις όπως οι οξαθειαζόλες [248] (Πίνακας 32, **37-38**) και οι ισοξαζολίνες (Πίνακας 32, **35-36**) [249] οι οποίες εμφάνισαν K_i στο εύρος των nM όταν είχαν ως υποκαταστάτη μια ομάδα 2-ναφθαλενίου. Σε αυτές τις ενώσεις οι κρυσταλλογραφικές μελέτες απεκάλυψαν ότι δε σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου με την *His377* και η ισχυρή πρόσδεση του αναστολέα οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει ο αρωματικός δακτύλιος με κατάλοιπα από τη β-εσοχή του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι κυρίως *van der Waals* και ενδεχομένως αντικαθιστούν τη συνεισφορά των πολικών αλληλεπιδράσεων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Επιπλέον, η χορήγηση μιας δόσης σπείρο-ισοξαζολίνης σε αρουραίους *Zucker*, οδήγησε σε μείωση της παραγωγής της γλυκόζης από το ήπαρ κατά το 1/3 υποδηλώνοντας ότι αυτή η ένωση, ενδεχομένως, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για φαρμακευτικούς σκοπούς [160].

Προκειμένου να κατανοήσουμε τα σημαντικά χαρακτηριστικά αυτών των σπειροκυκλικών ενώσεων, μελετήσαμε τις ενώσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακας 32 οι οποίες μοιράζονται χαρακτηριστικά με τις δύο κατηγορίες σπειροκυκλικών ενώσεων που αναφέραμε παραπάνω. Αυτές οι γλυκοπυρανοσυλιδενο-σπείρο-ιμιδαζολινόνες διέθεταν ως υποκαταστάτη στο δακτύλιο της ιμιδαζολινόνης είτε φαινύλιο (Πίνακας 32, **10** και **28**), είτε ναφθαλένιο στη θέση 1 (Πίνακας 32, **11** και **29**), ή 2 (Πίνακας 32, **12** και **30**). Επιπλέον, έγινε σύνθεση και μελέτη

των (R) και των αντίστοιχων (S) επιμερών τους. Η αξιολόγηση της αναστολής διεξήχθη με κινητικές μελέτες ενώ εκπονήθηκαν και κρυσταλλογραφικές μελέτες για τον προσδιορισμό του τρόπου πρόσδεσης των ενώσεων και τη σύγκριση του με άλλες σπειροκυκλικές ενώσεις. Η σύνθεση των ενώσεων αυτών έγινε από το εργαστήριο του καθηγητή *László Somsák* από το Πανεπιστήμιο του *Debrecen* της Ουγγαρίας.

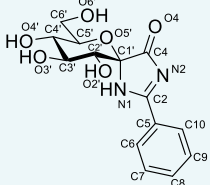
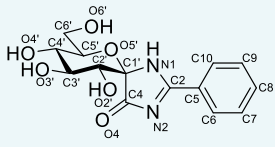
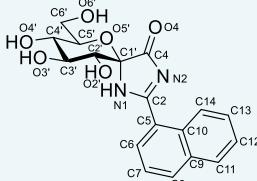
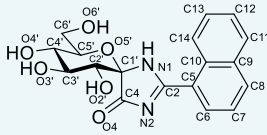
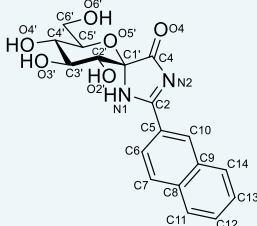
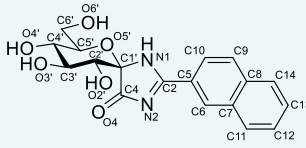
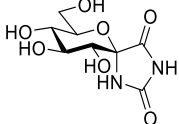
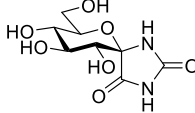
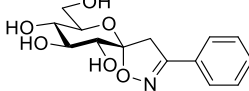
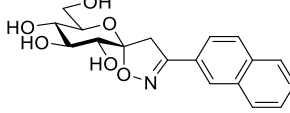
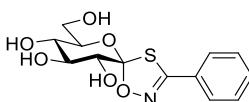
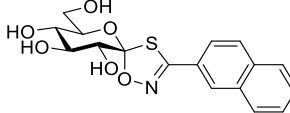
Κινητικές μελέτες

Η αξιολόγηση των γλυκοπυρανοσυλιδενο -σπείρο-ιμιδαζολινονών ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την GP έγινε με προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής τους ως προς τις *rmGPa* και *hlGPa*. Οι αναστολείς εμφάνισαν συναγωνιστική αναστολή ως προς το υπόστρωμα (*G1P*) όπως φάνηκε από τα διαγράμματα *Lineweaver-Burk* και οι K_i που υπολογίστηκαν για κάθε ένωση παρουσιάζονται στον Πίνακα 32. Η συγγένεια των αναστολέων, όπως φανερώνεται από τις K_i , φαίνεται να ακολουθεί παρόμοιο μοτίβο ως προς τα δύο ένζυμα. Αν συγκρίνουμε τις τιμές των K_i θα παρατηρήσουμε ότι τα (R) σπείρο-επιμερή **28**, **29**, **30** είναι πιο ισχυροί αναστολείς από τα αντίστοιχα (S) σπείρο-επιμερή **10**, **11**, και **12** κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί και μεταξύ των επιμερών σπείρο-υδαντοϊνών **33** και **34** [250-252] (Πίνακας 32). Η αναστολή κατά φθίνουσα σειρά μεταξύ των δύο κατηγοριών των επιμερών ως προς τον υποκαταστάτη του δακτυλίου της ιμιδαζολινόνης είναι:

- (S) επιμερή: φαινύλιο (**10**) > 2-ναφθαλένιο (**12**) > 1-ναφθαλένιο (**11**)
- (R) επιμερή: 2-ναφθαλένιο (**30**) > φαινύλιο (**28**) > 1-ναφθαλένιο (**29**)

Παρόμοια κατάταξη σε ότι αφορά τα (R) επιμερή έχει παρατηρηθεί και για άλλα ανάλογα γλυκόζης όπως *N*-ακυλ-β-*D*-γλυκοπυρανοσυλαμίνες, *N*-ακυλ-*N'*-β-*D*-γλυκοπυρανόσυλο-ουρίες και *C*-β-*D*-γλυκοπυρανόσυλο-ετεροκυκλικές ενώσεις [82, 161]. Ο πλέον δραστικός αναστολέας είναι ο **30** με τιμή K_i ίση με $1.7 \mu\text{M}$ ως προς την *hlGPa* και αποτελεί τον τρίτο πιο ισχυρό αναστολέα από την οικογένεια των γλυκοπυρανοσυλιδενο-σπείρο-ετεροκυκλικών ενώσεων [82] αλλά και έναν από τους πιο ισχυρούς αναστολείς της GP γενικότερα. Επιπλέον, η απόκλιση της τιμής της K_i του **30** μεταξύ των δύο ενζύμων είναι η μικρότερη συγκριτικά με τους άλλους αναστολείς υποδεικνύοντας ότι ο αναστολέας δε συμπεριφέρεται διαφορετικά μεταξύ των δύο ενζύμων. Η σύγκριση των υπό μελέτη ενώσεων με άλλες γνωστές γλυκοπυρανοσυλιδενο-σπείρο-ετεροκυκλικές ενώσεις ως προς την *rmGPb* έδειξε ότι η ιμιδαζολινόνη **28** ($K_i = 9 \mu\text{M}$, [253]) είναι πιο ισχυρή από την ισοξαζολίνη **35** ($K_i = 19.6 \mu\text{M}$, [249]) και την οξαθειαζόλη **37** ($K_i = 26 \mu\text{M}$, [248]).

Πίνακας 32: Οι σταθερές αναστολής μαζί με την αρίθμηση που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα κρυσταλλογραφίας για κάθε αναστολέα. Με σκίαση επισημαίνονται οι ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν τις K_i που έχουν προσδιοριστεί ως προς την *rmGPb*. Επιπλέον, αναφέρονται και άλλες ενώσεις που μελετήθηκαν στο παρελθόν για λόγους σύγκρισης.

Όνομασία-Χημική δομή	K_i [μM]		Όνομασία-Χημική δομή	K_i [μM]	
	<i>rmGPa</i>	<i>hlGPa</i>		<i>rmGPa</i>	<i>hlGPa</i>
	34.2 ± 0.6 (136 [253])	96.7 ± 2.8		4.5 ± 0.3 (9.0 [253])	8.4 ± 0.4
10			28		
	653 ± 18 (Δ.Π. * [253])	1174 ± 37		6.6 ± 0.2 (13.0 [253])	22.2 ± 0.9
11			29		
	212.4 ± 15.9 (25%** [253])	370.8 ± 14.5		1.13 ± 0.06 (2.11 [253])	1.72 ± 0.07
12			30		
	(105 [251]) (320 [252])			(3.1 [250])	
33			34		
	(19.6 [249])			(0.63 [249])	
35			36		
	(26 [248])			(0.16 [248])	
37			38		

*Δεν παρατηρήθηκε αναστολή σε 625 μM αναστολέα.

**Το ποσοστό της αναστολής επιτεύχθηκε με χρήση 625 μM αναστολέα.

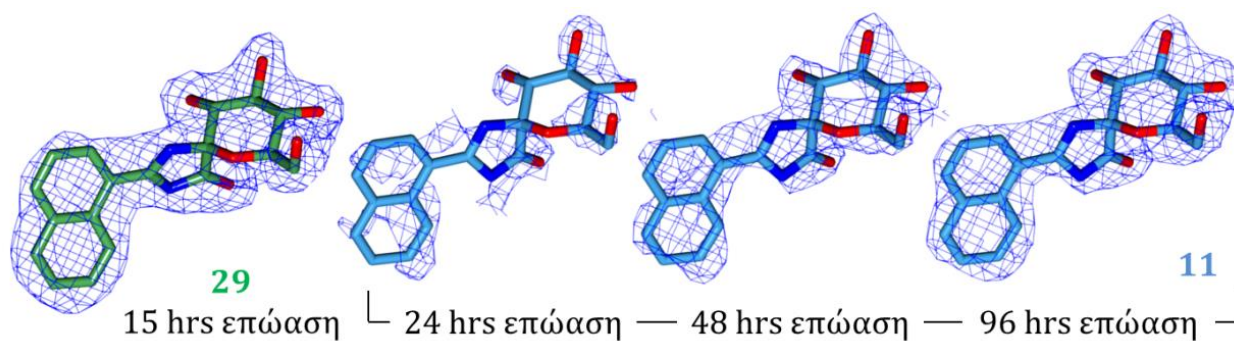
Αυτή η διαφορά (2-3 φορές) αν και δεν είναι τόσο μεγάλη όσο θα περιμέναμε, φαίνεται να επαληθεύει την υπόθεση στη βάση της οποίας σχεδιάστηκαν τα παράγωγα μιδαζολινόνης. Αντίθετα, μεταξύ των παραγώγων τα οποία είχαν ως υποκαταστάτη μια ομάδα 2-ναφθαλενίου, δεν παρατηρείται το ίδιο μοτίβο. Η μιδαζολινόνη **30** ($K_i = 2.1 \mu\text{M}$, [253]) φαίνεται να είναι ασθενέστερος αναστολέας από την αντίστοιχη ισοξαζολίνη **36** ($K_i = 0.63 \mu\text{M}$,

[249]) και την οξαθειαιζόλη **38** ($K_i = 0.16 \mu M$, [248]). Προκειμένου να διαλευκάνουμε την αιτία για την οποία η υπόθεση της αυξημένης βιοδραστικότητας των ιμιδαζολινονών δεν ισχύει για τα παράγωγα με μια ομάδα 2-ναφθαλενίου προχωρήσαμε σε δομικές μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X.

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-X

Ο προσδιορισμός του τρόπου πρόσδεσης των υπό μελέτη ενώσεων στη GP έγινε με χρήση κρυστάλλων της *rmGPb*, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως στην παράγραφο 4.8.2. Πιο συγκεκριμένα, οι κρύσταλλοι εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 10 mM BES pH 6.7, 10 % v/v DMSO και αναστολέα. Παρακάτω, αναφέρονται οι συγκεντρώσεις του κάθε αναστολέα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο χρόνος εμβάπτισης του κρυστάλλου στο διάλυμα του αναστολέα πριν τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων:

- **10**: 10 mM, 19 h
- **28**: 10 mM, 14 h
- **11**: 7.5 mM, 96 h
- **29**: 7.5 mM, 15 h
- **12**: 10 mM, 96 h
- **30**: 10 mM, 29 h



Εικόνα 45: Χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας από κρυστάλλους *rmGPb* οι οποίοι είχαν επωαστεί με 10 mM διαλύματος του αναστολέα **11** για διάφορες χρονικές διάρκειες. Παρατηρούμε ότι υπάρχει αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο καταλυτικό κέντρο ως προς τον χρόνο. Για λόγους σύγκρισης παρουσιάζεται και η ηλεκτρονιακής πυκνότητας για τον αναστολέα **29**. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται λόγω σπείρο-επιμερισμού του *S*-επιμερούς **11** (βλ. παρακάτω) κατά την επώαση με τον κρύσταλλο. Λόγω αυτού του σπείρο-επιμερισμού, ο κρύσταλλος δεσμεύει από το διάλυμα το επιμερές με τη μεγαλύτερη συγγένεια, δηλαδή το *R*, με αποτέλεσμα η ισορροπία στο διάλυμα να μετατοπίζεται σταδιακά προς αυτό.

Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε σε συμβατή πηγή ακτίνων-X (*CuK α*) με το σύστημα περίθλασης *Oxford Diffraction SuperNova* όπως αναλύεται στην αντίστοιχη παράγραφο 4.8.2. Τα στατιστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 33.

Πίνακας 33: Σύνοψη των παραμέτρων της επεξεργασίας των δεδομένων περίθλασης και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης για τα σύμπλοκα της *rmGPb* με τους αναστολείς. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

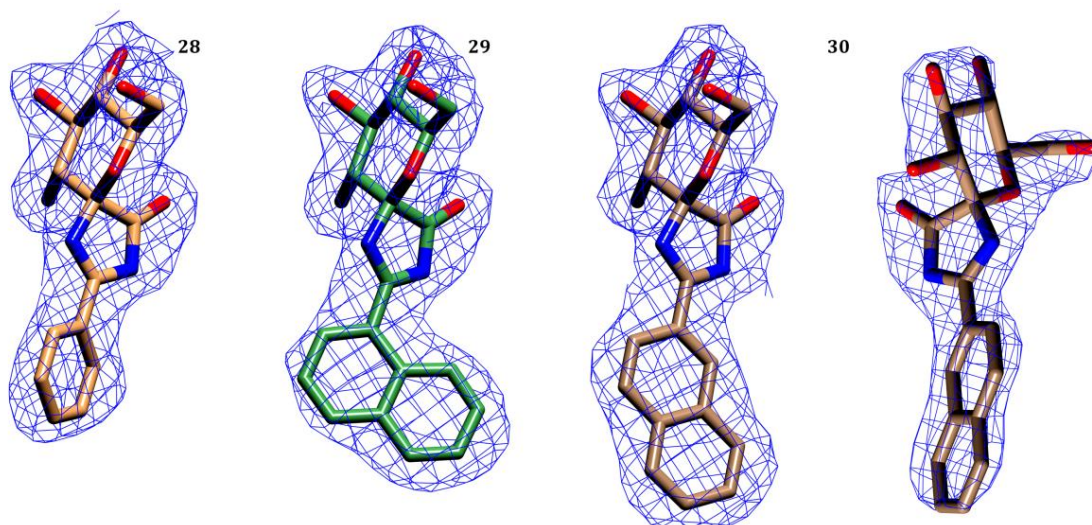
Σύμπλοκο <i>rmGPb</i>	10	11	12	28	29	30
Στατιστικοί δείκτες συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων						
Ευκρίνεια (Å)	13.53 - 2.30	13.55 - 2.30	13.74 - 2.28	13.44 - 2.35	13.70 - 2.36	13.69 - 2.40
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2.39 - 2.30	2.38 - 2.30	2.36 - 2.28	2.44 - 2.35	2.45 - 2.36	2.49 - 2.40
Ανακλάσεις	200015	212848	202859	173043	204077	197811
Μοναδικές ανακλάσεις	39153 (3172)	39926 (3073)	41141 (2962)	37248 (3258)	35956 (3168)	33997 (2975)
Πολλαπλότητα	5.1 (3.5)	5.3 (3.3)	4.9 (2.9)	4.6 (3.3)	5.7 (4.1)	5.8 (4.2)
R_{sym}	0.082 (0.709)	0.086 (0.686)	0.091 (0.769)	0.073 (0.610)	0.080 (0.583)	0.074 (0.402)
Πληρότητα (%)	90.4 (71.2)	91.7 (73.8)	92.0 (70.2)	91.6 (77.9)	90.2 (76.8)	90.3 (76.8)
$\langle I/\sigma I \rangle$	11.4 (1.4)	11.9 (1.5)	12.2 (1.4)	12.4 (1.6)	15.1 (2.3)	16.5 (3.3)
$CC^{1/2}$	0.991 (0.784)	0.993 (0.805)	0.991 (0.727)	0.993 (0.804)	0.996 (0.859)	0.997 (0.925)
Στατιστικοί δείκτες βελτιστοποίησης						
R_{cryst}	0.150 (0.244)	0.157 (0.248)	0.158 (0.256)	0.157 (0.253)	0.141 (0.227)	0.141 (0.213)
R_{free}	0.202 (0.246)	0.213 (0.298)	0.211 (0.329)	0.211 (0.339)	0.191 (0.275)	0.200 (0.242)
Αριθμός μορίων διαλύτη	261	227	251	221	229	228
Απόκλιση <i>r.m.s.</i> από τις ιδεατές τιμές						
Μήκος δεσμών (Å)	0.008	0.009	0.008	0.007	0.008	0.012
Γωνίες (°)	1.2	1.3	1.5	1.1	1.2	1.5
Μέση τιμή παράγοντα θερμικής κίνησης (Å²)						
Άτομα πρωτεΐνης	30.9	30.5	21.4	33.7	31.2	29.0
Μόρια διαλύτη	28.9	29.0	30.7	30.7	28.2	26.2
Άτομα αναστολέα	18.17**	30.3**	55.3*	20.6	20.1	17.3/55.5*
PDB entry				6QA8	6QA7	6QA6

*Τιμές για τον αναστολέα που βρέθηκε συνδεδεμένος και στο νέο αλλοστερικό κέντρο.

** Οι τιμές τις μέσης τιμής του παράγοντα θερμικής κίνησης για τα σύμπλοκα των *S*-επιμερών **10** και **11** αναφέρεται στην πρόσδεση των *R*-επιμερών, καθώς μόνο τα *R*-επιμερή βρέθηκαν προσδεδεμένα στον κρύσταλλο ακόμα και όταν η επώαση έγινε με τα *S*-επιμερή, όπως αναλύεται παρακάτω.

Το πιο ενδιαφέρον εύρημα από τις μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ ήταν η αποτυχία σύνδεσης των αναστολέων **10** και **11** στο ένζυμο ύστερα από 10 *h* επώασης με το διάλυμα του αναστολέα. Ωστόσο, όταν εφαρμόσαμε περισσότερες ώρες επώασης (> 14 *h*) αρχίσαμε να παρατηρούμε την πρόσδεση των επιμερών τους (**28** και **29** αντίστοιχα). Η σταδιακή αύξηση του χρόνου επώασης οδήγησε σε σταδιακή αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας που καταλάμβανε ο αναστολέας στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 45:). Η ανάλυση των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας για τις έξι υπό μελέτη ενώσεις, έδειξε ότι σε κάθε περίπτωση μόνο τα (*R*) επιμερή βρέθηκαν προσδεδεμένα στο ένζυμο. Αυτή η παρατήρηση βρίσκεται σε συμφωνία με τις κινητικές μελέτες όπου παρουσιάζεται μεγάλη διαφορά στις *K_i* μεταξύ των ζευγών των επιμερών, υποδηλώνοντας ότι η πρωτεΐνη στον κρύσταλλο συνδέει κατά προτίμηση μόνο με το ένα επιμερές. Η σταδιακή εμφάνιση και των δύο επιμερών στο

διάλυμα επώασης των κρυστάλλων συνάδει με τον πιθανό σπείρο-επιμερισμό των ιμιδαζολινονών που παρατηρήθηκε κατά τη σύνθεση των ενώσεων [253]. Η πρόσδεση της ένωσης με τη μεγαλύτερη συγγένεια οδήγησε σε εξάντληση αυτού του επιμερούς από το διάλυμα επώασης μετατοπίζοντας την ισορροπία προς αυτό το επιμερές με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πληρότητα του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Ο αναστολέας **12** δεν φάνηκε να προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο ακόμα και μετά από 96 ώρες επώασης αλλά παρατηρήθηκε να προσδένεται στο νέο αλλοστερικό κέντρο ενώ το αντίστοιχο (*R*) επιμερές του (**30**) βρέθηκε να προσδένεται και στα δύο κέντρα.



Εικόνα 46: Οι χάρτες $2F_o-F_c$ που υπολογίστηκαν για τις ενώσεις **28** και **29** για το καταλυτικό κέντρο. Για τον αναστολέα **30** παρουσιάζονται οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας τόσο για το καταλυτικό κέντρο (αριστερά) όσο και για το νέο αλλοστερικό κέντρο (δεξιά). Οι χάρτες ήταν προσαρμοσμένοι σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των αναστολέων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Συνεπώς, σύμφωνα με τα παραπάνω, η ανάλυση του τρόπου πρόσδεσης των υπό μελέτη ενώσεων περιορίστηκε στα σύμπλοκα *rmGPb*-**28**, **29** και **30**. Οι ενώσεις προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και όλα τα άτομα τους εντοπίζονται καλά στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν (Εικόνα 46), ενώ για το σύμπλοκο *rmGPb*-**30** παρατηρήθηκε επιπλέον πυκνότητα και στο νέο αλλοστερικό κέντρο (Εικόνα 46). Η εφαρμογή βελτιστοποίησης της πληρότητας (Βλ. παράγραφο 4.1.6.13) για τον αναστολέα **30** έδειξε ότι στο καταλυτικό κέντρο εμφανίζει πληρότητα 1.0 και στο νέο αλλοστερικό κέντρο 0.7, υποδηλώνοντας ότι το κύριο κέντρο πρόσδεσης του αναστολέα είναι το καταλυτικό. Η πρόσδεση αναλόγων γλυκοπυρανόζης δευτερογενώς στο νέο αλλοστερικό κέντρο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες εργασίες [162].

Η τιμή της *r.m.s.d.* που προέκυψε μετά από υπέρθεση των τριών συμπλόκων των αναστολέων ως προς την δομή της ελεύθερης από αναστολείς *rmGPb* για τα καλά καθορισμένα κατάλοιπα

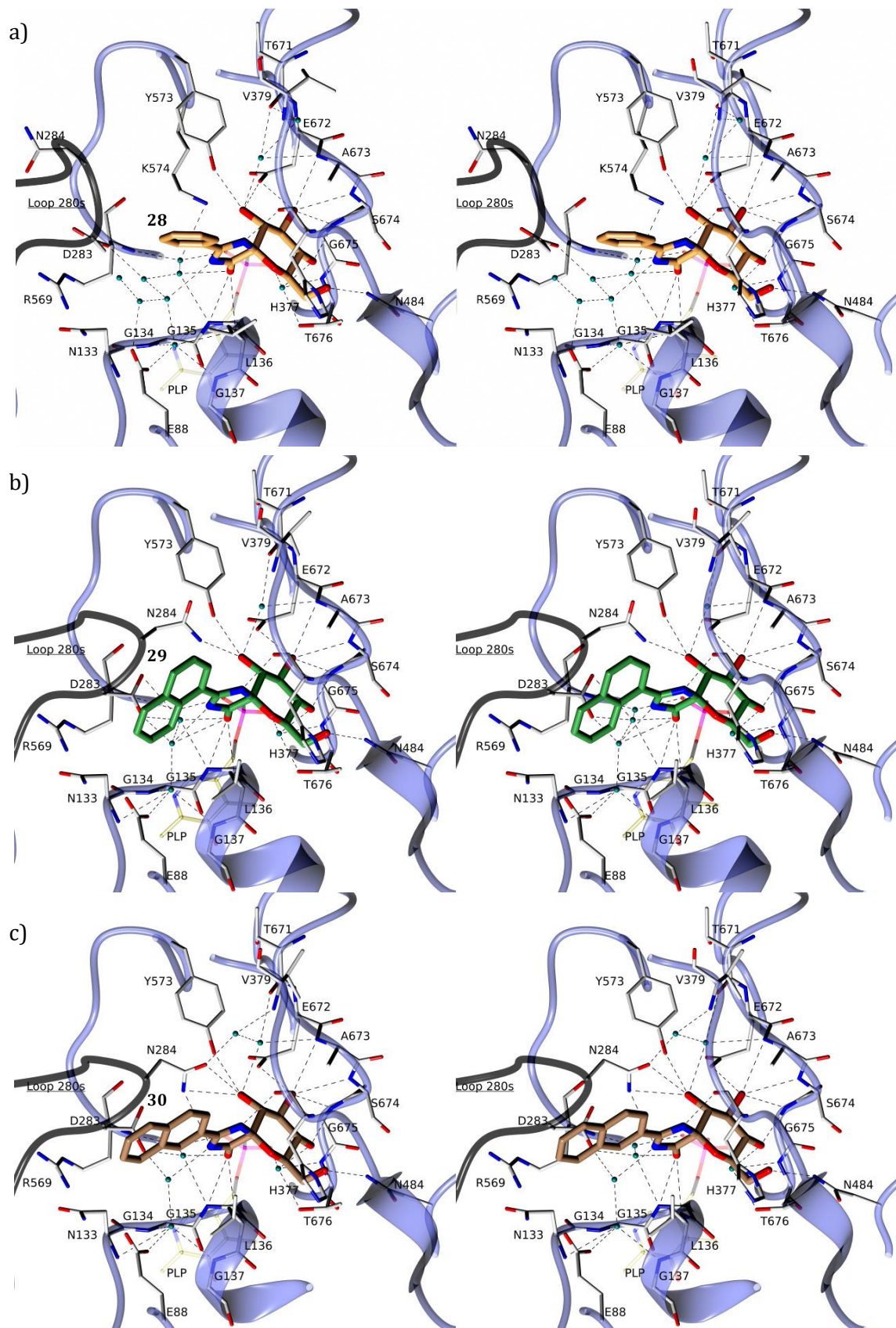
(18 - 49, 262 - 312 και 326 -829) ήταν 0.75, 0.67 και 0.66 Å για τα σύμπλοκα των αναστολέων **28**, **29** και **30** αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές υποδεικνύουν ότι δεν παρατηρείται σημαντική αλλαγή στη συνολική διαμόρφωση της πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση των αναστολέων.

Πίνακας 34: Πιθανοί δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των αναστολέων και των καταλοίπων του καταλυτικού κέντρου της *rmGPb*. Οι αριθμοί αναφέρονται σε αποστάσεις σε Å.

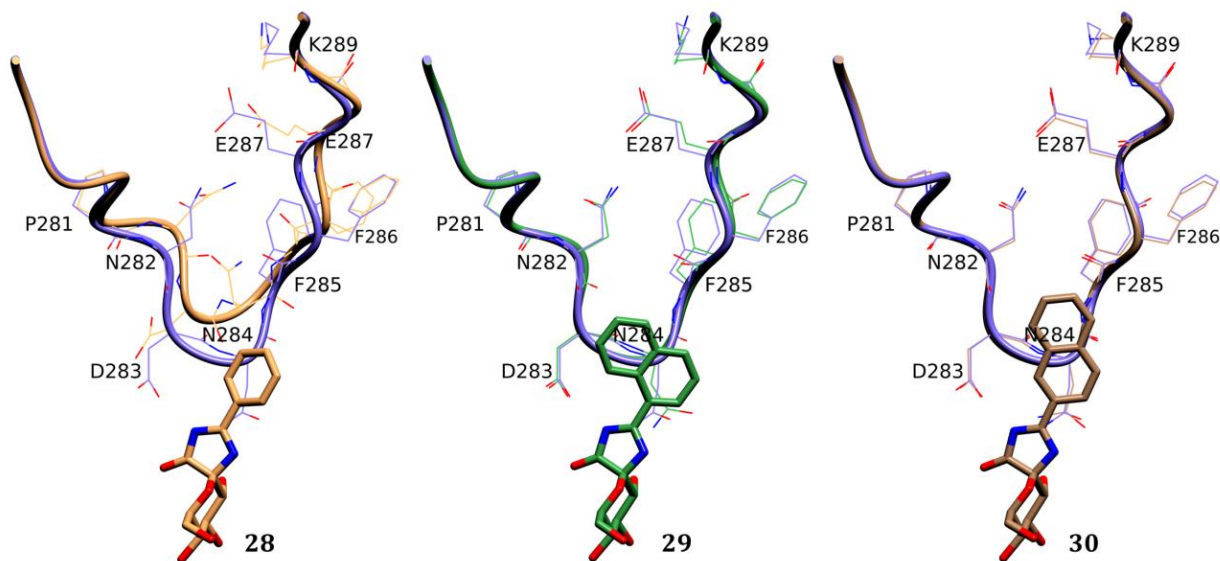
Άτομα αναστολέα*	Αποστάσεις (Å)			
	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος	28	29	30
02'	<i>Asn284 (ND2)</i>	-	2.8	3.1
	<i>Asn284 (OD1)</i>	-	-	3.2
	<i>Tyr573 (OH)</i>	3.3	3.3	3.3
	<i>Glu672 (OE1)</i>	3.3	-	-
	<i>Water321 (O)</i>	3.0	2.9	3.0
03'	<i>Glu672 (OE1)</i>	2.7	2.8	2.8
	<i>Ala673 (N)</i>	3.2	3.3	3.2
	<i>Ser674 (N)</i>	3.1	3.1	3.1
	<i>Gly675 (N)</i>	3.1	3.2	3.2
04'	<i>Gly675 (N)</i>	2.9	2.9	2.9
	<i>Water133 (O)</i>	2.6	2.6	2.6
06'	<i>Asn484 (ND2)</i>	2.7	2.6	2.8
	<i>His377 (ND1)</i>	2.7	2.7	2.7
N1	<i>His377 (O)</i>	2.7	2.8	2.9
N2	<i>Asn284 (ND2)</i>	-	-	3.3
	<i>Water311 (O)</i>	3.1	3.0	2.9
04	<i>Gly135 (N)</i>	3.3	3.3	3.2
	<i>Leu136 (N)</i>	3.2	3.2	3.2
	<i>Water59 (O)</i>	3.3	3.2	3.0
	<i>Water311 (O)</i>	-	3.3	-
Σύνολο		16	17	18

*Για την αρίθμηση των ατόμων των αναστολέων δείτε τον Πίνακα 32.

Η πρόσδεση των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο συμβαίνει αρχικά με την σύνδεση της γλυκοπυρανόζης στο κέντρο πρόσδεσης της γλυκόζης το οποίο αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου. Η πρόσδεση της γλυκοπυρανόζης κάθε αναστολέα γίνεται με ένα τυπικό πρότυπο δεσμών υδρογόνων (Πίνακας 34, Εικόνα 47) και αλληλεπιδράσεων *van der Waals* το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Επιπρόσθετα, τρία συντηρημένα μόρια ύδατος γεφυρώνουν αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ της γλυκοπυρανόζης κάθε αναστολέα και των καταλοίπων *Asp283*, *Asn284*, *Tyr573*, *Lys574*, *Thr671*, *Ala673*, *Thr676* και της φωσφορικής ομάδας 5' της *PLP* (Εικόνα 47). Μεταξύ των συμπλόκων των αναστολέων, υπάρχει μια σημαντική διαφορά σε ότι αφορά το δίκτυο των δεσμών υδρογόνου που δημιουργείται καθώς στο σύμπλοκο με τον αναστολέα **28** δε σχηματίζεται ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ του ατόμου 02' της γλυκοπυρανόζης και της πλευρικής αλυσίδας της *Asn284* (Εικόνα 47, Εικόνα 48) λόγω μια σημαντικής δομικής μεταβολής στη διαμόρφωση του βρόχου 280s (κατάλοιπα 282-289).



Εικόνα 47: Στέρεο-απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούν οι αναστολείς κατά την πρόσδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Παρουσιάζονται τα σύμπλοκα των αναστολέων α) 28, β) 29 και γ) 30. Τα μόρια ύδατος αποτυπώνονται με κυανές σφαίρες και οι δεσμοί υδρογόνου με διακεκομμένες γραμμές.

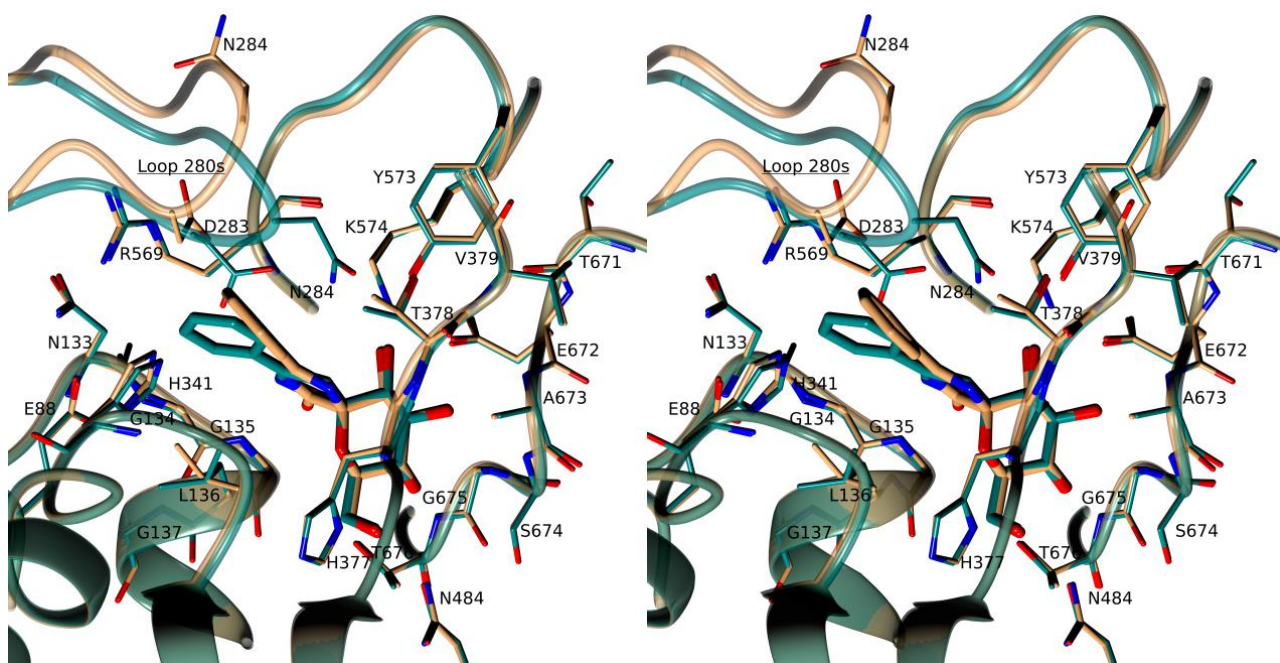


Εικόνα 48: Υπέρθυση της διαμόρφωσης του βρόχου 280s των συμπλόκων των *rmGPb-28* (πορτοκαλί), *29* (πράσινο), *30* (καφέ) ως προς τη δομή της ελεύθερης από αναστολείς *rmGPb* στη στερεοδιαμόρφωση-T (μωβ).

Στο σύμπλοκο του **28** ο βρόχος 280s αποκτά μια εντελώς διαφορετική διαμόρφωση συγκριτικά με αυτήν που έχει στα υπόλοιπα σύμπλοκα αλλά και με αυτή που υιοθετεί στην ελεύθερη από αναστολείς δομή (Εικόνα 48). Η τιμή της *r.m.s.d.* για όλα τα άτομα του βρόχου 280s μεταξύ των συμπλόκων *rmGPb-28/rmgGPb-29* και *rmGPb-28/rmGPb-30* είναι 2.0 και 2.1 Å αντίστοιχα, με τα κατάλοιπα *Asn282*, *Asn284*, *Phe285* και *Glu287* να είναι αυτά που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη απόκλιση. Η νέα διαμόρφωση του βρόχου 280s οδηγεί την *Asn284* εκτός του καταλυτικού κέντρου διακόπτοντας το δεσμό υδρογόνου με το άτομο της γλυκοπυρανόζης O2'. Αυτή η νέα διαμόρφωση σταθεροποιείται από το σχηματισμό ενός νέου δεσμού υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων *His571* και *Asp283*. Η απώλεια του δεσμού υδρογόνου μεταξύ του ατόμου O2' της γλυκοπυρανόζης και της *Asn284*, στο σύμπλοκο του **28**, αντισταθμίζεται από ένα δεσμό υδρογόνου που δημιουργείται μεταξύ του ίδιου ατόμου της γλυκοπυρανόζης και της πλευρικής αλυσίδας της *Glu672* (Εικόνα 47, Πίνακας 34). Η απώλεια του δεσμού υδρογόνου O2'-*Asn284* που παρατηρείται στο σύμπλοκο *rmGPb-28* ίσως μπορεί να εξηγήσει γιατί ο **28** παρουσιάζει ελαφρώς και όχι αρκετά ισχυρότερη αναστολή συγκριτικά με την αντίστοιχη ισοξαζολίνη **35** και την οξαθειαζόλη **37** (Πίνακας 32, Εικόνα 49).

Σε ότι αφορά τις δομές των συμπλόκων των **29** και **30**, η διαμόρφωση του βρόχου 280s παρουσιάζει μικρές αλλά αξιοσημείωτες διαφορές συγκριτικά με τη δομή της ελεύθερης από αναστολείς *rmGPb* (Εικόνα 48). Αυτές οι διαφορές καταγράφονται στο σύνολο του βρόχου 280s ως μετατόπιση εκτός του καταλυτικού κέντρου κατά ~ 0.4 Å στο σύμπλοκο *rmGPb-29* και ~ 0.3 Å στο σύμπλοκο *rmGPb-30* με το κατάλοιπο *Asn284* να είναι αυτό το οποίο εμφανίζει

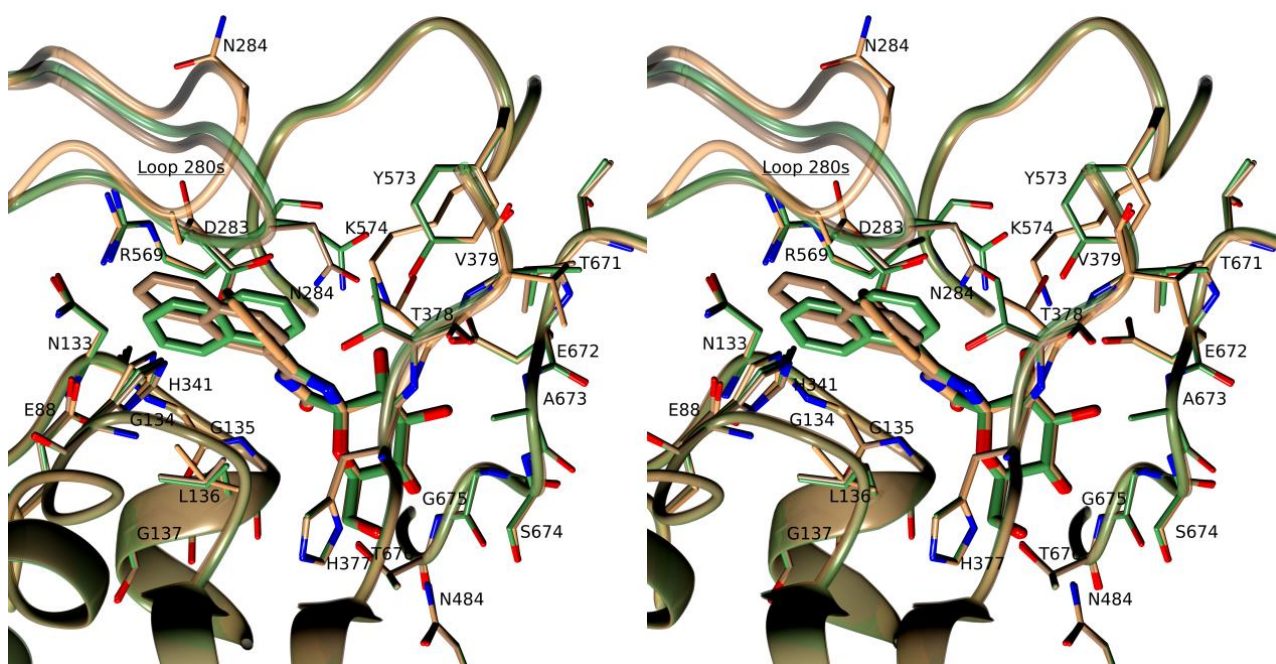
τη μεγαλύτερη αλλαγή. Αυτή η μετατόπιση ενδέχεται να οφείλεται στην παρουσία της υδρόφοβης ομάδας ναφθαλενίου των **29** και **30** η οποία απωθεί τα πολικά κατάλοιπα εκτός του καταλυτικού κέντρου. Ως εκ τούτου, στο σύμπλοκο *rmGPb-29* η *Asn284* δε βρίσκεται σε απόσταση που να της επιτρέπει τη δημιουργία δεσμού υδρογόνου με το άτομο *N2* του αναστολέα σε αντίθεση με το σύμπλοκο *rmGPb-30* όπου η απόσταση αυτή είναι μικρότερη και ο δεσμός υδρογόνου μπορεί να σχηματισθεί (Εικόνα 47, Πίνακας 34). Στα τρία σύμπλοκα των αναστολέων, το άτομο *O4* του καρβονυλίου του δακτυλίου της ιμιδαζολιόννης σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με τις αμιδικές ομάδες των καταλοίπων *Gly135* και *Leu136* (Πίνακας 34). Επιπλέον, συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου που γεφυρώνονται από μόρια ύδατος με τα άτομα της κύριας αλυσίδας της *Arg569*, τη φωσφορική ομάδα 5' της *PLP* και τα άτομα της πλευρικής αλυσίδας της *Asp283*.



Εικόνα 49: Στέρεο-απεικόνιση της υπέρθεσης του συμπλόκου *rmGPb-28* με το σύμπλοκο της αντίστοιχης σπείρο-ισοξαζολίνης **35** [249]. Παρουσιάζεται η μεγάλη διαφορά στη διαμόρφωση του βρόχου 280s (*Loop 280s*) μεταξύ των δύο συμπλόκων.

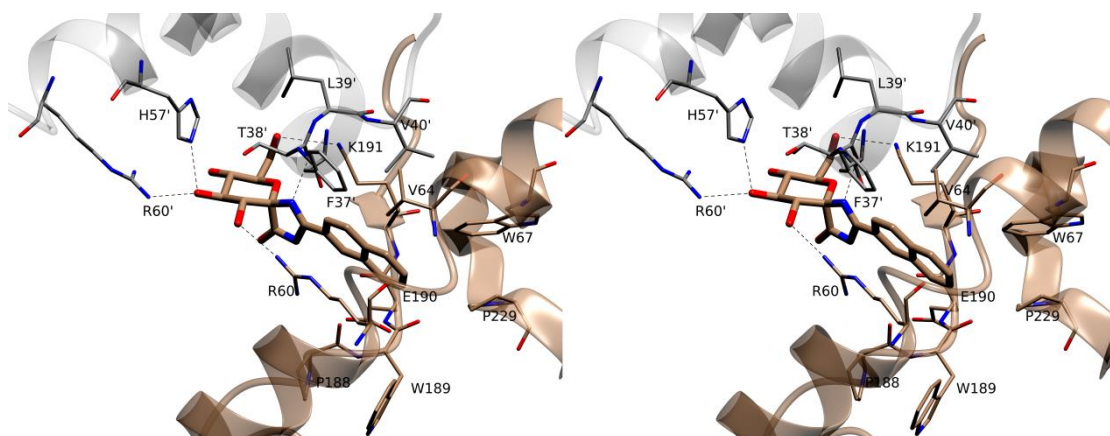
Κατά την πρόσδεση τους στο καταλυτικό κέντρο, οι **28**, **29**, και **30** συμμετέχουν σε συνολικά 49, 78 και 89 αλληλεπιδράσεις *van der Waals* αντίστοιχα. Αν επικεντρωθούμε στους αρωματικούς υποκαταστάτες των αναστολέων, η φαινυλική ομάδα του **28** συμμετέχει σε 5 μη-πολικές/πολικές αλληλεπιδράσεις *van der Waals* με τα κατάλοιπα *Asp283*, *Asp339*, *His341* και *His377*. Η ναφθαλενική ομάδα του **29** συμμετέχει σε 25 αλληλεπιδράσεις *van der Waals*: 15 μη-πολικές/πολικές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα *Glu88*, *Asn282*, *Asn284*, *His341*, *His377*, *Thr378*, *Ala383* και 10 μη-πολικές/μη-πολικές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα *Asn284*, *His341*, *Thr378* και *Ala383*. Η ναφθαλενική ομάδα του **30** συμμετέχει συνολικά σε 26

αλληλεπιδράσεις *van der Waals*: 10 μη-πολικές/μη-πολικές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα *Asn284*, *His341* και 16 μη-πολικές/πολικές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα *Asn284*, *Phe285*, *Arg292*, *His341*, *His377*, *Thr378* και *Ala383*. Η υπέρθεση των δομών των τριών συμπλόκων παρέχει μια εξήγηση για τις διαφορές που εμφανίζονται στις σταθερές αναστολής (Εικόνα 50). Το επίπεδο του φαινυλικού δακτυλίου του **28** εμφανίζει μια κλίση 50° ως προς τα επίπεδα των ομάδων ναφθαλενίου των **29** και **30** των οποίων τα επίπεδα διαφέρουν κατά ~ 17°. Αυτές οι διαμορφώσεις των αρωματικών ομάδων επιτρέπουν το σχηματισμό μιας κάθετης αλληλεπίδρασης π-επιστοίβαξης μεταξύ του ιμιδαζολικού δακτυλίου της *His341* στο σύμπλοκο *rmGPb-30* αλλά όχι στα άλλα δύο σύμπλοκα. Τα παραπάνω, προσφέρουν μια πιθανή εξήγηση της πιο μεγάλης συγγένειας του **30** για την *GP* συγκριτικά με τους άλλους δύο αναστολείς.



Εικόνα 50: Στέρεο-απεικόνιση της υπέρθεσης των τριών συμπλόκων, **28** (πορτοκαλί), **29** (πράσινο), **30** (καφέ).

Ο **30**, κατά τη πρόσδεση του στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου, συμμετέχει σε πέντε δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Το άτομο O6' του αναστολέα σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την αμιδική ομάδα της πλευρικής αλυσίδας της *Lys191* ενώ το άτομο O2' με την αμιδική ομάδα της *Arg60*. Το άτομο O3' του αναστολέα σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με άτομα της πλευρικής ομάδας της *His57'* και της *Arg60'* της συμμετρικής υπομονάδας (Πίνακας 35, Εικόνα 51). Επιπλέον, το άτομο N1 του δακτυλίου της ιμιδαζολινόνης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου *Thr38'* της συμμετρικής υπομονάδας. Η πρόσδεση του **30** σταθεροποιείται επιπλέον από το σχηματισμό 83 αλληλεπιδράσεων *van der Waals* (64 με τη μια υπομονάδα και 19 με τη συμμετρική της, Πίνακας 35).



Εικόνα 51: Στέρεο-απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του **30** στο νέο αλλοστερικό κέντρο της *rmGPb*. Οι δεσμοί υδρογόνου αποτυπώνονται με διακεκομμένες γραμμές και τα κατάλοιπα της συμμετρικής υπομονάδας επισημαίνονται με το σύμβολο «'» (γκρι χρώμα).

Η πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων αυτών σχηματίζονται μεταξύ της ομάδας του ναφθαλενίου και των καταλοίπων *Arg60*, *Val64*, *Trp67*, *Pro188*, *Trp189*, *Glu190*, *Lys191*, *Pro229* της μιας υπομονάδας και των καταλοίπων *Phe37'*, *Thr38'*, *Val40'* της συμμετρικής της υπομονάδας (Εικόνα 51).

Πίνακας 35: Οι πιθανοί δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις *van der Waals* που δημιουργεί ο αναστολέας **30** κατά τη σύνδεση του στο νέο αλλοστερικό κέντρο.

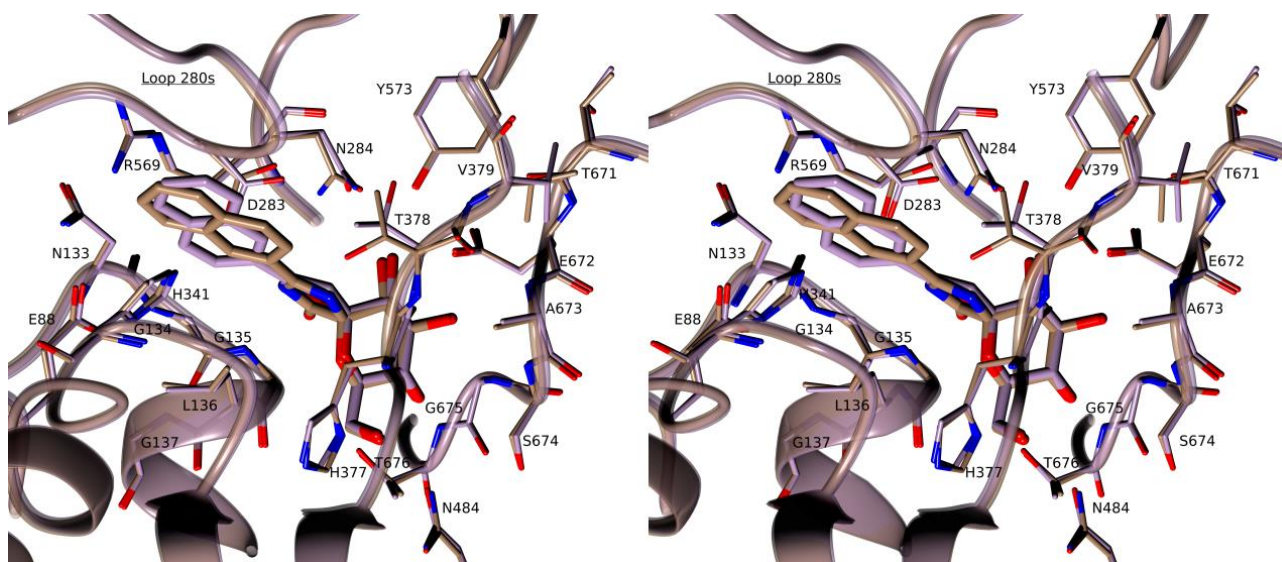
Άτομα αναστολέα	Δεσμοί υδρογόνου	Απόσταση (Å)	Αλληλεπιδράσεις <i>van der Waals</i>
			Κατάλοιπα πρωτεΐνης (άτομα)
<i>C1'</i>			<i>Thr38'(O)</i>
<i>C2'</i>			<i>Thr38'(CG2)</i>
<i>O2'</i>	<i>Arg60(NH2)</i>	3.3	
<i>C3'</i>			<i>His57'(NE2)</i>
<i>O3'</i>	<i>Arg60'(NH2)</i>	3.1	<i>His57'(CD2,CE1)</i> , <i>Arg60'(CZ,NH1)</i>
	<i>His57'(NE2)</i>	2.8	
<i>C4'</i>			<i>His57'(CE1,NE2)</i>
<i>O4'</i>			<i>His57'(NE2)</i>
<i>O5'</i>			<i>Lys191(CE,NZ)</i>
<i>C6'</i>			<i>Lys191(NZ)</i>
<i>O6'</i>	<i>Lys191(NZ)</i>	3.2	<i>Leu39'(CD2)</i>
<i>N1</i>	<i>Thr38'(O)</i>	2.9	<i>Arg60(NH2)</i> , <i>Lys191(CD,CE)</i> , <i>Thr38'(C)</i>
<i>C2</i>			<i>Arg60(CZ,NH1,NH2)</i> , <i>Lys191(CD)</i> , <i>Thr38'(O)</i>
<i>N2</i>			<i>Arg60(CZ,NH1,NH2)</i> , <i>Glu190(O)</i>
<i>C5</i>			<i>Arg60(NE,CZ,NH1,NH2)</i> , <i>Lys191(CD)</i> , <i>Thr38'(O)</i>
<i>C6</i>			<i>Arg60(NE,CZ,NH2)</i> , <i>Phe37'(O)</i> , <i>Thr38'(O)</i> , <i>Val40'(CG2)</i>
<i>C7</i>			<i>Arg60(CD,NE,CZ,NH2)</i> , <i>Phe37'(O)</i> , <i>Val40'(CG2)</i>
<i>C8</i>			<i>Arg60(CG,CD,NE,CZ)</i>
<i>C9</i>			<i>Arg60(CD,NE,CZ,NH1)</i> , <i>Pro188(O)</i> , <i>Glu190(O)</i>
<i>C10</i>			<i>Arg60(NE,CZ,NH1,NH2)</i> , <i>Pro188(O)</i> , <i>Glu190(C,O)</i>
<i>C11</i>			<i>Val64(CG2)</i> , <i>Arg60(CG,CD)</i>
<i>C12</i>			<i>Arg60(CD)</i> , <i>Trp67(CZ3)</i> , <i>Pro229(CG)</i>
<i>C13</i>			<i>Pro188(O)</i> , <i>Trp67(CZ3)</i> , <i>Trp189(CA,O,C)</i> , <i>Pro229(CG,CD)</i>
<i>C14</i>			<i>Arg60(CD)</i> , <i>Pro188(O)</i> , <i>Trp189(CA,O,C)</i> , <i>Glu190(C,O,N)</i>
Σύνολο		5	83

*Για την αρίθμηση των ατόμων των αναστολέων δείτε τον Πίνακα 32

Η σύνδεση του **30** στο νέο αλλοστερικό κέντρο προκαλεί τη μετακίνηση της πλευρικής αλυσίδας της *Arg60* κατά $\sim 3.0 \text{ \AA}$ ώστε να μπορέσει να τοποθετηθεί η 2-ναφθαλενομάδα του **30**. Αυτή η μετακίνηση προκαλεί επίσης, μια μικρή μετατόπιση της έλικας (κατάλοιπα 60 – 64) με τιμής *r.m.s.d* για όλα τα άτομα στο 1.0 \AA , μια δομική μεταβολή η οποία έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες σύνδεσης αναστολέων στο νέο αλλοστερικό κέντρο [36, 58, 98, 254, 255].

Οι **28** και **30** οι οποίοι μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή αναμενόταν να ήταν πιο ισχυροί αναστολείς της *GP* από τις αντίστοιχες σπείρο-ισοξαζολίνες **35** και **36** (Πίνακας 32) καθώς ήταν πιθανό να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μέσω των ατόμων *O4* και *N1* του δακτυλίου της ιμιδαζολινόνης. Πράγματι οι **28** και **30** είναι ικανοί να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου μέσω του ατόμου *O4* της ιμιδαζολινόνης και των αμιδικών ομάδων των κύριων αλυσίδων των καταλοίπων *Gly135* και *Leu136* και μέσω του ατόμου *N1* της ιμιδαζολινόνης και του οξυγόνου του καρβονυλίου της κύριας αλυσίδας του καταλοίπου *His377* (Εικόνα 47). Αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου μπορεί να είναι ο λόγος για τον οποίο η **28** ($K_i = 9.0 \mu\text{M}$ [253]) είναι πιο ισχυρός αναστολέας από την αντίστοιχη **35** ($K_i = 19.6 \mu\text{M}$ [249]). Η παρουσία αυτών των δεσμών υδρογόνου είναι σημαντική γιατί δεν οδηγεί απλά σε εξισορρόπηση του ενεργειακού κόστους λόγω της αλλαγής της διαμόρφωσης του βρόχου 280s που προκαλείται από την σύνδεση του **28** (Εικόνα 49), αλλά προσδίδουν στον **28** λίγο περισσότερο από δύο φορές μεγαλύτερη ανασταλτική ισχύ συγκριτικά με τον **35**. Σε ότι αφορά τον **30** ($K_i = 2.1 \mu\text{M}$ [253]), αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου δεν οδήγησαν σε αυξημένη συγγένεια ως προς το ένζυμο συγκριτικά με την αντίστοιχη σπείρο-ισοξαζολίνη **36** ($K_i = 0.6 \mu\text{M}$ [249]). Σύγκριση της δομής μεταξύ των συμπλόκων *rmGPb-30* και *rmGPb-36* έδειξε ότι η θέση της ομάδας του 2-ναφθαλενίου των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου διαφέρει κατά 180° ως προς τον δεσμό *C2-C5* (Εικόνα 52). Δεν υπάρχει κάποιος εμφανής λόγος για τον οποίο παρατηρείται αυτή η διαφορά αλλά αυτή η διαφορετική τοποθέτηση, οδηγεί σε διαφορετικές αλληλεπιδράσεις *van der Waals* μεταξύ των αναστολέων και των καταλοίπων της πρωτεΐνης. Η 2-ναφθαλενομάδα του **30** σχηματίζει 26 (10 μη-πολικές/μη-πολικές και 16 μη-πολικές/πολικές) αλληλεπιδράσεις *van der Waals* ενώ του **36** σχηματίζει 30 (9 μη-πολικές/μη-πολικές και 21 μη-πολικές/πολικές) αλληλεπιδράσεις *van der Waals* [249]. Επιπλέον, ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του ατόμου *N1* του **30** και του οξυγόνου του καρβονυλίου της *His377* οδηγεί σε μια μικρή αλλά σημαντική αλλαγή στη διαμόρφωση των καταλοίπων 377-379 συγκριτικά με το σύμπλοκο *rmGPb-36*, με πιο εμφανή την αλλαγή της διαμόρφωσης της *Thr378* (Εικόνα 52). Το ενεργειακό κόστος που σχετίζεται με αυτή τη δομική μεταβολή και ο μικρότερος αριθμός

αλληλεπιδράσεων *van der Waals* της 2-ναφθαλενομάδας του **30** συγκριτικά με τον **36** φαίνεται να αντισταθμίζονται από τους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούν τα άτομα O4 και N1 του δακτυλίου της ιμιδαζολινονης του **30** με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου. Έτσι, δεν παρουσιάζεται σημαντική διαφορά στην ανασταλτική ισχύ των δύο ενώσεων. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει περαιτέρω πρόσφατες μελέτες [58] όπου οι αλληλεπιδράσεις *van der Waals* επηρεάζουν την ανασταλτική ισχύ παραγώγων γλυκόζης. Το γεγονός ότι ο **30** δεν είναι τόσο ισχυρός όσο αναμενόταν, μπορεί επίσης να αποδοθεί στην ύπαρξη των ταυτομερών **30Ta** και **30Tb**, από τα οποία μόνο ο **30Tb** (υψηλής ενέργειας) προσδένεται στον κρύσταλλο. Επιπροσθέτως, η μάλλον ομοιόμορφη κατανομή του πληθυσμού των διαμορφώσεων κοστίζει σε ενθαλπία και εντροπία κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης μειώνοντας την ανασταλτική ισχύ του **30**.



Εικόνα 52: Στέρεο-απεικόνιση της υπέρθεσης του συμπλόκου *rmGPb-30* (καφέ) στο αντίστοιχο ανάλογο σπείρο-ισοξαζολίνης **36** (μωβ) [249].

Ο **30** έχει αξιολογηθεί επιπλέον σε μελέτες *ex vivo* όπου φάνηκε ότι μπορεί να αναστείλει την GP σε κύτταρα *HerG2*, στα οποία η γλυκογονόλυση είχε διεγερθεί με γλυκαγόνη, με τιμή IC_{50} ίση με 176.8 μM , χωρίς να παρατηρείται κυτταροτοξικότητα [253], υποδηλώνοντας ότι αυτός ο αναστολέας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες *in vivo*.

Συμπεράσματα

- Τα (*R*) σπείρο-επιμερή ήταν πιο ισχυροί αναστολείς από τα (*S*) σπείρο-επιμερή.
- Η ένωση **30** που είχε ως υποκαταστάτη 2-ναφθαλένιο εμφάνισε ισχυρότερη αναστολή ως προς τις *rmGPα* και *hlGPα* με τιμές των K_i στο εύρος των χαμηλών μM .

- Ο **30** είναι ένα από τα δέκα πιο ισχυρά ανάλογα γλυκοπυρανοσυλιδενο-σπείρο-ετεροκυκλικών ενώσεων ως προς την *GP*.
- Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ έδειξε ότι μόνο τα (*R*) επιμερή προσδένονται στον κρύσταλλο.
- Όλες οι ενώσεις σχηματίζουν ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με κατάλοιπα του βρόχου 280s (παρότι ο **28** οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης του βρόχου 280s) σταθεροποιώντας το ένζυμο στην διαμόρφωση *-T* αποτρέποντας έτσι την πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο.
- Δομική ανάλυση ανέδειξε σημαντικές αλληλεπιδράσεις: α) μεταξύ του οξυγόνου του καρβονυλίου της ιμιδαζολινόνης και των αμινομάδων των κεντρικών αλυσίδων των καταλοίπων *Gly135* και *Leu136* β) μεταξύ του ατόμου *NH* του δακτυλίου της ιμιδαζολινόνης και του οξυγόνου του καρβονυλίου της κύριας αλυσίδας της *His377* γ) με μόρια ύδατος τα οποία διαμεσολαβούν δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα *Asp283*, *Arg569* και τη φωσφορική ομάδα 5' της *PLP*.
- Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης και οι αλληλεπιδράσεις *van der Waals* των αρωματικών δακτυλίων με κατάλοιπα της β-εσοχής του ενζύμου.
- Η πρόσδεση του **28** οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης του βρόχου 280s η οποία αντισταθμίζεται κυρίως από τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζουν τα άτομα του δακτυλίου της ιμιδαζολινόνης.
- Η τοποθέτηση του 2-ναφθαλενίου του **30** επιτρέπει τη δημιουργία αλληλεπιδράσεων π-επιστοιβαξης με την *His341*
- Συγκριτικά με την σπείρο-υδαντοΐνη **34** η προσθήκη του 2-ναφθαλενίου στον **30** οδήγησε σε αύξηση της ανασταλτικής του δράσης.
- Σύγκριση της ισχύος της αναστολής μεταξύ των ιμιδαζολινονών **28**, **30** με τις αντίστοιχες ισοξαζολίνες **35**, **36** και οξαθειαζόλες **37**, **38** έδειξε ότι η αντικατάσταση του ετεροδακτυλίου με ιμιδαζολινονή οδήγησε σε πιο ισχυρή αναστολή μόνο για το φαίνυλο-υποκατεστημένο ανάλογο, ενώ για το 2-νάφθυλο-υποκατεστημένο ανάλογο η αναστολή ήταν ελαφρώς ασθενέστερη.

5.3.2. Μελέτες C-β-D-γλυκοπυρανόσυλο -θειαζολών, -ιμιδαζολών και μιας N-β-D γλυκοπυρανόσυλο -τετραζόλης ως αναστολείς της *hIGP*

Οι C-γλυκοπυρανόσυλο-ετεροκυκλικές ενώσεις αποτελούν μια από τις τρεις κατηγορίες των πιο ισχυρών αναστολέων ως προς την *GP* [161]. Πιο συγκεκριμένα, τέτοιες ενώσεις που διαθέτουν ένα δακτύλιο ιμιδαζολίου ή 1,2,4-τριαζολίου (**1-4**, Πίνακας 36) έχουν δείξει ιδιαίτερη ανασταλτική ισχύ σε προηγούμενες μελέτες [57, 58, 78, 80]. Τέτοιου τύπου αναστολείς που διαθέτουν μια ομάδα 2-ναφθαλενίου ως υποκαταστάτη στον ετεροκυκλικό δακτύλιο εμφανίζουν τιμές K_i ίσες με 26 nM (**2**, Πίνακας 36) και 172 nM (**4**, Πίνακας 36) ως προς την *hIGPa*. Η ισχύς τους έχει αποδοθεί σε ένα δεσμό υδρογόνου που δημιουργεί ο ετεροκυκλικός συνδέτης με το οξυγόνο του καρβονυλίου της κύριας αλυσίδας της *His377* αλλά και σε αλληλεπιδράσεις *van der Waals* των άρυλο- υποκαταστατών που εκτείνονται στη β-εσοχή του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου [57, 58, 80]. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις φαίνεται να είναι σημαντικές καθώς οι μισοί αναστολείς από αυτή τη κατηγορία που δεν σχηματίζουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις παρουσιάζουν $K_i > 100 \mu M$ [57, 58, 77, 80, 82]. Η αύξηση του αριθμού των N-ατόμων στο συνδέτη, όπως στην περίπτωση της C-γλυκοπυρανόσυλο-τετραζόλης **5** (Πίνακας 36) [256], οδήγησε σε αδρανή αναστολέα έναντι της *GP*. Χημικές ενώσεις της μορφής N-γλυκοπυρανόσυλο-αζόλης έχουν μελετηθεί λιγότερο συγκριτικά με τις αντίστοιχες C-γλυκοπυρανόσυλο-ενώσεις. Ενώσεις όπως οι 1-β-D-γλυκοπυρανόσυλο-1,2,3-τριαζόλες (όπως η **7**, Πίνακας 36) [257, 258] αναστέλλουν την *GP* με τιμές K_i στο εύρος των μM , ενώ οι 1-β-D-γλυκοπυρανόσυλο-4-φαινυλο-ιμιδαζόλες (ένωση **6**, Πίνακας 36) δεν εμφάνισαν αναστολή ως προς το ένζυμο [256]. Ένα σημαντικό συμπέρασμα από όλες τις μελέτες που αναφέρθηκαν παραπάνω, αποτελεί ο καθοριστικός τρόπος με τον οποίο επηρεάζει την ισχύ ενός αναστολέα ο συνδέτης της γλυκοπυρανόζης με την φαίνυλο- ή ναφθάλενο- ομάδα καθώς επίσης και το είδος του σακχάρου (C- ή N-γλυκοσυλική δομή). Επομένως, η μελέτη του τρόπου πρόσδεσης πολλών τέτοιων ενώσεων θα μας βοηθήσει να κατανοήσουμε σε βάθος τον τρόπο δράσης τους.

Σε αυτή την ενότητα επικεντρωθήκαμε σε κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες ενώσεων των οποίων η σύνθεση δημοσιεύτηκε πρόσφατα από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή *László Somsák* από το Πανεπιστήμιο του *Debrecen* της Ουγγαρίας. Μελετήσαμε τις C-γλυκοπυρανόσυλο-ιμιδαζόλες **8**, **9** [259], τις -θειαζόλες **10**, **11** [259] και **12**, **13** [78] καθώς και την N-γλυκοπυρανόσυλο-τετραζόλη **14** [256] ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την *GP*. Παράλληλα μελετήσαμε τον τρόπο πρόσδεσης τους στο ένζυμο. Ενώσεις

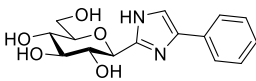
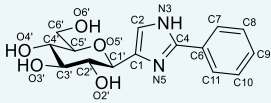
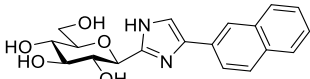
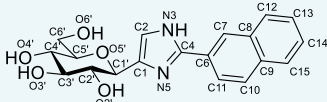
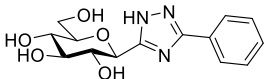
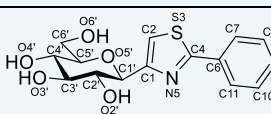
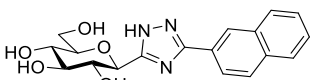
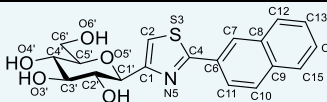
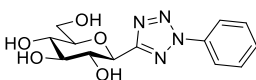
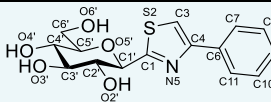
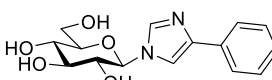
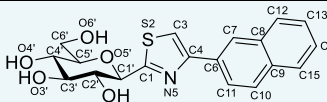
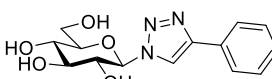
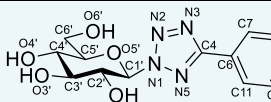
που περιέχουν αζολικές ομάδες και 1,2,3-τριαζόλες είναι ιδιαίτερα σημαντικές ως ενώσεις οδηγού για το σχεδιασμό φαρμάκων για διάφορες παθήσεις [260]. Επιπλέον, ενώσεις που περιέχουν θείο, ιδιαίτερα με τη μορφή ετεροκυκλικών ενώσεων, βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό φαρμάκων που κυκλοφορούν στην αγορά καθώς τέτοιες ενώσεις έχει δειχθεί πως εισέρχονται πιο εύκολα στα κύτταρα [261]. Επιπροσθέτως, η πρόσδεση των θειαζολικών ενώσεων **10** και **11** στη GP έχει διερευνηθεί πρόσφατα με *in silico* μελέτες [259].

Κινητικές μελέτες

Έγινε προσδιορισμός των τιμών των K_i για τις ενώσεις **8-14** (Πίνακας 36) ως προς την *rmGPa* και *hlGPa*. Στον Πίνακας 36 παρουσιάζονται επίσης οι τιμές των K_i ως προς την *rmGPb* για λόγους σύγκρισης, μιας και οι δομικές μελέτες έγιναν με κρυστάλλους της *rmGPb*. Όλοι οι αναστολείς εμφάνισαν συναγωνιστική αναστολή ως προς το υπόστρωμα, *G1P*, όπως παρουσιάστηκε στα διαγράμματα *Lineweaver-Burk*. Η ένωση η οποία προκάλεσε τη μεγαλύτερη αναστολή ήταν η **9** με τιμή της K_i ίση με $3.2 \mu M$ και $1.6 \mu M$ ως προς τις *hlGPa* και *rmGPa* αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, η ένωση **9** κατατάσσεται μέσα στους πιο ισχυρούς αναστολείς της GP [77] και βρίσκεται στην τρίτη θέση μεταξύ των γλυκοπυρανόσυλομιδαζολών που έχουν ανακαλυφθεί για την *hlGPa* [57]. Από τις τιμές των K_i μπορούμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι όλες οι υπό μελέτη ενώσεις ακολουθούν περίπου το ίδιο μοτίβο αναστολής μεταξύ των διαφορετικών ενζύμων αλλά φαίνεται να υπάρχει μια εκλεκτικότητα ως προς την *rmGPa* καθώς σχεδόν όλοι οι αναστολείς (εκτός από τους **12** και **14**), την αναστέλλουν πιο ισχυρά από ότι την *rmGPb* ή την *hlGPa*. Η διαφορά μεταξύ της *rmGPb* και της *hlGPa* θα μπορούσε να εξηγηθεί εάν αυτοί οι αναστολείς προσδένονταν και σε κάποιο άλλο κέντρο της GP εκτός από το καταλυτικό (π.χ. το αλλοστερικό κέντρο ή το κέντρο αναστολής), ωστόσο δεν παρατηρήθηκε συναγωνισμός με την AMP ή την καφεΐνη σε κινητικές μελέτες. Αυτή η διαφορά θα μπορούσε να εξηγηθεί αν η στερεοδιαμόρφωση-R των GPα (*rmGPa* και *hlGPa*) εμφανίζει μεγαλύτερη αγχιστεία για αυτούς τους αναστολείς από ότι η ενεργοποιημένη από AMP στερεοδιαμόρφωση-R της *rmGPb*.

Όπως ήταν αναμενόμενο και από την προηγούμενη ενότητα, οι αναστολείς οι οποίοι έφεραν μια ομάδα 2-ναφθαλενίου ήταν πιο ισχυροί αναστολείς από τους αντίστοιχους με μια ομάδα φαινυλίου (Πίνακας 36). Σε ότι αφορά τις θειαζόλες, ο πιο ισχυρός αναστολέας έφερε μια ομάδα 2-ναφθαλενίου (**11**). Τα ισομερή **10** και **12** είχαν παρόμοια τιμή της K_i ως προς την *hlGPa*. Επιπλέον, ο αναστολέας **11** με την ομάδα του 2-ναφθαλενίου είχε κατά 1.8 φορές μικρότερη K_i συγκριτικά με την ένωση **13**.

Πίνακας 36: Οι σταθερές αναστολές των ενώσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα ενότητα (επισημαίνονται με σκίαση) ως προς τις *rmGPa* και *hlGPa*. Η αριθμηση των ατόμων των αναστολέων αντιστοιχεί σε αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και οι τιμές στην παρένθεση αφορούν πειράματα στην *rmGPb* από προηγούμενες μελέτες.

Όνομασία-Χημική ένωση	K_i [μM]		Όνομασία-Χημική ένωση	K_i [μM]	
	<i>rmGPa</i>	<i>hlGPa</i>		<i>rmGPa</i>	<i>hlGPa</i>
 1	0.226 [57] (0.280 [78])	0.156 [57]	 8	17.7 \pm 0.5 (68.6 [259])	25.9 \pm 0.8
 2	0.065 [57] (0.031 [78])	0.026 [57]	 9	1.6 \pm 0.1 (4.58 [259])	3.2 \pm 0.1
 3	1.74 [58] (7 [45])	1.35 [58]	 10	75.6 \pm 5.2 (326 ^b [259])	172.2 \pm 8.8
 4	0.172 [58] (0.41 [262])	0.172 [58]	 11	28.0 \pm 1.1 (26.2 [259])	43.6 \pm 1.5
 5	(Δ .Π.* [256])	-	 12	156.9 \pm 13.6 (310 [78])	179.9 \pm 5.5
 6	(Δ .Π.* [256])	-	 13	69.1 \pm 3.7 (158 [78])	78.0 \pm 2.8
 7	(162 [257]) (151.3 [258])	-	 14	146.2 \pm 3.0 (162.3 \pm 5.9)	134.2 \pm 3.3

* Δ .Π.: Δεν παρατηρήθηκε αναστολή σε συγκέντρωση αναστολέα 625 μM .

^b Προσδιορίστηκε από την τιμή της *IC50* με ένα διαδικτυακό εργαλείο [263].

Ο θειαζόλες εμφανίζουν ασθενέστερη αναστολή από τις αντίστοιχες ιμιδαζόλες (συγκρίνοντας τα ζεύγη **1–12**, **2–13**, **8–10** και **9–11**) αλλά και από τις 1,2,4,-τριαζόλες **3** και **4** (Πίνακας 36) [58, 80]. Μεταξύ των ιμιδαζολών, ο αναστολέας **9** (2-ναφθαλενομάδα) αναστέλλει κατά 8 φορές πιο ισχυρά τον ένζυμο συγκριτικά με την ένωση **8** (φαινυλομάδα) αλλά και οι δύο είναι πιο ασθενείς αναστολές ως προς τα αντίστοιχα ισομερή τους **2** και **1** [57] (Πίνακας 36). Η N-γλυκοπυρανόσυλο-τετραζόλη **14** είναι ο πιο ασθενής αναστολέας που μελετήθηκε στην παρούσα ενότητα. Η ικανότητα της να αναστέλλει το ένζυμο είναι σημαντικά ασθενέστερη έναντι των C-γλυκόσυλο φαινυλοϊμιδαζολών **1** και **8** αλλά και από την 1,2,4-τριαζόλη **3**. Ωστόσο, σύγκριση με άλλες N-γλυκοπυρανόσυλο-αζόλες δείχνει ότι η ένωση **14** αναστέλλει

την GP στα ίδια περίπου επίπεδα με την N-γλυκόσυλο- 1,2,3-τριαζόλη **7**, και πιο ισχυρά από την N-γλυκόσυλο-ιμιδαζόλη **6**. Εάν συγκρίνουμε την ισχύ των αζολικών αναστολέων που φέρουν έναν φαινυλικό δακτύλιο (**1, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12** και **14**, Πίνακας 36) παρατηρούμε ότι η παρουσία ενός άνθρακα ή ενός αζώτου στη θέση 5 δεν επηρεάζει σημαντικά την ισχύ των αναστολέων (**7** έναντι **14**) σε αντίθεση με την αντικατάσταση ενός άνθρακα από ένα άζωτο στη θέση 1 ή 3 που επηρεάζει σημαντικά την ισχύ του αναστολέα (**1** έναντι **3, 6, 7, 14**).

Κρυσταλλογραφικές μελέτες:

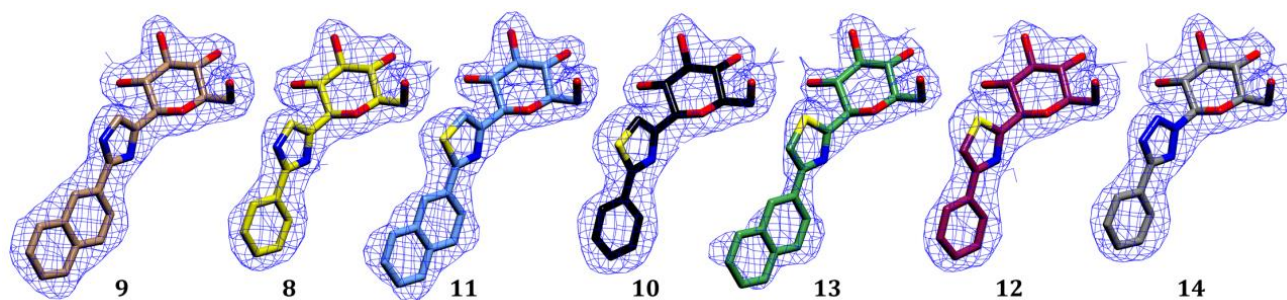
Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε σε συμβατή πηγή ακτίνων-X (*CuK α*) με το σύστημα περίθλασης *Oxford Diffraction SuperNova* όπως αναλύει στην παράγραφο 4.8.2. Τα στατιστικά που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων περίθλασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 37. Πριν τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων οι κρύσταλλοι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 10 mM BES pH 6.7, 15 % v/v DMSO και αναστολέα. Παρακάτω αναφέρονται οι συγκεντρώσεις του κάθε αναστολέα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο χρόνος επώασης του κρυστάλλου με το διάλυμα πριν τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων:

- **8**: 10 mM, 18 h
- **9**: 1 mM 21 h
- **10, 11, 14**: 10 mM, 21 h
- **12**: 7.5 mM 48 h
- **13**: 1 mM, 24 h

Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν έδειξαν ότι και οι επτά αναστολείς προσδέθηκαν στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 53). Ακολούθησε υπέρθεση των δομών των συμπλόκων των αναστολέων με τη δομή της ελεύθερης από αναστολείς GP ως προς τα καλά καθορισμένα κατάλοιπα της πρωτεΐνης (18–49, 262–312, 326–829). Η τιμή της *r.m.s.d.* που προέκυψε κυμαινόταν από 0.6–0.7 Å για όλα τα σύμπλοκα κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι η πρόσδεση των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο δεν προκαλεί κάποια μεγάλη αλλαγή στο σύνολο της δομής της πρωτεΐνης. Ωστόσο, η πρόσδεση των αναστολέων **8**, **10** και **12** οδήγησε σε μια μικρή αλλά σημαντική διαταραχή του βρόχου 280s (κατάλοιπα 282–289) η οποία είναι πιο εμφανής αν εστιάσουμε στα κατάλοιπα *Asn284* και *Phe285* των οποίων τα άτομα απομακρύνονται κατά ~ 1.0 Å από τις θέσεις που έχουν στη δομή της GP χωρίς αναστολέα (Εικόνα 54).

Πίνακας 37: Σύνοψη των παραμέτρων από την επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης και τη διαδικασία της βελτιστοποίησης για τα σύμπλοκα της *rmGPb* με τους αναστολείς. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

Σύμπλοκο <i>rmGPb</i>	8	9	10	11	12	13	14
Στατιστικοί δείκτες συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων							
Ευκρίνεια (Å)	13.44 - 2.45	13.70 - 2.35	13.74 - 2.37	13.76 - 2.30	13.52 - 2.43	13.88 - 2.37	13.75 - 2.37
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2.55 - 2.45	2.44 - 2.35	2.46 - 2.37	2.38 - 2.30	2.53 - 2.43	2.46 - 2.37	2.46 - 2.37
Ανακλάσεις	195605 (12606)	201013 (12532)	174479 (11177)	211649 (10137)	193893 (13407)	178537 (11494)	184871 (11780)
Μοναδικές ανακλάσεις	32001 (3040)	37798 (3389)	35501 (3121)	40023 (3057)	32703 (3151)	35139 (3118)	35891 (3175)
Πολλαπλότητα	6.1 (4.1)	5.3 (3.7)	4.9 (3.6)	5.3 (3.3)	5.9 (4.3)	5.1 (3.7)	5.2 (3.7)
R_{symm}	0.069 (0.344)	0.078 (0.456)	0.077 (0.501)	0.083 (0.597)	0.076 (0.419)	0.085 (0.567)	0.080 (0.567)
Πληρότητα (%)	90.2 (77.9)	93.2 (80.9)	90.5 (77.2)	92.5 (73.8)	90.0 (78.6)	90.0 (77.2)	91.1 (78.1)
$\langle I/\sigma I \rangle$	18.4 (3.6)	13.7 (2.4)	13.9 (2.3)	14.3 (2.0)	16.5 (3.1)	12.6 (2.1)	13.3 (2.0)
$CC^{1/2}$	0.997 (0.929)	0.994 (0.907)	0.996 (0.883)	0.994 (0.802)	0.997 (0.901)	0.996 (0.855)	0.995 (0.826)
Στατιστικοί δείκτες βελτιστοποίησης							
R_{cryst}	0.136 (0.187)	0.153 (0.236)	0.153 (0.241)	0.150 (0.233)	0.152 (0.221)	0.154 (0.255)	0.146 (0.237)
R_{free}	0.188 (0.215)	0.208 (0.346)	0.205 (0.279)	0.197 (0.258)	0.211 (0.287)	0.213 (0.348)	0.204 (0.286)
Αριθμός μορίων διαλύτη	225	244	171	260	225	229	235
Απόκλιση r.m.s. από τις ιδεατές τιμές							
Μήκος δεσμών (Å)	0.007	0.008	0.008	0.008	0.009	0.009	0.012
Γωνίες (°)	1.4	1.5	1.5	1.4	1.5	1.5	1.7
Μέση τιμές παράγοντα θερμικής κίνησης (Å²)							
Άτομα πρωτεΐνης	30.2	28.9	30.8	28.8	29.4	31.8	28.9
Μόρια διαλύτη	26.2	26.5	24.7	27.9	27.8	28.7	25.5
Άτομα αναστολέα	16.2	14.8	16.6	33.1	20.7	49.3	15.7
PDB entry	6S4H	6S4O	6S51	6S4R	6S4K	6S4P	6S52



Εικόνα 53: Παρουσιάζονται οι χάρτες $2F_o - F_c$ για τους αναστολείς που μελετήθηκαν σε αυτή την ενότητα. Οι χάρτες ήταν προσαρμοσμένοι σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των αναστολέων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

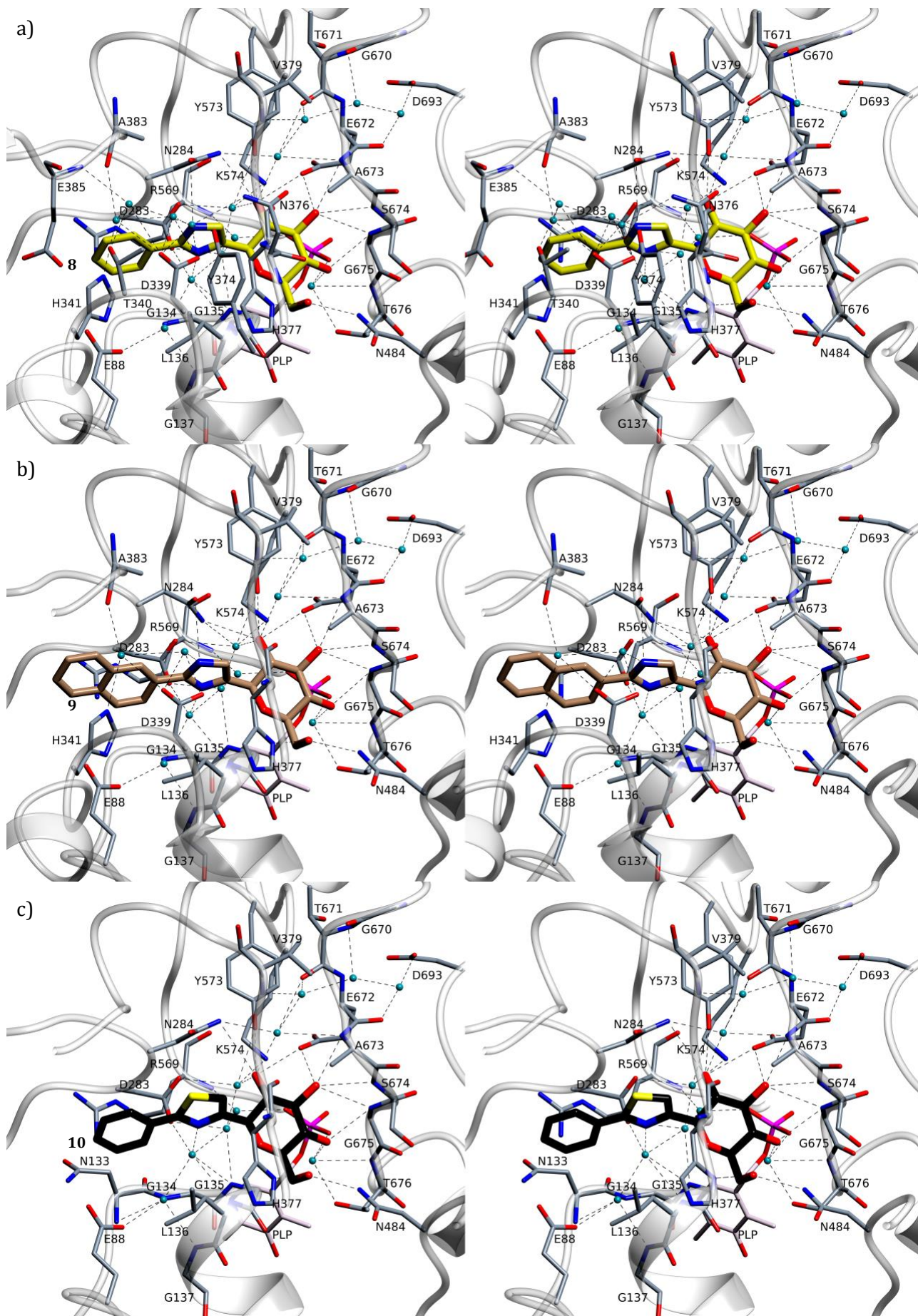
Όπως και στην προηγούμενη ενότητα, έτσι και εδώ, η πρόσδεση των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο γίνεται πρωτίστως με την σύνδεση της γλυκοκυρανόζης στο κέντρο πρόσδεσης της εντός του καταλυτικού κέντρου. Ο τρόπος σύνδεσης του δακτυλίου της γλυκοκυρανόζης γίνεται με παρόμοιο τρόπο όπως έχει παρατηρηθεί και στην προηγούμενη ενότητα αλλά και σε προηγούμενες εργασίες [29, 77, 82, 162]. Σε όλους τους αναστολείς που

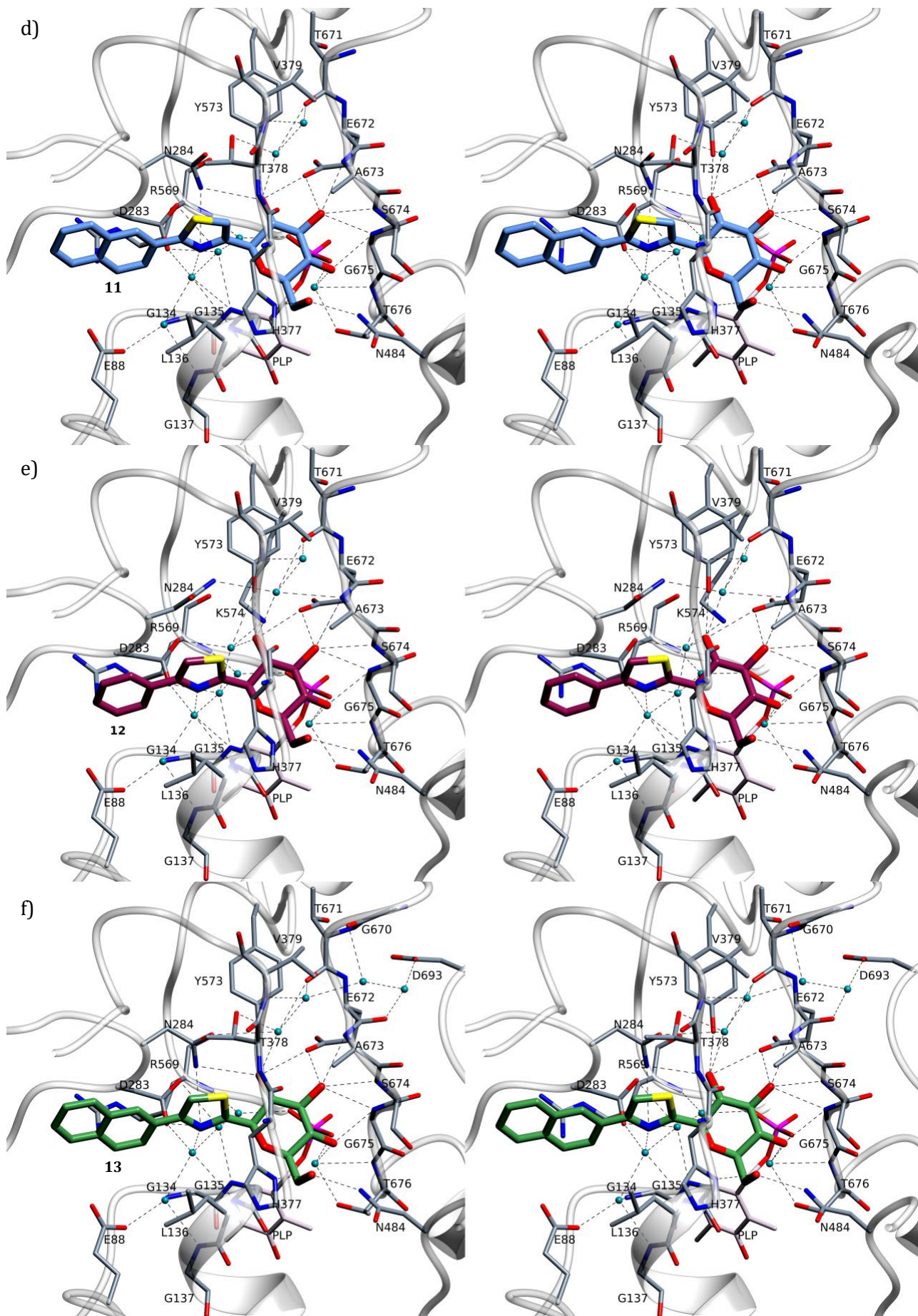
μελετήθηκαν στην παρούσα ενότητα, ο δακτύλιος της γλυκοκυρανόζης σχηματίζει ένα αρκετά όμοιο δίκτυο δεσμών υδρογόνων με κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου (Πίνακας 38). Η μόνη διαφορά υπάρχει στο σύμπλοκο με το **12** όπου το άτομο *O2'* της γλυκοκυρανόζης βρίσκεται σε αρκετά μεγάλη απόσταση (3.6 Å) από το άτομο *ND2* της πλευρικής αλυσίδας της *Asn284* με αποτέλεσμα να μη μπορεί να σχηματιστεί δεσμός υδρογόνου (Εικόνα 54). Αυτή η διαφορά φαίνεται να οφείλεται σε μια μετατόπιση κατά 0.4 Å του ατόμου *ND2* της *Asn284* συγκριτικά με τη θέση που καταλαμβάνει αυτό στα υπόλοιπα σύμπλοκα. Σε όλα τα σύμπλοκα των αναστολέων τρία συντηρημένα μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ της γλυκοκυρανόζης κάθε αναστολέα και των καταλοίπων της πρωτεΐνης *Asp283*, *Asn284*, *Tyr573*, *Lys574*, *Thr671*, *Ala673*, *Thr676* και της φωσφορικής ομάδας 5' της *PLP* (Εικόνα 54).

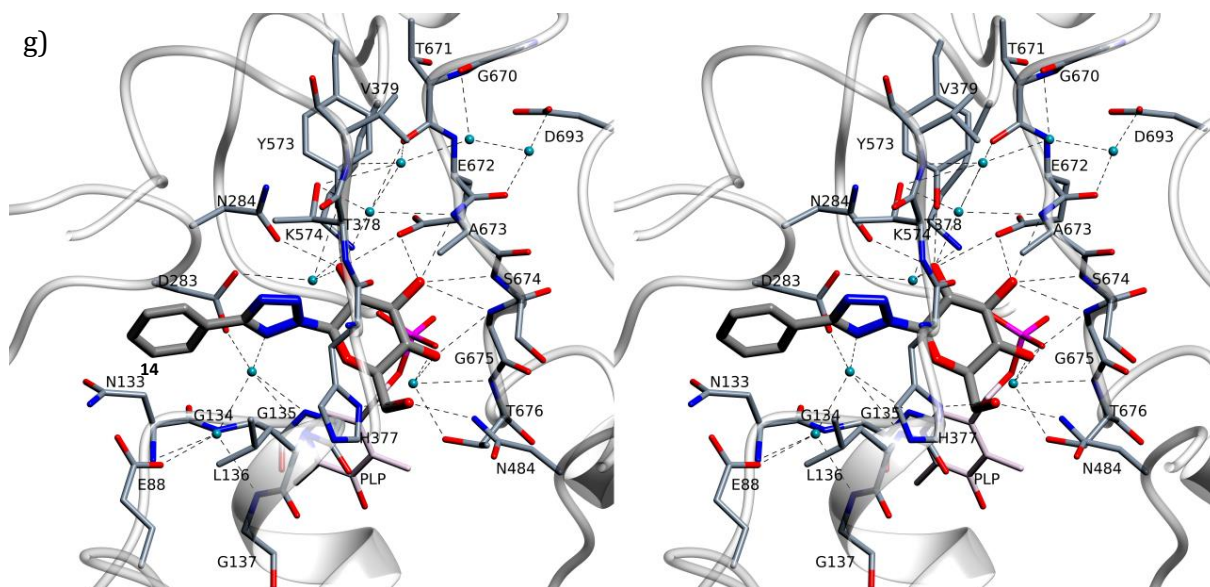
Πίνακας 38: Πιθανοί θειικοί δεσμοί οπής-σ και δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των αναστολέων και των καταλοίπων της πρωτεΐνης του καταλυτικού κέντρου. Οι αριθμοί αναφέρονται σε αποστάσεις σε Å.

Άτομα αναστολέα	Κατάλοιπα πρωτεΐνης	8	9	10	11	12	13	14	
Άτομα γλυκοκυρανόζης	<i>O2'</i>	<i>Asn284 (ND2)</i>	3.1	3.0	3.3	3.1	-	3.3	2.7
		<i>Tyr573 (OH)</i>	3.1	3.1	3.1	3.0	3.2	3.0	3.1
		<i>Glu672 (OE1)</i>	3.2	3.2	3.3	3.1	3.3	3.3	3.3
	<i>O3'</i>	<i>Glu672 (OE1)</i>	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
		<i>Ala673 (N)</i>	3.3	3.3	3.2	3.2	3.3	3.2	3.2
		<i>Ser674 (N)</i>	3.2	3.1	3.2	3.0	3.2	3.0	3.1
		<i>Gly675 (N)</i>	3.2	3.1	3.2	3.0	3.2	3.1	3.2
	<i>O4'</i>	<i>Gly675 (N)</i>	2.9	2.8	2.9	2.8	2.9	2.8	2.8
	<i>O6'</i>	<i>His377 (ND1)</i>	2.8	2.8	2.8	2.6	2.7	2.6	2.8
		<i>Asn484 (ND2)</i>	2.7	2.6	2.6	2.6	2.7	2.6	2.6
Άτομα συνδέτη	<i>N3</i>	<i>Asn284 (OD1)</i>	3.3	3.2	-	-	-	-	-
	<i>N5</i>	<i>Asn284 (ND2)</i>	-	-	-	3.2	-	3.3	-
	<i>S2</i>	<i>His377 (O)</i>	-	-	-	-	3.2	3.2	-
		<i>Asn284 (OD1)</i>	-	-	-	-	3.4	3.4	-
	<i>S3</i>	<i>Asn284 (OD1)</i>	-	-	3.3	3.6	-	-	-
Συνολικός αριθμός αλληλεπιδράσεων		11	11	11	12	11	13	10	

Στα σύμπλοκα *rmGPb-8* και *rmGPb-9* το άτομο *N3* του συνδέτη (Πίνακας 36, Εικόνα 54) εμπλέκεται σε δεσμό υδρογόνου με το άτομο *OD1* της πλευρικής αλυσίδας της *Asn284* ενώ στα σύμπλοκα *rmGPb-11* και *rmGPb-13* το άτομο *N5* σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το άτομο *ND2* της πλευρικής αλυσίδας της *Asn284* (Πίνακας 38, Εικόνα 54). Στα υπόλοιπα σύμπλοκα, τα άτομα του συνδέτη δεν εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου (Εικόνα 54). Ωστόσο, το θείο, όπως και τα αλογόνα, διαθέτει ιδιότητες οπής-σ κάτι το οποίο οδηγεί σε δεσμούς οπής-σ, οι οποίοι είναι παρόμοιοι με τους δεσμούς αλογόνου [264].







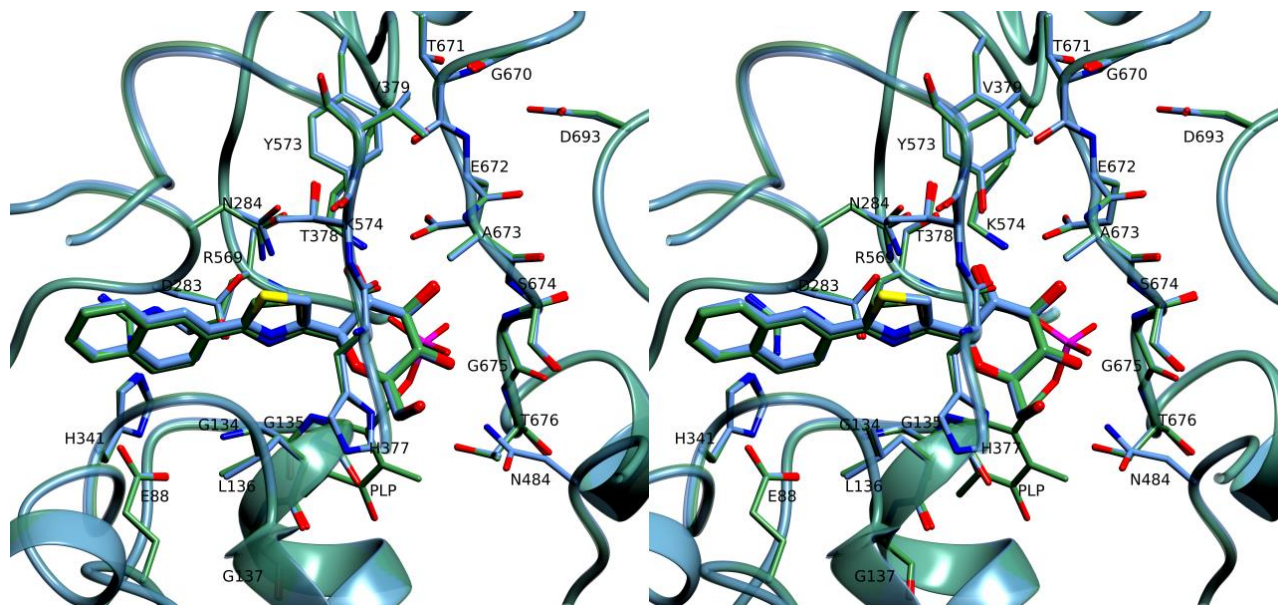
Εικόνα 54: Στέρεο-απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούν οι αναστολείς κατά την πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο. Παρουσιάζονται τα σύμπλοκα των αναστολέων α) **8**, β) **9**, γ) **10**, δ) **11**, ε) **12**, ς) **13** και ζ) **14**. Τα άτομα των αναστολέων παρουσιάζονται με τη μορφή χοντρών κυλίνδρων, τα μόρια ύδατος ως κυανές σφαίρες και οι δεσμοί υδρογόνου ως διακεκομμένες γραμμές.

Συγκρίνοντας τα σύμπλοκα μεταξύ τους, παρατηρούμε ότι το άτομο του θείου των αναστολέων **10** και **11** αλληλεπιδρά με το άτομο *OD1* της πλευρικής αλυσίδας της *Asn284* ενώ στους αναστολείς **12** και **13** αλληλεπιδρά με το οξυγόνο του καρβονυλίου της κύριας αλυσίδας της *His377* και με το άτομο *OD1* της πλευρικής αλυσίδας της *Asn284* (Πίνακας 38). Εκτός από αυτές τις αλληλεπιδράσεις, τα άτομα του συνδέτη των **8**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13** και **14** συμμετέχουν σε 11, 17, 15, 19, 17, 15 και 13 αλληλεπιδράσεις *van der Waals* αντίστοιχα, με τα κατάλοιπα *Leu136*, *Asn284*, *His377* και *Thr378*. Οι φαινυλικοί δακτύλιοι των **8**, **10**, **12** και **14** προσδένονται στο ένζυμο με παρόμοιο τρόπο (Εικόνα 54) και συμμετέχουν σε 17, 15, 18 και 15 αλληλεπιδράσεις *van der Waals* αντίστοιχα, με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης *Glu88*, *Asn282*, *Asn284*, *Phe285* και *His341*. Επιπρόσθετα σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις, οι ναφθαλενικοί δακτύλιοι των **9**, **11** και **13** σχηματίζουν 10, 12 και 14 αλληλεπιδράσεις *van der Waals*, αντίστοιχα, με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης *Glu88*, *Asn282*, *Phe285*, *Arg292*, *His341*, και *Ala383*. Σε μια πρόσφατη δημοσίευση όπου μελετήθηκαν αναστολείς του τύπου *C-β-D*-γλυκοπυρανόσυλο-αζόλες, ως αναστολείς της *GP*, βρέθηκε ότι αυτοί οι αναστολείς μειώνουν την γλυκογονόλυση σε ηπατοκύτταρα [259]. Επιπλέον, υπολογιστικές μελέτες μοριακής δυναμικής πρότειναν ότι σχηματίζεται μια γέφυρα άλατος μεταξύ του δακτυλίου του ιμιδαζολίου και της πλευρικής αλυσίδας της *Asp283*, κάτι το οποίο θα μπορούσε να συμβάλει στην πρόσδεση του αναστολέα. Στα σύμπλοκα με τους αναστολείς **8** και **9** η απόσταση του ατόμου *N5* των αναστολέων από το άτομο *OD1* της πλευρικής αλυσίδας της *Asp283* ισούται με 4.5 Å. Αυτή η απόσταση είναι μεγαλύτερη κατά 0.5 Å από αυτή που επιτρέπει το σχηματισμό

γέφυρας άλατος μεταξύ *N-O* [265]. Ωστόσο, αυτή η απόσταση επαρκεί για την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων *Coulomb* μεγάλης εμβέλειας οι οποίες έχει δειχθεί να παίζουν σημαντικό ρόλο σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ αναστολέων και πρωτεϊνών [266-268]. Επομένως, οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων **8** και **9** βρίσκονται σε συμφωνία με τις υπολογιστικές μελέτες μοριακής δυναμικής [259].

Συγκριτική ανάλυση των δομών των συμπλόκων των θειαζολών (**10**, **11**, **12** και **13**) αποκαλύπτει τη δομική βάση για τις σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταθερών αναστολής (Πίνακας 36). Ο **10** σχηματίζει δέκα δεσμούς υδρογόνου και ένα δεσμό θείου οπής-σ ενώ ο **12** σχηματίζει εννέα δεσμούς υδρογόνου και δύο δεσμούς θείου οπής-σ (Πίνακας 38). Επιπλέον, οι δύο αναστολές συμμετέχουν σε παρόμοιο αριθμό αλληλεπιδράσεων *van der Waals* εμφανίζοντας σχεδόν την ίδια ανασταλτική ισχύ. Οι **11** και **13** σχηματίζουν επιπλέον έναν και δύο δεσμούς υδρογόνου ή/και δεσμούς θείου οπής-σ, αντίστοιχα (Πίνακας 38), αλλά και περισσότερες αλληλεπιδράσεις *van der Waals* λόγω της ομάδας του 2-ναφθαλενίου, συγκριτικά με την ομάδα φαινυλίου, με αποτέλεσμα αυτές οι ενώσεις να είναι πιο ισχυροί αναστολές από τους **10** και **12**. Το μήκος των δεσμών θείου οπής-σ είναι αρκετά όμοιο (Πίνακας 38) κάτι το οποίο αντανακλάται και στην ομοιότητα στην ισχύ των αναστολέων **10** ($K_i = 172.2 \mu M$) και **12** ($K_i = 179.9 \mu M$) αλλά και των **11** ($K_i = 43.6 \mu M$) και **13** ($K_i = 78.0 \mu M$). Οι διαφορές στην ισχύ της αναστολής μεταξύ των **11** και **13** μπορεί να οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις π-επιστοιίβαξης μεταξύ της ομάδα του 2-ναφθαλενίου και του ιμιδαζολικού δακτυλίου της *His341* (Εικόνα 55). Στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο του **13** (Εικόνα 55) ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της *His341* σχηματίζει μια κάθετη αλληλεπίδραση π-επιστοιίβαξης με τον εξωτερικό δακτύλιο του ναφθανελίου (η απόσταση μεταξύ του κέντρου του ιμιδαζολικού και του αρωματικού δακτυλίου είναι 3.8 \AA) ενώ στο σύμπλοκο του **11** (Εικόνα 55) ο δακτύλιος του ιμιδαζολίου της *His341* σχηματίζει δύο κάθετες αλληλεπιδράσεις π-επιστοιίβαξης, μια με κάθε αρωματικό δακτύλιο της ομάδας του ναφθανελίου (η απόσταση μεταξύ του κέντρου του ιμιδαζολικού και του αρωματικού δακτυλίου είναι 4.0 και 4.4 \AA). Αυτή η π-κατιοντική αλληλεπίδραση έχει παρατηρηθεί και στην προηγούμενη ενότητα αλλά και σε άλλη εργασία με ναφθάλενο-υποκατεστημένους αναστολές [56] και έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την ισχύ των αναστολέων. Οι δύο αναστολές οι οποίοι διαθέτουν ιμιδαζολικό δακτύλιο, **8** και **9**, εμπλέκονται σε παρόμοιο δίκτυο δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων *van der Waals* με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου (Πίνακας 38). Η ομάδα ναφθανελίου του **9** σχηματίζει

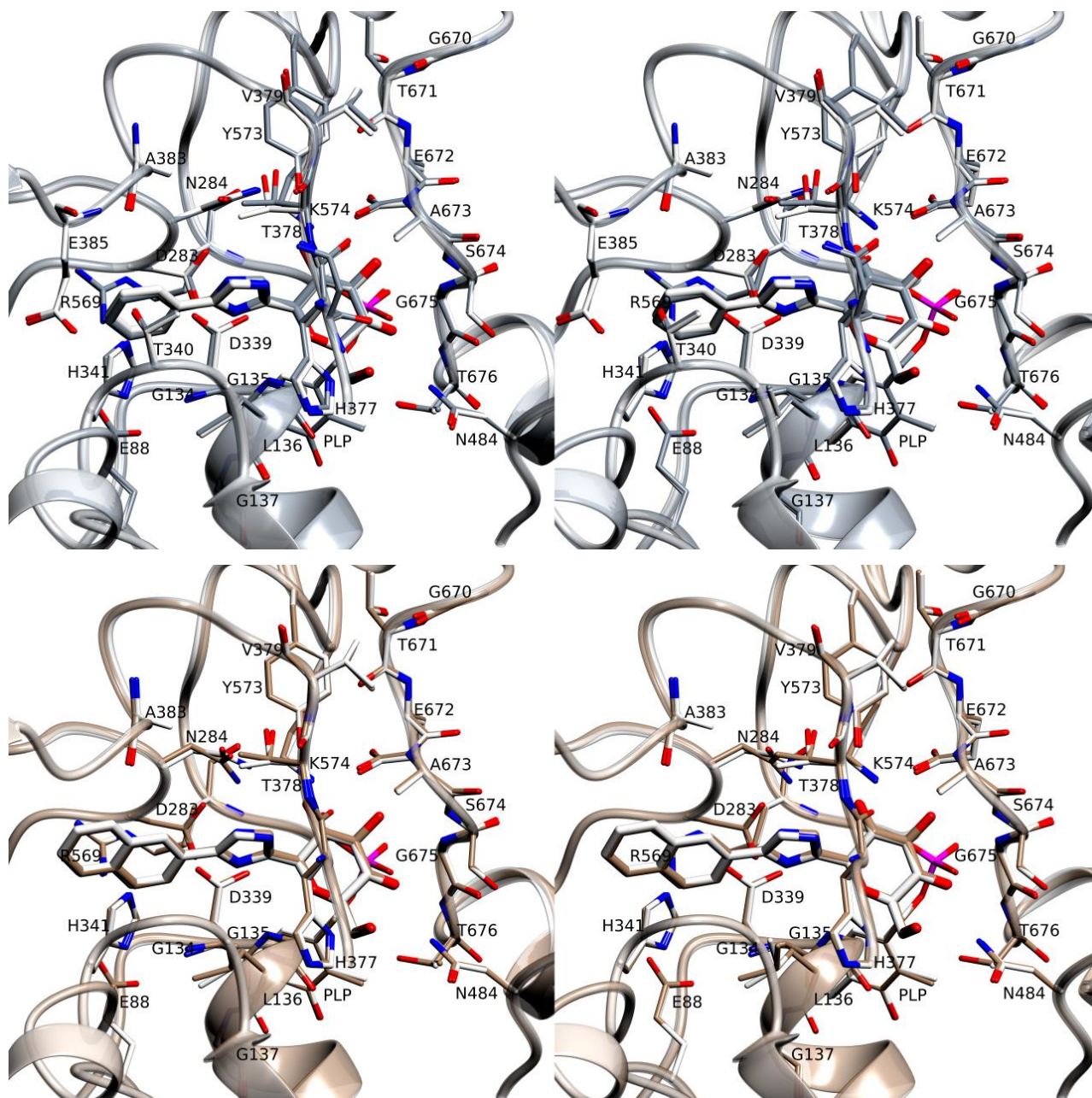
επιπλέον δέκα αλληλεπιδράσεις *van der Waals* συγκριτικά με την φαινυλομάδα του **8** και δύο αντί για μία κάθετες αλληλεπιδράσεις π-επιστοιβάξης με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο της *His341*.



Εικόνα 55: Στέρεο-απεικόνιση της υπέρθεσης των συμπλόκων **13** (πράσινο) και **11** (γαλάζιο).

Αυτές οι αλληλεπιδράσεις φαίνεται να αποτελούν την αιτία για την οποία η ένωση **9** είναι ισχυρότερος αναστολέας από την **8**. Σύγκριση της δομής των συμπλόκων **8** και **9** με τα αντίστοιχα σύμπλοκα των ισομερών τους **1** και **2** [57], μας δείχνει ότι τα ισομερή προσδένονται με παρόμοιο τρόπο (Εικόνα 56) και το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που διαμεσολαβείτε από τα μόρια ύδατος να είναι επίσης συντηρημένο. Ωστόσο, ο δεσμός υδρογόνου που σχηματίζεται στα σύμπλοκα των **1** και **2** [57] μεταξύ του ατόμου του αζώτου του συνδέτη και του οξυγόνου της καρβονυλομάδας της κύριας αλυσίδας της *His377* έχει αντικατασταθεί με ένα δεσμό υδρογόνου με το άτομο *OD1* της πλευρικής αλυσίδας της *Asn284* στα σύμπλοκα των **8** και **9** (Πίνακας 38). Εκτός από τα σύμπλοκα των **1** και **2**, αυτή η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση με την *His377* έχει παρατηρηθεί και για άλλες ενώσεις [58, 74, 247, 250, 269-272] όπου η αναστολή που εμφάνιζαν αυτές οι ενώσεις είχε αποδοθεί σε αυτήν την αλληλεπίδραση καθώς, ενώσεις οι οποίες δεν έχουν ένα δότη υδρογόνου στη θέση 2 (κρυσταλλογραφική αρίθμηση των ατόμων) του συνδέτη εμφανίζουν χαμηλότερη αναστολή [57]. Η απόσταση του υδρογόνου του ατόμου *N3* του αναστολέα από το άτομο *OD1* του καταλοίπου *Asn284* είναι 3.2 Å στα σύμπλοκα των **8** και **9**. Αυτή η απόσταση είναι μεγαλύτερη από την απόσταση μεταξύ του υδρογόνου του ατόμου *N2* του αναστολέα και του οξυγόνου του καρβονυλίου της *His377*, η οποία ισούται με 1.8 Å στα σύμπλοκα των **1** και **2** [57]. Επιπλέον, η γωνία του δεσμού *N3-H-OD1* είναι ~ 90° στα σύμπλοκα των **8** και **9** ενώ η γωνία

του δεσμού N2-H-O είναι $\sim 170^\circ$ στα σύμπλοκα των **1** και **2** [57]. Η πιο κοντινή απόσταση και ο σχεδόν ευθύγραμμος δεσμός υδρογόνου με το οξυγόνο του καρβονυλίου της *His377* στα σύμπλοκα των **1** και **2** υποδεικνύει ότι αυτός ο δεσμός υδρογόνου είναι ισχυρότερος από τον δεσμό υδρογόνου μεταξύ του ατόμου *N3* και του ατόμου *OD1* της *Asn284* που παρατηρείται στα σύμπλοκα των **8** και **9** [273, 274].

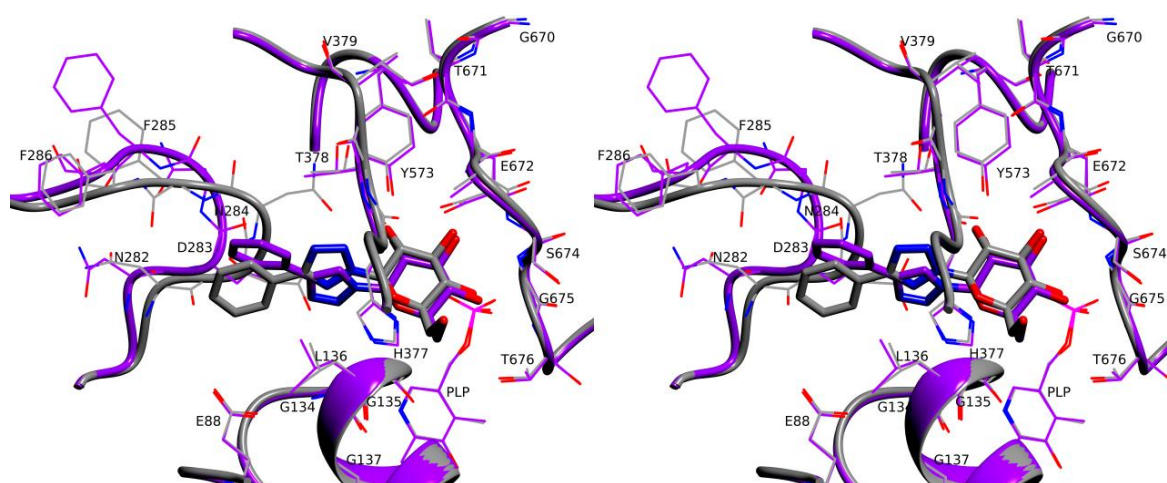


Εικόνα 56: Στέρεο-απεικόνιση της υπέρθεσης των συμπλόκων του **1** [57] με του **8** (πάνω) και των συμπλόκων του **2** [57] με του **9** (κάτω).

Επιπλέον, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ ενός προσδέτη και της πρωτεΐνης είναι ισχυρότεροι όταν σχηματίζονται με άτομα της κύριας αλυσίδας (όπως το οξυγόνο του καρβονυλίου της κύριας αλυσίδας της *His377*) από ότι με άτομα πλευρικών αλυσίδων (όπως το άτομο *OD1* της

πλευρικής αλυσίδας της *Asn284*) των αμινοξέων [274]. Τα παραπάνω μπορούν να προσφέρουν μια δομική εξήγηση για την ισχύ των αναστολέων **1** και **2** ως προς αυτή των αντίστοιχων ισομερών **8** και **9**.

Ο αναστολέας **14** παρουσιάζει χαμηλή αναστολή ($K_i = 134.2 \mu M$) καθώς κανένα από τα άτομα των αζώτων που φέρει στον τετραζολικό δακτύλιο δεν είναι ικανό να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου ούτε με την πλευρική αλυσίδα της *Asn284* (άτομο *OD1*) ούτε με την κύρια αλυσίδα της *His377* (καρβονυλικό οξυγόνο). Σύγκριση της δομής του συμπλόκου της *rmGPb* με τον **7** [258] και αυτού με τον **14** αποκαλύπτει ότι οι δύο αναστολείς προσδέονται με αρκετά διαφορετικό τρόπο στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 57). Στο σύμπλοκο *rmGPb-7* ένα μόριο *DMSO* (από το κρυοπροστατευτικό μέσο) βρέθηκε προσδεμένο στο καταλυτικό κέντρο μαζί με τον αναστολέα. Η πρόσδεση του *DMSO* οδήγησε σε μια σημαντική μεταβολή της διαμόρφωσης του βρόχου 280s που φαίνεται ότι μάλλον παρεμβαίνει στον τρόπο πρόσδεσης της ένωσης. Ο φαινυλικός δακτύλιος του **7** περιστρέφεται κατά $\sim 160^\circ$ συγκριτικά με τη θέση που καταλαμβάνει ο αντίστοιχος δακτύλιος στο σύμπλοκο *rmGPb-14* με αποτέλεσμα τα κατάλοιπα του βρόχου 280s να μετακινούνται κατά 1-4 Å. Όμως, οι **7** και **14** είναι σχεδόν ισοδύναμοι αναστολείς αν συγκρίνουμε τις σταθερές αναστολής τους (Πίνακας 36). Επομένως, φαίνεται πως η διαφορά στον τρόπο πρόσδεσης μεταξύ των αναστολέων **7** και **14** μπορεί να οφείλεται στη σύνδεση του *DMSO* που προέρχεται από τον τρόπο συλλογής των κρυσταλλογραφικών δεδομένων του συμπλόκου του **7** (συλλογή σε θερμοκρασία 100 K με χρήση κρυοπροστατευτικού διαλύματος) καθώς αυτές οι δομικές διαφορές δεν συνάδουν με την σχεδόν όμοια ισχύ της αναστολής τους.



Εικόνα 57: Στέρεο-απεικόνιση της υπέρθεση του συμπλόκου *rmGPb-7* (μωβ) [258] στο σύμπλοκο *rmGPb-14* (γκρι).

Από όλες τις παραπάνω ενώσεις, ο πιο ισχυρός αναστολέας (**9**) έχει υποβληθεί και σε *ex vivo* μελέτες ώστε να προσδιοριστεί αν μπορεί να αναστείλει την *GP* σε ηπατοκύτταρα *HepG2* στα

οποία η γλυκογονόλυση είχε διεγερθεί από γλυκαγόνη [275]. Η ένωση **9** σε συγκέντρωση 100 μM προκάλεσε 60 % αναστολή της *GP* χωρίς να παρατηρηθεί κυτταροτοξικότητα [275]. Επίσης, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ένωση **9** μπορεί να προκαλέσει αναστολή της γλυκογονόλυσης σε ηπατοκύτταρα ποντικών στα οποία η γλυκογονόλυση είχε διεγερθεί από γλυκαγόνη [259].

Συμπεράσματα

- Οι γλυκοπυρανόσυλο-θειαζόλες είναι ασθενέστεροι αναστολείς από τις αντίστοιχες γλυκοπυρανόσυλο-ιμιδαζόλες.
- Οι γλυκοπυρανόσυλο-ιμιδαζόλες και συγκεκριμένα η ένωση με την ομάδα 2-ναφθαλενίου (**9**) είναι ένας ισχυρός αναστολέας της *GP*.
- Η ανάλυση των δομών των συμπλόκων ανέδειξε τη σημασία του δεσμού υδρογόνου μεταξύ του δακτυλίου του ιμιδαζολίου και του οξυγόνου του καρβονυλίου της κύριας αλυσίδας της *His377*. Όταν αυτός ο δεσμός υδρογόνου αντικαθίσταται από δεσμό θείου οπής-σ ή με δεσμό υδρογόνου με την πλευρική αλυσίδα της *Asn284* (άτομο *OD1*), τότε εμφανίζεται μειωμένη αναστολή ως προς το ένζυμο λόγω γεωμετρικών περιορισμών των δεσμών υδρογόνου.
- Παρότι η 2-γλυκόσυλο-τετραζόλη **14** φαίνεται να προσδένεται στο ένζυμο με διαφορετικό τρόπο από την 1,2,3-τριαζόλη **7**, οι δύο αναστολείς είναι ισοδύναμοι σε ότι αφορά την ικανότητα τους να αναστέλλουν το ένζυμο.

5.3.3. β -γλυκοσάμινιλ-τριαζόλες ως αναστολείς της *hIGPa*

Στις προηγούμενες ενότητες αναφερθήκαμε σε ενώσεις οι οποίες διέθεταν μια ομάδα γλυκοπυρανόζης με διαφορετικούς ετεροκυκλικούς δακτυλίους ως υποκαταστάτες (γλυκοπυρανόσυλο -ιμιδαζόλες, -θειαζόλες, -τετραζόλες, γλυκοπυρανοσυλιδενο-σπείρο-ιμιδαζολινόνες). Σε αυτή την ενότητα μελετήσαμε ενώσεις οι οποίες είχαν τροποποιημένο το δακτύλιο της γλυκοπυρανόζης ώστε να αποκτήσουμε επιπλέον πληροφορίες για τα πως η ποικιλομορφία του δακτυλίου μπορεί να επηρεάζει την αναστολή τους. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η απομάκρυνση της $-\text{CH}_2\text{OH}$ ομάδας της γλυκοπυρανόζης, δηλαδή η μετατροπή της γλυκόζης σε ξυλόζη, οδήγησε σε μειωμένη αναστολή ή σε ολική απώλεια της αναστολής [276-278]. Επιπλέον, η αντικατάσταση της υδροξυλομάδας της θέσης 3'³ της γλυκόζης από φθόριο [279] ή από $-\text{CH}_2\text{OH}$ [280] οδήγησε και πάλι σε μεγάλη μείωση της ισχύος των

³ Για την αρίθμηση των ατόμων του μορίου της γλυκοπυρανόζης βλ. Πίνακας 39

αναστολέων ως προς την GP. Τέλος, η δημιουργία διπλού δεσμού μεταξύ των ατόμων 1' και 2' της γλυκόζης οδήγησε και πάλι σε μη δραστικές ενώσεις [281].

Σε αυτή την ενότητα μελετήσαμε με κινητικές και δομικές μελέτες την αναστολή που επιφέρουν στην GP ενώσεις με τροποποιημένο δακτύλιο της γλυκοπυρανόζης στους οποίους η ομάδα -OH στη θέση 2' (Πίνακας 39) είχε αντικατασταθεί από μια ομάδα -NH₂ (γλυκοζαμίνες). Οι ενώσεις αυτές μελετήθηκαν επίσης συγκριτικά με τις αντίστοιχες ενώσεις με -OH ομάδα αλλά και με άλλες γλυκοζαμίνες (Πίνακας 39). Οι δύο ενώσεις οι οποίες μελετήθηκαν αποτελούνταν από 2-άμινο-2-δεόξυ-β-D-γλυκοπυρανόζη η οποία συνδεόταν με ένα φαινυλικό ή 2-ναφθαλενικό δακτύλιο μέσω ενός 1,2,4-τριαζολικού δακτυλίου. Η μελέτη των αντίστοιχων ενώσεων με ομάδα -OH στη θέση 2' της γλυκοπυρανόζης (δηλαδή φυσιολογικός δακτύλιος της γλυκόζης) είχε γίνει πρόσφατα και τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών είχαν δείξει ότι η ένωση με την 2-ναφθαλενομάδα μπορούσε να αναστείλει την hIGPa με σταθερά αναστολής ίση με 172 nM [58] (Πίνακας 39). Η σύνθεση των ενώσεων αυτών έγινε από το εργαστήριο του καθηγητή László Somsák από το Πανεπιστήμιο του Debrecen της Ουγγαρίας.

Κινητικές μελέτες

Η ένωση **29a** εμφάνισε τιμή K_i ίση με 30.2 και 30.8 μM ως προς την rmGPa και hIGPa αντίστοιχα, ενώ η ένωση **29b** εμφάνισε τιμή K_i ίση με 5.3 και 7.6 μM για τα ίδια ένζυμα.

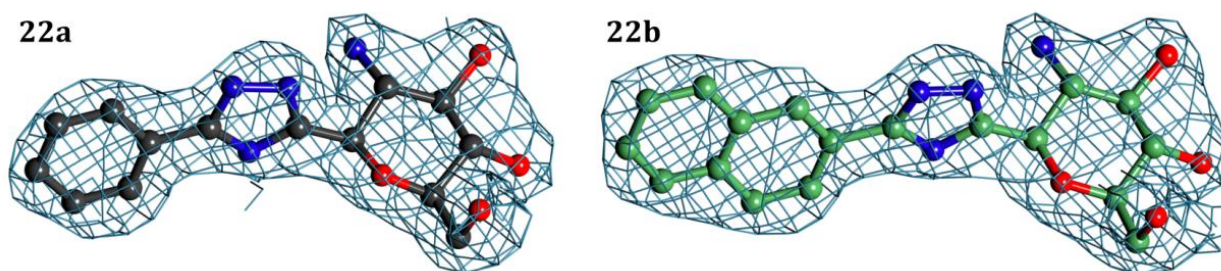
Πίνακας 39: Οι τιμές των σταθερών αναστολής που υπολογίστηκαν για τις υπό μελέτη γλυκοζαμίνες. Οι γλυκοζαμίνες οι οποίες μελετήθηκαν στην παρούσα ενότητα επισημαίνονται με σκίαση και οι υπόλοιπες ενώσεις παρουσιάζονται για λόγους σύγκρισης. Επιπλέον, στην κορυφή του πίνακα παρουσιάζεται η δομή της ένωσης **29b** και η αρίθμηση που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X.

Χημική δομή	R							
	rmGPb	rmGPa	hIGPa	rmGPb	rmGPa	hIGPa		
	3	7 [262, 282]	1.74 [58]	1.35 [58]	29a	35.2 [79]	30.2 ± 2.2	30.8 ± 1.2
	4	0.41 [262, 282]	0.172 [58]	0.172 [58]	29b	4.8 [79]	5.3 ± 0.4	7.6 ± 0.1
	5	0.28 [78]	0.226 [57]	0.156 [57]	33a	2.67 [79]	3.11 [79]	2.73 [79]
	6	0.031 [78]	0.065 [57]	0.026 [57]	33b	0.191 [79]	0.125 [79]	0.143 [79]

Οι ενώσεις **29a** και **29b** αναστέλλουν το ένζυμο συναγωνιστικά ως προς το υπόστρωμα (*G1P*) και η ένωση **29b** αποτελεί τον τρίτο πιο ισχυρό αναστολέα ως προς την *GP* με τροποποιημένο δακτύλιο γλυκοπυρανόζης. Σύγκριση με ανάλογες ενώσεις που περιέχουν γλυκοπυρανόζη (Πίνακας 39, $R=OH$), δείχνει ότι η αντικατάσταση της 2'-*OH* από $-NH_2$ οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα κατά ~ 5-40 φορές. Επιπλέον, όπως έχει παρατηρηθεί για τις ενώσεις με ομάδα 2'-*OH* [57, 58], αυτές που είχαν ως συνδέτη μια ομάδα ιμιδαζολίου (**5**, **6**, **33**) ήταν πιο ισχυρές από τις αντίστοιχες ενώσεις με 1,2,4-τριαζολικό δακτύλιο (**3**, **4**, **29**).

Δομικές μελέτες

Ο προσδιορισμός του τρόπου πρόσδεσης των υπό μελέτη ενώσεων στη *GP* έγινε με χρήση κρυστάλλων της *rmGPb*, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως (Βλ. παράγραφο 4.8.2). Πιο συγκεκριμένα οι κρύσταλλοι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 10 mM *BES* pH 6.7, 10 % v/v *DMSO* και αναστολέα. Ο αναστολέας προστέθηκε σε συγκέντρωση 10 mM και η επώαση του κρυστάλλου με τον αναστολέα έγινε για 4 h πριν τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων.



Εικόνα 58: Παρουσιάζονται οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ για τις δύο ενώσεις που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο. Οι χάρτες ήταν προσαρμοσμένοι σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των αναστολέων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

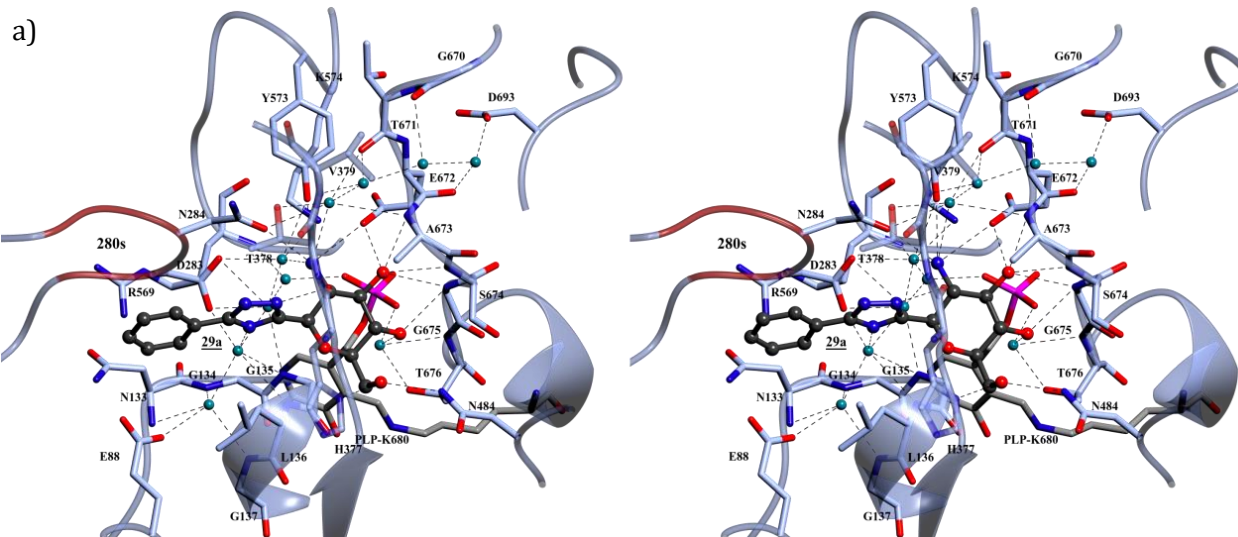
Η ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων (Πίνακας 40) και οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν (Εικόνα 58) έδειξαν ότι οι δύο ενώσεις προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου με τα άτομα των αναστολέων να εντοπίζονται καλά στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η τιμή της *r.m.s.d.* που προέκυψε μετά από υπέρθεση των συμπλόκων των αναστολέων ως προς την δομή της ελεύθερης από αναστολείς *rmGPb* για τα καλά καθορισμένα κατάλοιπα (18 - 49, 262 - 312 και 326 - 829) ήταν 0.16, 0.17 Å για τα σύμπλοκα των αναστολέων **29a** και **29b** αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές της *r.m.s.d.* υποδεικνύουν ότι δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στη συνολική διαμόρφωση της πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση των αναστολέων. Η πρόσδεση των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο συμβαίνει αρχικά με την σύνδεση της γλυκοπυρανόζης στο κέντρο πρόσδεσης της γλυκόζης το οποίο αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου. Η πρόσδεση της επικράτειας της γλυκοπυρανόζης

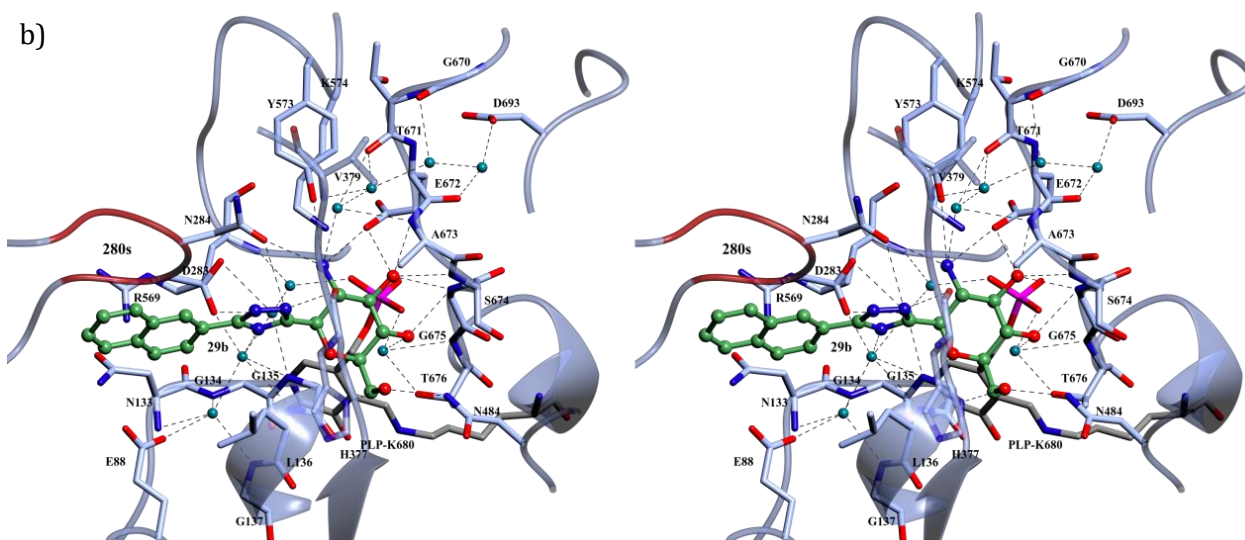
κάθε αναστολέα γίνεται με ένα τυπικό πρότυπο δεσμών υδρογόνων (Πίνακας 41) και αλληλεπιδράσεων *van der Waals* το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες αλλά και στις προηγούμενες ενότητες.

Πίνακας 40: Σύνοψη των στατιστικών παραμέτρων από την επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης και τη διαδικασία της βελτιστοποίησης για τα σύμπλοκα της *rmGPb* με τους αναστολείς. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

Σύμπλοκο <i>rmGPb</i>	29a	29b
Στατιστικοί δείκτες συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων		
Ευκρίνεια (Å)	13.91 - 2.45	13.56 - 2.45
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2.55 - 2.45	2.56 - 2.45
Ανακλάσεις	338576	175278
Μοναδικές ανακλάσεις	33526 (3345)	35487 (4119)
Πολλαπλότητα	10.1 (7.3)	4.9 (3.4)
R_{sym}	0.130 (0.775)	0.122 (0.793)
Πληρότητα (%)	94.2 (84.9)	98.1 (94.8)
$\langle I/\sigma I \rangle$	17.5 (2.9)	11.1 (1.3)
Στατιστικοί δείκτες βελτιστοποίησης		
R_{cyst}	0.144 (0.205)	0.164 (0.269)
R_{free}	0.187 (0.221)	0.229 (0.285)
Αριθμός μορίων διαλύτη	238	199
Απόκλιση r.m.s. από τις ιδεατές τιμές		
Μήκος δεσμών (Å)	0.009	0.022
Γωνίες (°)	1.3	2.2
Μέση τιμή παράγοντα θερμικής κίνησης (Å²)		
Άτομα πρωτεΐνης	18.3	19.2
Μόρια διαλύτη	25.0	25.6
Άτομα αναστολέα	17.0	17.8
PDB entry	5054	5056

Η ομάδα 2'-NH₂ σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου με τις πλευρικές αλυσίδες των *Asn284*, *Tyr573*, *Glu672* ενώ παράλληλα, μόρια ύδατος γεφυρώνουν αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου με τις πλευρικές αλυσίδες των ατόμων *Asp283*, *Thr378*, *Lys574* και το άτομο του οξυγόνου του καρβονυλίου της κύριας αλυσίδας της *Thr671* (Πίνακας 41, Εικόνα 59).





Εικόνα 59: Στέρεο-απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης των αναστολέων α) **29a** και β) **29b** στο καταλυτικό κέντρο της GP. Τα μόρια ύδατος παρουσιάζονται ως κυανές σφαίρες και οι δεσμοί υδρογόνου με διακεκομμένες γραμμές.

Ο τριαζολικός δακτύλιος συμμετέχει σε μια σημαντική αλληλεπίδραση δεσμού υδρογόνου με το οξυγόνο της καρβονυλομάδας της κύριας αλυσίδας της *His377*. Η σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης αναλύθηκε εκτενώς στην προηγούμενη ενότητα (βλ. παράγραφο 5.3.2) και φαίνεται πως η αναστολή που εμφανίζουν αυτού του τύπου οι αναστολείς, οφείλεται πρωτίστως σε αυτή την αλληλεπίδραση. Οι αρωματικοί υποκαταστάτες των τριαζολικών δακτυλίων των **29a** (φαινύλιο) και **29b** (ναφθαλένιο) εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις *van der Waals* με κατάλοιπα της β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου.

Πίνακας 41: Πιθανοί δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των αναστολέων και τον καταλοίπων του καταλυτικού κέντρου της *rmGPb*. Για την αρίθμηση των ατόμων του αναστολέα βλ. Πίνακας 39.

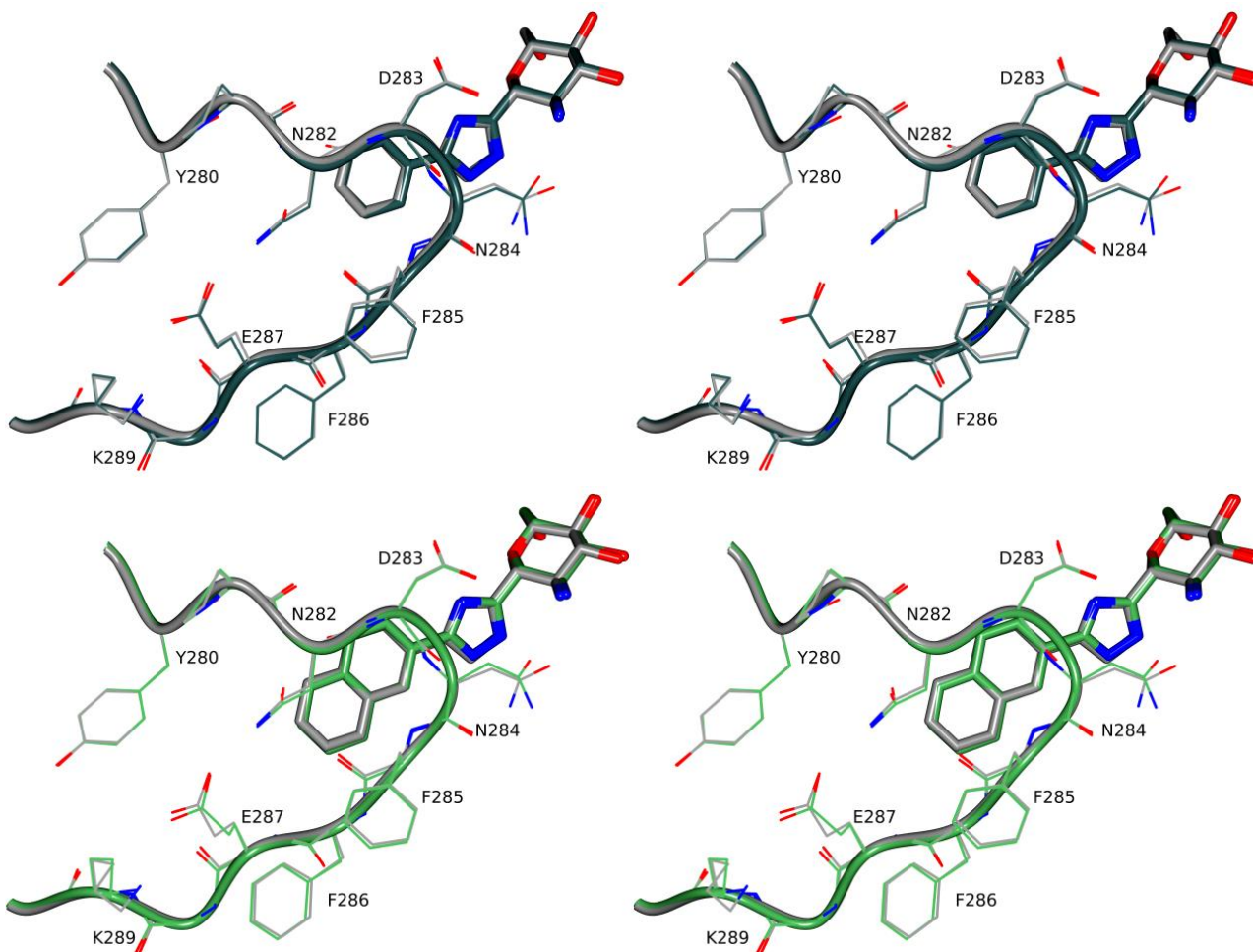
Άτομα αναστολέα	Κατάλοιπα της πρωτεΐνης και μόρια ύδατος	29a	29b
<i>N2'</i>	<i>Asn284(OD1)</i>	2.7	3.0
	<i>Tyr573(OH)</i>	3.1	3.2
	<i>Glu672(OE2)</i>	3.2	3.0
	<i>Water261(O)</i>	3.4	3.4
	<i>Water280(O)</i>	2.8	-
<i>O3'</i>	<i>Glu672(OE2)</i>	2.7	2.8
	<i>Ala673(N)</i>	3.3	3.2
	<i>Ser674(N)</i>	3.1	2.9
<i>O4'</i>	<i>Gly675(N)</i>	3.1	2.8
	<i>Gly675(N)</i>	2.9	2.8
<i>O6'</i>	<i>Water121(O)</i>	2.6	2.7
	<i>His377(ND1)</i>	2.7	2.7
<i>N2</i>	<i>Asn484(ND2)</i>	2.8	2.8
	<i>His377(O)</i>	2.9	2.9
<i>N5</i>	<i>Asn284(OD1)</i>	-	3.2
	<i>Water258(O)</i>	2.8	2.9
Σύνολο		15	15

Η αναστολή που επιφέρουν οι δύο αυτές ενώσεις στο ένζυμο φαίνεται να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούν με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων του βρόχου

280s (*Asn282, Asp283, Asp284*) σταθεροποιώντας έτσι το βρόχο στην κλειστή διαμόρφωση και κατ' επέκταση το ένζυμο στην ανενεργή στερεοδιαμόρφωση-*T*. Η σταθεροποίηση του βρόχου στην κλειστή διαμόρφωση έχει ως αποτέλεσμα την αποτροπή της εισόδου του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Η επιφάνεια που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη στην ελεύθερη από αναστολές δομή αλλά και της δομής των συμπλόκων είναι 494 Å² και 15 Å² για τον **29a** και 562 Å² και 15 Å² για τον **29b**, αντίστοιχα, υποδηλώνοντας ότι το 97 % (**29a, 29b**) της επιφάνειας του αναστολέα βρίσκεται θαμμένη στο καταλυτικό κέντρο. Η μεγαλύτερη συνεισφορά γίνεται από τα μη-πολικά κατάλοιπα τα οποία συνεισφέρουν κατά 56 % (**29a**) ή από τα πολικά κατάλοιπα τα οποία συνεισφέρουν κατά 54 % (**29b**) στην επιφάνεια η οποία υπερκαλύπτεται. Στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, 502 Å² (**29a**) και 302 Å² (**29b**) από την επιφάνεια που εκτίθεται στο διαλύτη καλύπτεται κατά την πρόσδεση των αναστολέων. Η συνολική καλυπτόμενη επιφάνεια (πρωτεΐνη και αναστολέας) για τα σύμπλοκα των αναστολέων *rmGPb-29a, -29b* είναι 981, 850 Å² αντίστοιχα.

Αν και στα σύμπλοκα της *rmGPb* με τους αναστολές **29a** και **29b** η ομάδα 2'-NH₂ σχηματίζει τις ίδιες αλληλεπιδράσεις με τις αντίστοιχες ενώσεις που διαθέτουν ομάδα 2'-OH (ενώσεις **3** και **4**, Πίνακας 39), τα παράγωγα γλυκοζαμίνης που μελετήσαμε είναι ασθενέστεροι αναστολές από τα αντίστοιχα παράγωγα γλυκοπυρανόζης. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά στον τρόπο πρόσδεσης μεταξύ των συμπλόκων *rmGb-29a* και **-3** [58] και μεταξύ των *rmGPb-29b* και **-4** [58], η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στην ισχύ του δεσμού υδρογόνου που δημιουργείται μεταξύ της ομάδας της θέσης 2' της γλυκοπυρανόζης και των καταλοίπων της πρωτεΐνης. Ένα δεσμός υδρογόνου του τύπου O-H...X είναι γνωστό ότι είναι ισχυρότερος από έναν του τύπου N-H...X με μια διαφορά ενέργειας κατά μέσο όρο 2 kcal/mol, η οποία εξαρτάται από τη φύση του X [283]. Επομένως, η ισχύς των αναστολέων **29a** και **29b** ακολουθεί το ίδιο πρότυπο που ακολουθούν και οι αντίστοιχες ενώσεις με υδροξυλομάδα στη 2' θέση της γλυκοπυρανόζης, αλλά με διαφορά μιας τάξης μεγέθους.

Συνολικά, οι αναστολές **29a** και **29b** σχηματίζουν 76 και 87 αλληλεπιδράσεις *van der Waals* αντίστοιχα, με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Η δομική βάση για τις διαφορές στις σταθερές αναστολές μεταξύ των αναστολέων **29a** και **29b** μπορεί επίσης να σχετίζεται με τη διαφορά στον αριθμό των αλληλεπιδράσεων *van der Waals* όπως έχει παρατηρηθεί επίσης και στις αντίστοιχες ενώσεις με 1,2,4-τριαζολικό δακτύλιο στις οποίες στη θέση 2' της γλυκοπυρανόζης υπάρχει -OH ομάδα (**3, 4**) [58].



Εικόνα 60: Στέρεο-απεικόνιση της υπέρθεσης του συμπλόκου **29a** στο **33a** [79] (πάνω) και του **29b** στο **33b** [79] (κάτω). Τα σύμπλοκα με τον αναστολέα με ιμιδαζολικό δακτύλιο παρουσιάζονται με γκρι χρώμα.

Δομική σύγκριση των συμπλόκων *rmGPb-29a*, *-29b*, οι οποίοι διαθέτουν ως συνδέτη έναν 1,2,4-τριαζολικό δακτύλιο, με τα αντίστοιχα σύμπλοκα των γλυκοζαμινών *rmGPb-33a* [79], *-33b* [79], οι οποίοι διαθέτουν ως συνδέτη ένα δακτύλιο ιμιδαζολίου, έδειξε ότι παρότι το επιπλέον άτομο αζώτου του τριαζολικού δακτυλίου (*N3*) δε συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου με κατάλοιπα της πρωτεΐνης, προάγει μια περιστροφή κατά $\sim 50^\circ$ της πλευρικής αλυσίδας της *Asn284*. Αυτή η περιστροφή οδηγεί σε μια μικρή μετακίνηση της *Asn284* με αποτέλεσμα να χάνεται ο δεσμός υδρογόνου που δημιουργεί η *Asn284* με την πλευρική αλυσίδα της *Tyr573*. Αυτή η μικρή αλλά σημαντική μετακίνηση του βρόχου 280s μπορεί να προσφέρει μια εξήγηση για τις διαφορές στις σταθερές αναστολείς που παρατηρούνται μεταξύ των ενώσεων **29a** και **29b** με τις αντίστοιχες γλυκοζαμίνες με ιμιδαζολικό δακτύλιο (**33a**, **33b**) [79]. Αυτή η διαταραχή της *Asn284* έχει παρατηρηθεί επίσης και σε ενώσεις με 1,2,4-τριαζολικό δακτύλιο στις οποίες στη θέση 2' της γλυκοπυρανόζης υπάρχει $-OH$ ομάδα (**3**, **4**) [58].

Συμπεράσματα

- Μελετήθηκαν δύο *N*-β-*D*-γλυκοσάμινιλ-τριαζόλες οι οποίες διέθεταν μια ομάδα $-NH_2$ αντί για $-OH$ στη 2' θέση της γλυκοπυρανόζης. Ο τριαζολικός συνδέτης είχε ως υποκαταστάτη είτε με μια φαινυλομάδα (**29a**) ή 2-ναφθαλενομάδα (**29b**). Οι δύο αυτές ενώσεις μελετήθηκαν με κινητικές και δομικές μελέτες ως προς την *GP*.
- Η ένωση **29b** ($K_i = 7.6 \mu M$) κατατάσσεται μέσα στις πέντε πιο ισχυρές ενώσεις ως προς την *GP* με τροποποιημένο δακτύλιο γλυκοπυρανόζης.
- Οι ενώσεις **29a** και **29b** είναι κατά μια τάξη μεγέθους λιγότερο ισχυροί αναστολείς συγκριτικά με τις αντίστοιχες ενώσεις που διέθεταν 2'-*OH* ομάδα στο δακτύλιο της γλυκοπυρανόζης (**3** και **4**) [58].
- Οι μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ έδειξαν ότι υπάρχει διαφορά στην ισχύ του δεσμού υδρογόνου που δημιουργείται από την ομάδα που υπάρχει στη 2' θέση της γλυκοπυρανόζης με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης.
- Ο αναστολέας **29b** φαίνεται να είναι πιο ισχυρός από τον αναστολέα **29a** λόγω των παραπάνω αλληλεπιδράσεων *van der Waals* που δημιουργεί η 2-ναφθαλενομάδα.
- Η σύνδεση των ενώσεων **29a** και **29b** προκάλεσε μια μετακίνηση της *Asn284* συγκριτικά με τις αντίστοιχες ενώσεις με ιμιδαζολικό δακτύλιο (**33a** και **33b**) [79] με αποτέλεσμα οι γλυκοζαμίνες με τριαζολικό δακτύλιο (**29a** και **29b**) να είναι λιγότερο ισχυροί αναστολείς από τις αντίστοιχες γλυκοζαμίνες με ιμιδαζολικό δακτύλιο (**33a** και **33b**) [79]. Η ίδια αλλαγή στη διαμόρφωση του ενζύμου έχει παρατηρηθεί και για τα αντίστοιχα ανάλογα με υδροξυλομάδα στη 2' θέση του δακτυλίου της γλυκόζης [57, 58].
- Παλαιότερες μελέτες που είχαν γίνει σε αναστολείς με τροποποιημένο δακτύλιο της γλυκοπυρανόζης [276-281] είχαν οδηγήσει σε σημαντικά χαμηλότερης ισχύος αναστολείς. Ωστόσο, στην παρούσα ενότητα είδαμε ότι η αντικατάσταση της ομάδας 2' $-OH$ της γλυκοπυρανόζης από $-NH_2$ αν και έχει μια αρνητική επίδραση στη σταθερά αναστολής, οι νέες ενώσεις εξακολουθούσαν να είναι αρκετά ισχυροί αναστολείς της *GP*.

5.3.4. Εξερεύνηση των ιδιοτήτων της β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου της *GP* με *C*-β-*D*-γλυκοπυρανόσυλο-τριαζολικές ενώσεις.

Οι *C*-γλυκοπυρανόσυλο-ετεροκυκλικές ενώσεις αποτελούν μια από τις τρεις κατηγορίες των πιο ισχυρών αναστολέων ως προς την *GP* [161]. Όπως έχουμε αναφέρει και σε προηγούμενη

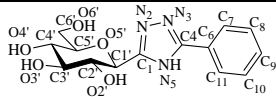
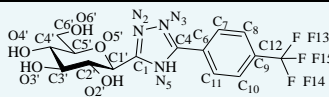
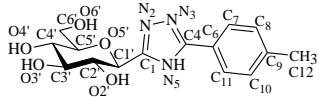
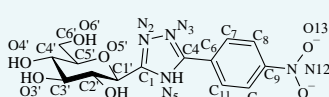
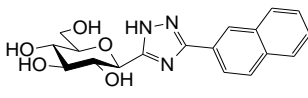
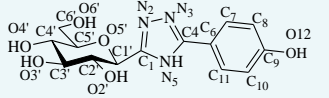
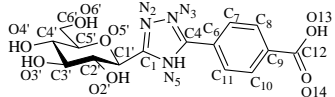
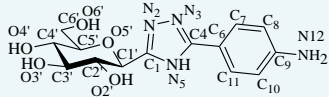
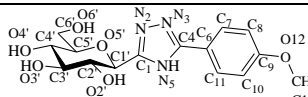
ενότητα, οι C-β-D-γλυκοκυρανόσυλο -ιμιδαζόλες [57] και οι -1,2,4-τριαζόλες [58] αποτελούν τους πιο ισχυρούς αναστολείς για την *hlGPa* με σταθερές αναστολής σε τιμές στο εύρος των *nM* [57, 58]. Η ισχύς αυτών των αναλόγων γλυκόζης μπορεί να αποδοθεί σε ένα εκτενές δίκτυο αλληλεπιδράσεων *van der Waals* που δημιουργούν με τα κατάλοιπα της β-εσοχής του ενζύμου.

Σε αυτή την ενότητα εξετάσαμε τα χαρακτηριστικά της β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου μελετώντας 4 ανάλογα γλυκοκυρανόζης ως πιθανούς αναστολείς της *GP* οι οποίοι αποτελούνταν από την γλυκοκυρανόζη, μια φαινυλική ομάδα και έναν 1,2,4-τριαζολικό δακτύλιο ο οποίος συνέδεε τη γλυκοκυρανόζη με τη φαινυλική ομάδα. Η φαινυλική ομάδα είχε τροποποιηθεί ώστε να έχει υποκαταστάτες στη θέση *πάρα* οι οποίοι διέφεραν ως προς το μέγεθος και την πολικότητα ($-CF_3$, $-NO_2$, $-OH$ και $-NH_2$).

Κινητικές μελέτες

Διεξαγάγαμε κινητικές μελέτες έναντι της *rmGPa* και *hlGPa* για τον προσδιορισμό των σταθερών αναστολής των ενώσεων ως προς τα ένζυμα. Όλες οι ενώσεις εμφάνισαν συναγωνιστική αναστολή ως προς το υπόστρωμα (*G1P*) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 42 μαζί με άλλες πέντε παρόμοιες ενώσεις για λόγους σύγκρισης.

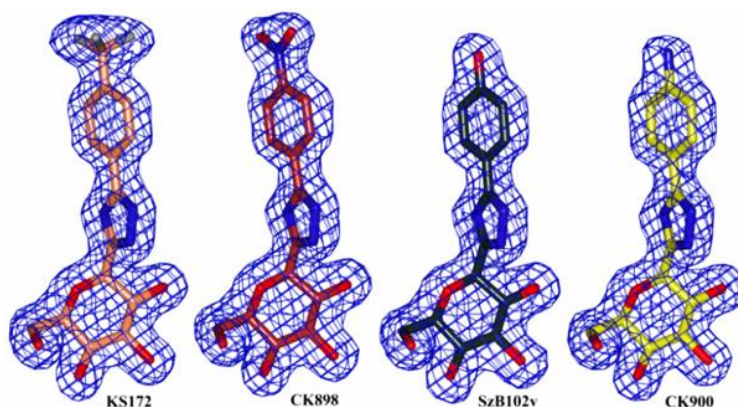
Πίνακας 42: Οι σταθερές αναστολής μαζί με την αρίθμηση που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα κρυσταλλογραφίας για κάθε αναστολέα. Οι ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα ενότητα επισημαίνονται με σκίαση. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν τις *K_i* που έχουν προσδιοριστεί ως προς την *rmGPa*.

Χημική δομή	<i>K_i</i> (μM)		Χημική δομή	<i>K_i</i> (μM)	
	<i>rmGPa</i>	<i>hlGPa</i>		<i>rmGPa</i>	<i>hlGPa</i>
	1.74 [58] (7 [262])	1.35 [58]		36.3 ± 2.0 (111 [284])	55.3 ± 0.8
2a			KS172		
	0.283 [58] (1.7 [262])	0.283 [58]		10.00 ± 0.46 (33.5 [284])	32.70 ± 1.85
2d			CK898		
	0.172 [58] (0.411 [262])	0.172 [58]		3.51 ± 0.13 (2.9 [284])	3.66 ± 0.15
2b			SzB102v		
	660 ± 55.03 (Δ.Π.*[284])	637.41 ± 32.67		0.550 ± 0.047 (0.67 [284])	0.427 ± 0.011
KS252			CK900		
	3.39 ± 0.23 (1.95 [284])	5.25 ± 0.23			
JLN270					

Ο πιο ισχυρός αναστολέας ήταν η ένωση **CK900** με τιμή της K_i 0.427 μM που έφερε μια ομάδα $-NH_2$ ως υποκαταστάτη στο φαινυλικό δακτύλιο. Όλοι οι υποκαταστάτες προκάλεσαν αναστολή στο ένζυμο, ο καθένας με παρόμοια ισχύ ανάμεσα στο δύο ένζυμα, με τις τιμές των K_i να ακολουθούν το πρότυπο $-CF_3 > -NO_2 > -OH > -NH_2$. Από αυτή τη κατάταξη φαίνεται πως το πιο βασικό χαρακτηριστικό του υποκαταστάτη που σχετίζεται με ισχυρότερη αναστολή αποτελεί το μέγεθος του παρά η πολικότητα του ή η παρουσία δότη/δέκτη δεσμού υδρογόνου ή η παρουσία/απουσία ιδιοτήτων οξέος ή βάσης. Αυτή η παρατήρηση ενισχύεται επιπλέον από προηγούμενες μελέτες [58], όπου ο αναστολέας **2d** ο οποίος διαθέτει μια $-CH_3$ ομάδα ως υποκαταστάτη, ανέστειλε πολύ ισχυρά το ένζυμο με K_i 0.283 μM (Πίνακας 42). Ωστόσο, αν συγκρίνουμε την K_i του **2d** με αυτή του **KS172** παρατηρούμε ότι η αυξημένη υδροφιλικότητα λόγω της αντικατάστασης των υδρογόνων με φθόριο οδηγεί σε μια σημαντική μείωση της ισχύος του αναστολέα κατά 195 φορές.

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

Ο προσδιορισμός του τρόπου πρόσδεσης των υπό μελέτη ενώσεων στη *GP* έγινε με χρήση κρυστάλλων της *rmGPb*, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως (βλ. παράγραφο 4.8.2). Πιο συγκεκριμένα, οι κρύσταλλοι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 10 mM *BES* pH 6.7, 10 % v/v *DMSO* και 10 mM αναστολέα για 3 h πριν τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε σε πηγή συγχροτρονικής ακτινοβολίας στο *MAX-Lab* στο *Lund* της Σουηδίας όπως αναλύεται στην αντίστοιχη παράγραφο (βλ. παράγραφο 4.8.2).



Εικόνα 61: Οι χάρτες $2F_o-F_c$ που υπολογίστηκαν για τις ενώσεις **KS172**, **CK898**, **SzB102v** και **CK900** οι οποίες προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο. Οι χάρτες ήταν προσαρμοσμένοι σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των αναστολέων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Τα στατιστικά που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων περίθλασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 43 και οι χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας που υπολογίστηκαν έδειξαν ότι

όλες οι ενώσεις προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου με τα άτομα των αναστολέων να εντοπίζονται καλά σε αυτούς τους χάρτες (Εικόνα 61).

Πίνακας 43: Σύνοψη των στατιστικών παραμέτρων από την επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης και τη διαδικασία της βελτιστοποίησης για τα σύμπλοκα της *rmGPb* με τους αναστολείς. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

Σύμπλοκο- <i>rmGPb</i>	<i>CK898</i>	<i>CK900</i>	<i>SzB102v</i>	<i>KS172</i>
Στατιστικοί δείκτες συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων				
Ευκρίνεια (Å)	38.75-1.9 (2.0-1.9)	38.4-1.8 (1.9-1.8)	38.4-1.9 (2.0-1.9)	38.4-1.85 (1.95-1.85)
Ανακλάσεις που μετρήθηκαν	300822	230851	251878	329820
Μοναδικές ανακλάσεις	75574 (10787)	87453 (12453)	72951 (10736)	80615 (11668)
R_{merge}	0.057 (0.318)	0.053 (0.492)	0.064 (0.425)	0.056 (0.396)
Πληρότητα (%)	98.5 (97.6)	97.5 (96.2)	95.8 (97.2)	97.4 (97.3)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	14.0 (4.0)	10.2 (2.0)	12.2 (3.2)	12.9 (3.3)
Πολλαπλότητα	4.0 (4.0)	2.6 (2.6)	3.5 (3.4)	4.1 (4.1)
$CC^{1/2}$	0.997 (0.889)	0.997 (0.713)	0.836 (0.739)	0.996 (0.903)
B Wilson (Å ²)	26.3	28.2	22.1	23.4
Αριθμός μορίων ύδατος	294	316	304	293
Αριθμός ατόμων αναστολέα	79	70	70	73
R (R_{free}) (%)	16.5 (19.9)	16.3 (19.1)	16.5 (19.7)	14.9 (18.7)
Εξωτερική στοιβάδα R (R_{free}) (%)	24.2 (30.4)	27.8 (30.3)	25.8 (29.8)	24.0 (26.6)
Απόκλιση r.m.s. από τις ιδεατές τιμές				
Μήκη δεσμών (Å)	0.010	0.010	0.010	0.020
Γωνίες (°)	1.4	1.4	1.4	1.9
Μέση τιμή παράγοντα θερμικής κίνησης (Å²)				
Άτομα πρωτεΐνης	33.2	32.4	29.8	33.0
Μόρια ύδατος	38.8	37.8	35.6	37.1
Άτομα αναστολέα	41.5	40.9	30.2	39.4
PDB entry	50X0	50X4	50X3	50WZ

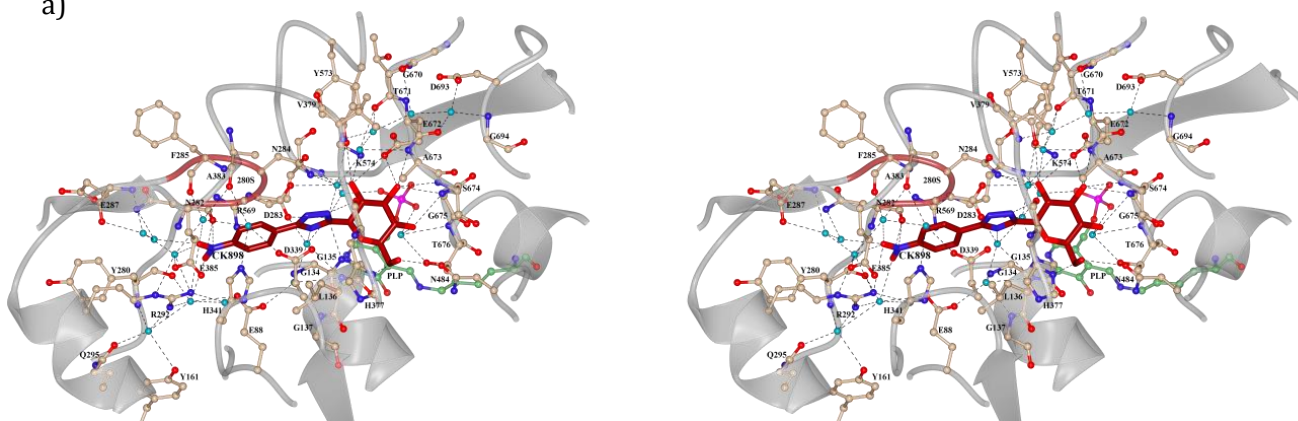
Η τιμή *r.m.s.d.* που προέκυψε μετά από υπέρθεση των τριών συμπλόκων των αναστολέων ως προς την δομή της ελεύθερης από αναστολείς *rmGPb* για τα καλά καθορισμένα κατάλοιπα (18 - 49, 262 - 312 και 326 -829) ήταν 0.125, 0.141, 0.120 και 0.122 Å για τα σύμπλοκα των αναστολέων *KS172*, *CK898*, *SzB102v*, *CK900* αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές της *r.m.s.d.* υποδεικνύουν ότι δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στη συνολική διαμόρφωση της πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση των αναστολέων. Η πρόσδεση των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο συμβαίνει αρχικά με τη σύνδεση της γλυκοπυρανόζης στο κέντρο πρόσδεσης της γλυκόζης το οποίο αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου. Η πρόσδεση της επικράτειας της γλυκοπυρανόζης κάθε αναστολέα γίνεται με ένα τυπικό πρότυπο δεσμών υδρογόνων και αλληλεπιδράσεων *van der Waals* το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες αλλά και στις προηγούμενες ενότητες της διατριβής. Επιπρόσθετα, τρία συντηρημένα μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ της γλυκοπυρανόζης κάθε αναστολέα και των καταλοίπων της πρωτεΐνης *Asp283*, *Asn284*, *Tyr573*, *Lys574*, *Thr671*, *Ala673*, *Thr676* και της φωσφορικής ομάδας 5' της *PLP*.

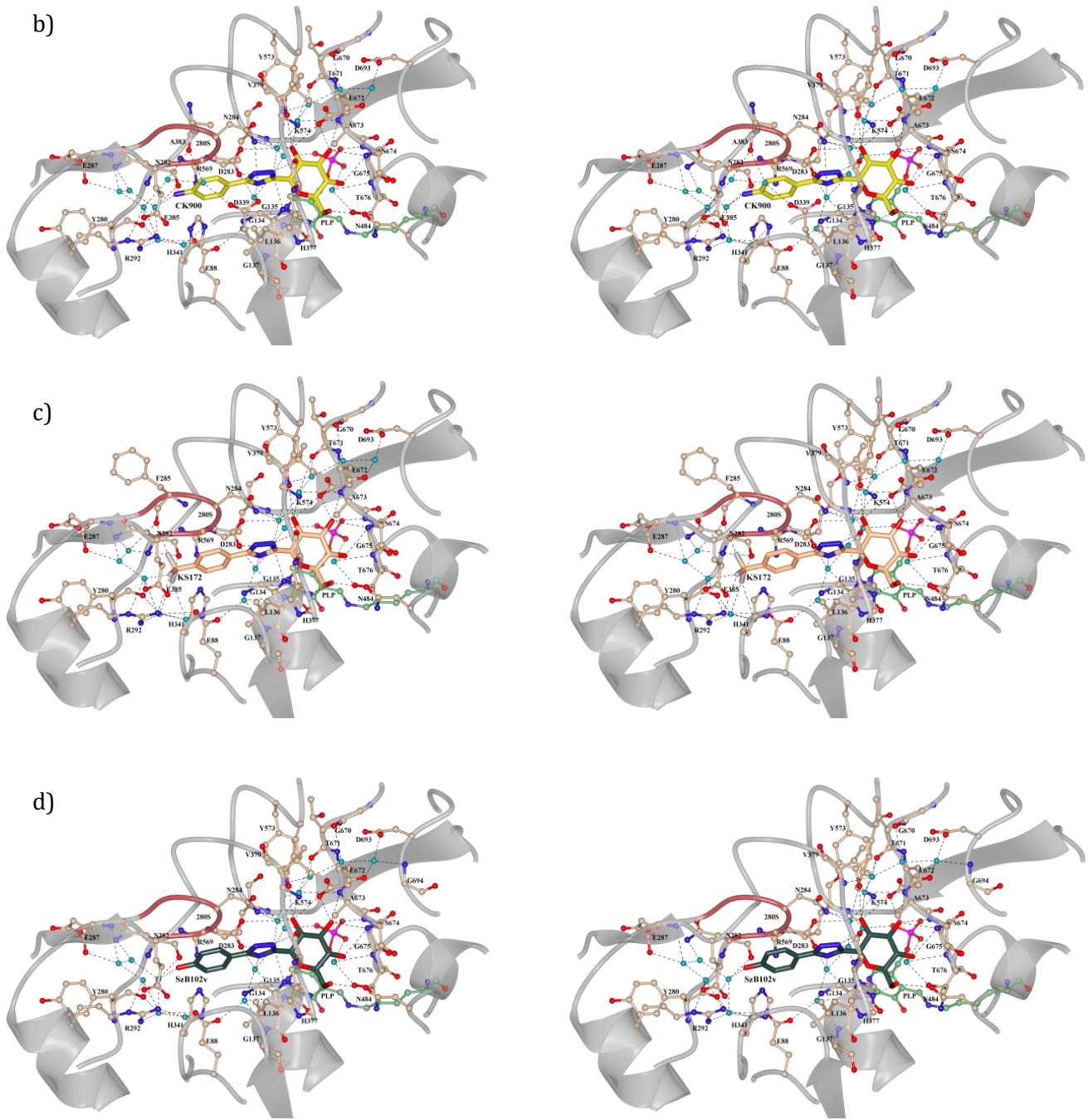
Πίνακας 44: Πιθανοί δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των αναστολέων και τον καταλοίπων του καταλυτικού κέντρου της *rmGPb*. Οι αριθμοί που αναγράφονται αναφέρονται σε απόσταση σε Å. Για την αρίθμηση των ατόμων των αναστολέων βλ. Πίνακας 42.

Άτομα αναστολέα	Κατάλοιπα πρωτεΐνης	<i>KS172</i>	<i>CK898</i>	<i>SzB102v</i>	<i>CK900</i>	
Άτομα γλυκοπυρανόζης	02'	<i>Asn284 (ND2)</i>	3.0	2.7	2.9	3.0
		<i>Tyr573 (OH)</i>	3.0	3.0	3.1	3.0
		<i>Glu672 (OE1)</i>	3.1	3.2	3.2	3.2
	03'	<i>Glu672 (OE2)</i>	2.7	2.7	2.8	2.8
		<i>Ala673 (N)</i>	3.1	3.2	3.2	3.2
		<i>Ser674 (N)</i>	3.0	3.1	3.0	3.0
<i>Gly675 (N)</i>		3.1	3.2	3.1	3.1	
04'	<i>Gly675 (N)</i>	2.9	2.9	2.9	2.9	
	06'	<i>His377 (ND1)</i>	2.7	2.7	2.7	2.7
Άτομα τριαζολικού δακτυλίου	N2	<i>His377 (O)</i>	2.8	2.6	2.7	2.7
	N5	<i>Asn284 (ND2)</i>	-	-	-	3.2
	O13	<i>Arg292 (NH2)</i>	-	3.3	-	-
Άτομα των ομάδων στη θέση παρά	F13	<i>Arg292 (NH2)</i>	3.2	-	-	-
	F14	<i>Asn282 (O)</i>	3.3	-	-	-
		<i>Phe285 (O)</i>	2.8	-	-	-
	F15	<i>Asn282 (O)</i>	3.1	-	-	-
Σύνολο		15	12	11	12	

Ο τριαζολικός δακτύλιος σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της καρβονυλομάδας της κύριας αλυσίδας της *His377* (Πίνακας 44). Αυτή η αλληλεπίδραση έχει παρατηρηθεί και σε άλλους *GPIs*, ανάλογα γλυκοπυρανόζης, όπως στις γλυκοζαμίνες με τριαζολικό δακτύλιο που αναλύθηκαν προηγουμένως, για τους οποίους η ισχύς της αναστολής έχει αποδοθεί πρωτίστως σε αυτή την αλληλεπίδραση [57, 58, 74, 247, 250, 271]. Επιπλέον, ο τριαζολικός δακτύλιος συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι διαμεσολαβούνται από μόρια ύδατος, με την πλευρική αλυσίδα της *Asp283* και την κύρια αλυσίδα της *Leu136* (Εικόνα 62).

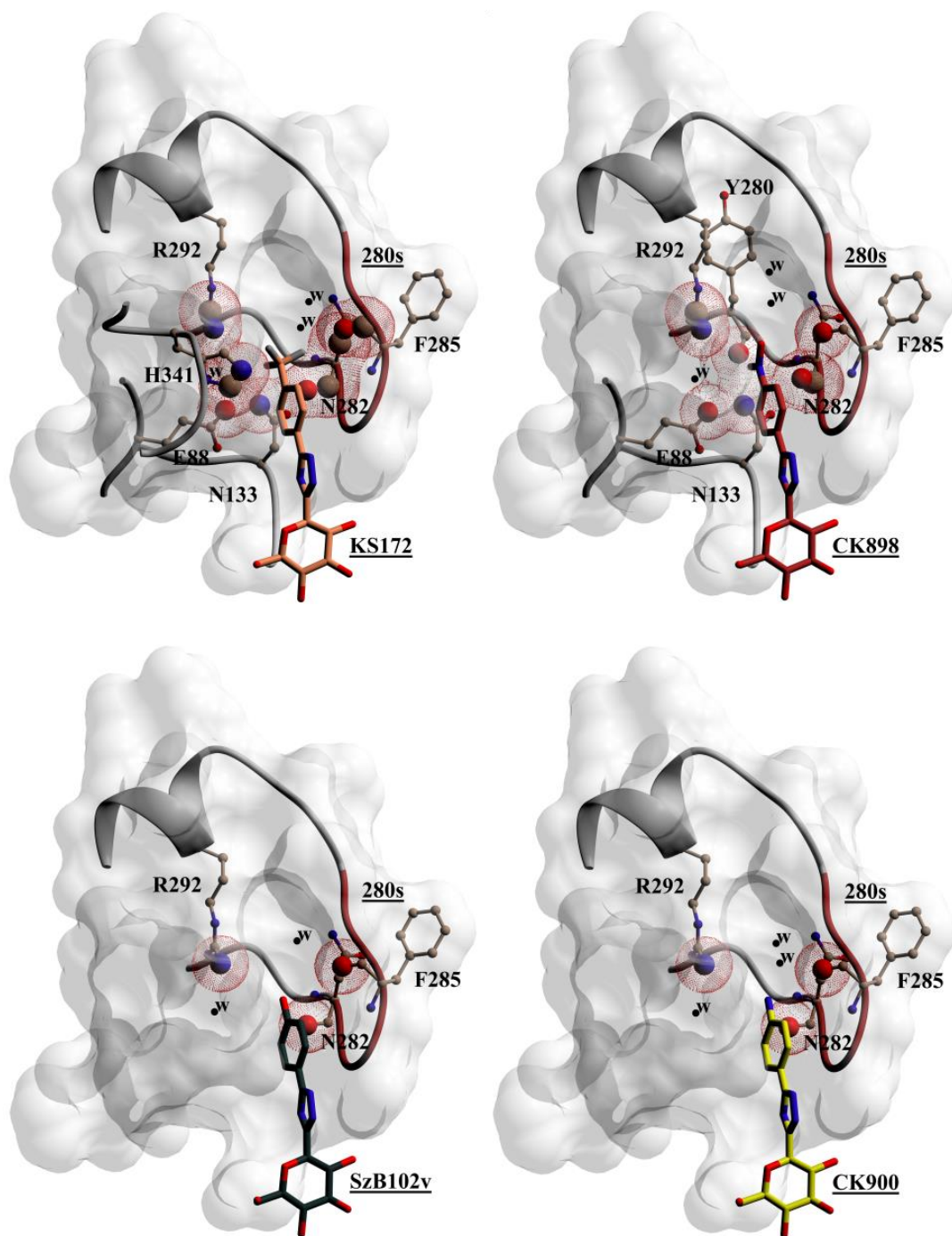
a)





Εικόνα 62: Παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν οι αναστολείς με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου: a) **CK898**, b) **CK900**, c) **KS172**, d) **SzB102v**. Τα μόρια ύδατος απεικονίζονται ως κυανές σφαίρες και οι δεσμοί υδρογόνου με διακεκομμένες γραμμές.

Συνολικά, οι αναστολείς **KS172**, **CK898**, **SzB102v** και **CK900** συμμετέχουν αντίστοιχα σε 79, 78, 75 και 84 αλληλεπιδράσεις *van der Waals* με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου της *rmGPb*. Ο δακτύλιος του φαινυλίου εμπλέκεται σε ένα εκτενές δίκτυο αλληλεπιδράσεων *van der Waals* με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης *Glu88*, *Asn282*, *Asn284*, *Phe285* και *His341*. Επιπρόσθετα, όλοι οι αναστολείς συμμετέχουν σε π-κάτιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του φαινυλικού δακτυλίου και του μιδαζολικού δακτυλίου της *His341*.



Εικόνα 63: Παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις του υποκαταστάτη του φαινυλίου για τους τέσσερις αναστολείς. Τα άτομα των καταλοίπων της πρωτεΐνης που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις *van der Waals* παρουσιάζονται μεγεθυμένα μέσα σε κοκκώδεις σφαίρες (κόκκινο χρώμα). Τα μόρια ύδατος απεικονίζονται με μαύρες σφαίρες (*w*).

Αυτές οι αλληλεπιδράσεις έχουν παρατηρηθεί στις προηγούμενες ενότητες. Επιπλέον, η ισχυρή αναστολή που προκαλούν οι **2a** και **2b** (Πίνακας 42) έχει επίσης αποδοθεί σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις, εκτός από το δεσμό υδρογόνου του τριαζολικού δακτυλίου με το οξυγόνο της καρβονυλομάδας της κύριας αλυσίδας της *His377* [58].

Για να μπορέσουμε να διαλευκάνουμε την αιτία για την οποία εμφανίζονται διαφορές στις σταθερές αναστολής, εστίασαμε στους υποκαταστάτες στη θέση *πάρα* του φαινυλικού δακτυλίου. Στον **KS172** ($K_i=53.3 \mu M$) η ομάδα $-CF_3$ σχηματίζει τέσσερις δεσμούς αλογόνου με τα κατάλοιπα *Asn282*, *Phe285* και *Arg292* (Πίνακας 44, Εικόνα 62) και συμμετέχει σε 11 αλληλεπιδράσεις *van der Waals* (Πίνακας 45, Εικόνα 63).

Πίνακας 45: Αλληλεπιδράσεις *van der Waals* για τα άτομα των υποκαταστατών στη θέση *πάρα* του φαινυλικού δακτυλίου. Για την αρίθμηση των ατόμων των αναστολέων βλ. Πίνακας 42.

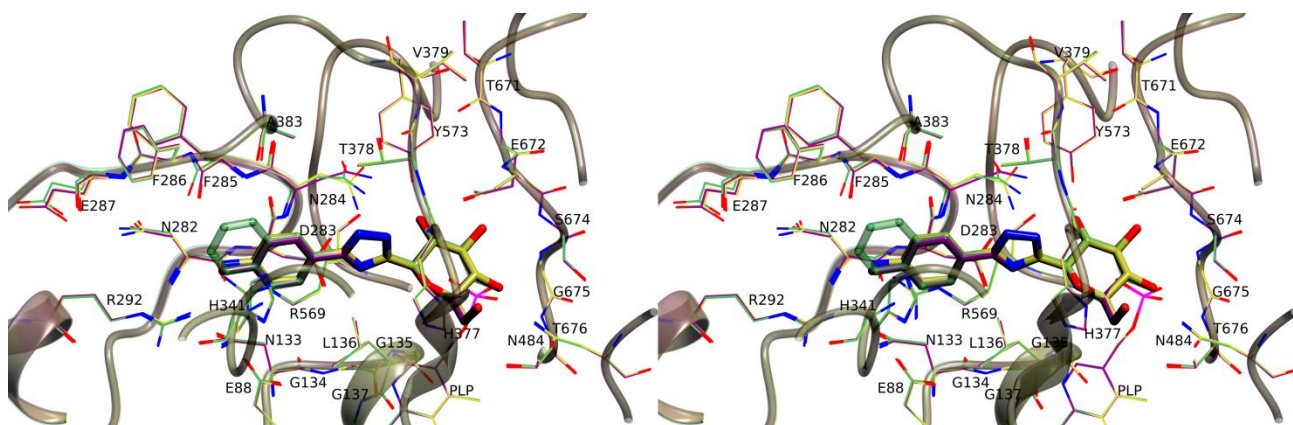
Αναστολέας	Άτομα της ομάδας στη θέση <i>πάρα</i>	Αλληλεπιδράσεις <i>van der Waals</i>
KS172	C12	Asn282 (O), Phe285 (O), Wat195 (O), Wat182 (O), Wat362 (O)
	F13	His341 (CE1,NE2), Arg292 (CZ), Wat182 (O), Wat195 (O)
	F14	Asn282 (C,CB), Phe285 (C), Wat362 (O)
	F15	Glu88 (OE2), Asn133 (ND2), Arg292 (NH2), Wat195 (O)
CK898	N12	Wat195 (O), Wat182 (O)
	O13	Asn282 (O), Arg292 (CZ), Phe285 (O), Wat196 (O)
	O14	Glu88 (OE2), Asn282 (C), Asn133 (ND2), Tyr280 (O), Wat195 (O), Wat182 (O)
SzB102v	O12	Ans282 (O), Arg292 (NH2), Phe285 (O), Wat195 (O), Wat182 (O)
CK900	N12	Asn282 (O), Arg292 (NH2), Phe285 (O), Wat182 (O), Wat195 (O), Wat632 (O)

Σε προηγούμενες μελέτες, ο σχηματισμός δεσμών αλογόνου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ισχύος της αναστολής [38, 280]. Η ομάδα $-NO_2$ του αναστολέα **CK898** ($K_i=32.7 \mu M$), εμπλέκεται σε ένα δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο *Arg292* (Πίνακας 44, Εικόνα 62) και σε 8 αλληλεπιδράσεις *van der Waals* (Πίνακας 45, Εικόνα 63). Τέλος, η ομάδα $-OH$ του αναστολέα **SzB102v** ($K_i=3.66 \mu M$) και η ομάδα $-NH_2$ του αναστολέα **CK900** ($K_i=0.427 \mu M$) δε συμμετέχουν άμεσα σε κανένα δεσμό υδρογόνου με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης (Πίνακας 44, Εικόνα 62) και ο καθένας τους εμπλέκεται σε τρεις αλληλεπιδράσεις *van der Waals* με τα κατάλοιπα *Asn282*, *Ph285* και *Arg292* (Πίνακας 45, Εικόνα 63). Φαίνεται πως δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των αλληλεπιδράσεων και των σταθερών αναστολής αλλά υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ του τύπου των αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις *van der Waals*) και την ισχύ της πρόσδεσης. Η εγγύτητα και οι αλληλεπιδράσεις των πολικών ατόμων των καταλοίπων της πρωτεΐνης και των μορίων ύδατος με το άτομο C12 του **KS172** (Πίνακας 45) μπορεί να μην ευνοεί τη σύνδεση του αναστολέα με αποτέλεσμα η ανασταλτική ισχύς του **KS172** να είναι η μικρότερη από τους υπόλοιπους αναστολείς (Πίνακας 42). Σε ό,τι αφορά τον **CK898**, οι αλληλεπιδράσεις της ομάδας $-NO_2$ γίνονται με πολικά άτομα (Πίνακας 45). Η ομάδα $-NO_2$ βρίσκεται επίσης κοντά στο οξυγόνο της καρβονυλομάδας της κύριας αλυσίδας της *Asn282* (2.8 Å), δημιουργώντας μια μάλλον μη ευνοϊκή αλληλεπίδραση η οποία επηρεάζει αρνητικά την σταθερά αναστολής (1.6 χαμηλότερη από αυτή του **KS172**, Πίνακας 42). Οι αλληλεπιδράσεις που δημιουργεί ο

υποκαταστάτης του **SzB102v** (-OH) είναι κυρίως πολικές/πολικές (Πίνακας 45). Τέλος, ο **CK900**, ο οποίος είναι ο πιο ισχυρός αναστολέας της παρούσας ενότητας αλλά και στο σύνολο των αναστολέων που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής, σχηματίζει μόνο ευνοϊκές πολικές/πολικές αλληλεπιδράσεις *van der Waals* (Πίνακας 45, Εικόνα 63) και έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου (άτομο N5 του τριαζολικού δακτυλίου) με το άτομο ND2 της πλευρικής αλυσίδας της *Asn284* (Πίνακας 44, Εικόνα 62) με αποτέλεσμα να εμφανίζει μια τιμή *K_i* μικρότερη κατά 8.5 από αυτή του **SzB102v**. Ο **CK900** είναι σχεδόν ισοδύναμος αναστολέας με τον **2d** [58], ο οποίος έχει ως υποκαταστάτη στον τριαζολικό δακτύλιο ένα φαινυλικό δακτύλιο με ομάδα -CH₃. Παρότι τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δύο υποκαταστατών είναι εντελώς διαφορετικά, η β-εσοχή του καταλυτικού κέντρου αποτελείται τόσο από πολικές όσο και από μη-πολικές ομάδες με αποτέλεσμα αυτή η μίξη των χαρακτηριστικών να μπορεί να οδηγεί σε ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις και για τις δύο ομάδες (Εικόνα 64). Οι παρόμοιες σταθερές αναστολής των **CK900** και **2d** [58], ήταν κατά κάποιον τρόπο μη αναμενόμενες κάτι το οποίο δηλώνει ότι σε κάθε βήμα της βελτιστοποίησης ενός αναστολέα είναι απαραίτητη η επίλυση της κρυσταλλικής δομής των συμπλόκων ώστε να κατευθυνθεί ορθολογικά το επόμενο βήμα.

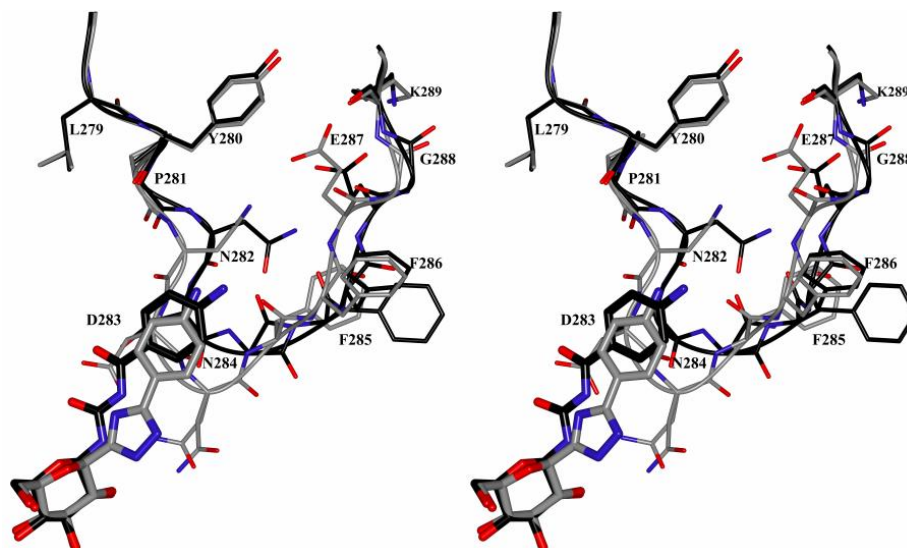
Σε προηγούμενη εργασία [285], μια σειρά από δέκα ανάλογα *N'*-(β-D-γλυκοκυρανόσυλο)-4-υποκατεστημένα βενζοϋλ-ουρίας είχαν μελετηθεί με κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες ως προς την *GP*. Κάποιες από αυτές τις ενώσεις, είχαν υποκαταστάτες ίδιους με αυτούς που παρουσιάστηκαν σε αυτή την ενότητα όπως: -H (**2a**), -CH₃ (**2d**), -OH (**SzB102v**), -NO₂ (**CK898**) και -NH₂ (**CK900**) με παρόμοιες σταθερές αναστολής μεταξύ τους σε χαμηλά *μM*: 4.6 (-H), 2.3 (-CH₃), 6.3 (-OH), 3.3 (-NO₂) και 6.0 (-NH₂) [285]. Αυτή η ομοιότητα στις σταθερές αναστολής δεν φάνηκε να σχετίζεται καλά με τα δομικά δεδομένα στα οποία παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις αλληλεπιδράσεις για κάθε υποκαταστάτη στην *πάρα* θέση κατά την πρόσδεση στη *rmGPb* [285]. Η ανάλυση της δομής των συμπλόκων μέσω κρυσταλλογραφίας [285] έδειξε ότι η πρόσδεση αυτών των ενώσεων οδηγούσε σε μια σημαντική μεταβολή στη διαμόρφωση του βρόχου 280s συγκριτικά με τη διαμόρφωση του στα σύμπλοκα που παρουσιάζονται σε αυτή την ενότητα (Εικόνα 65). Φαίνεται ότι το ενεργειακό κόστος για την αλλαγή της διαμόρφωσης του βρόχου 280s καθόρισε σχεδόν εξ ολοκλήρου την ισχύ των αναστολέων με αποτέλεσμα οι διαφορετικοί υποκαταστάτες στη θέση *πάρα* του βενζολικού δακτυλίου να μην επηρεάζουν με κάποιο τρόπο την σταθερά αναστολής. Αντίθετα, οι αναστολείς της παρούσας ενότητας δεν προκάλεσαν κάποια σημαντική αλλαγή στη

διαμόρφωση του βρόχου 280s με αποτέλεσμα η επίδραση του υποκαταστάτη στην σταθερά αναστολής να είναι πιο εμφανής και να συσχετίζεται καλύτερα με τα δομικά δεδομένα.



Εικόνα 64: Στέρεο-απεικόνιση της υπέρθεσης των συμπλόκων *rmGPb-CK900* (κίτρινο), *-2b* (πράσινο) και *-2d* (μωβ).

Ο πιο ισχυρός *C*- β -*D* γλυκοκυρανόσυλο-τριάζολο αναστολέας για την *GP* είναι ο **2b** [58] ο οποίος διαθέτει μια ομάδα 2-ναφθαλενίου και εμφανίζει μια σταθερά αναστολής ίση με 0.172 μ M (Πίνακας 42). Σε εργασία του 2016 [41] προτάθηκε ότι αυτός ο αναστολέας στοχεύει τα β -κύτταρα του παγκρέατος και μπορεί να αποτελεί ένα παράγοντα που προστατεύει ή ακόμα και βελτιώνει τη δυσλειτουργία των β παγκρεατικών κυττάρων στο διαβήτη. Σύγκριση της δομής του συμπλόκου *rmGPb-2b* [58] με το *rmGPb-CK900* έδειξε ότι οι δομές των συμπλόκων είναι πολύ όμοιες (Εικόνα 64).



Εικόνα 65: Στέρεο-απεικόνιση της υπέρθεσης των συμπλόκων των *rmGPb-CK900* (γκρι) στο αντίστοιχο ανάλογο ουρίας (μαύρο) [12].

Στο σύμπλοκο *rmGPb-2b* η φαινυλική ομάδα του **2b** συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις *van der Waals* με τα κατάλοιπα *Asn282* (1), *Asn284* (1), *Phe285* (3), *Arg292* (2), *His341* (7) και *Ala383* (1) [58]. Στο σύμπλοκο *rmGPb-CK900* η ομάδα του $-NH_2$ στην *πάρα* θέση, συμμετέχει σε

πολικές/πολικές αλληλεπιδράσεις με το οξυγόνο της καρβονυλομάδας της κύριας αλυσίδας της *Asn282* και της *Phe285* αλλά και με την πλευρική αλυσίδα της *His341* (Πίνακας 45, Εικόνα 63). Επομένως, παρότι οι δύο αναστολές έχουν διαφορετικούς υποκαταστάτες σε ότι αφορά την πολικότητα, οι αλληλεπιδράσεις τους με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης οδηγούν σε παρόμοια ανασταλτική ισχύ που επιφέρει η πρόσδεση τους στο ένζυμο [K_i 0.172 (**2b**) και 0.427 (**CK900**), Πίνακας 42].

Συμπεράσματα

- Ο πιο ισχυρός αναστολέας (**CK900**) διέθετε ως υποκαταστάτη στο φαινυλικό δακτύλιο μια ομάδα $-NH_2$ και εμφάνισε K_i με τιμή ίση με 427 nM για την *hIGPa*. Ο **CK900** αποτελεί έναν από τους δέκα πιο ισχυρούς αναστολές της *GP* για το καταλυτικό κέντρο.
- Η ανάλυση των συμπλόκων των δομών ανέδειξε τις υδρόφοβες και υδρόφιλες περιοχές, οι οποίες ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του αναστολέα, μπορούν να ευνοήσουν ή να εξασθενίσουν την ισχύ ενός αναστολέα.
- Η εύρεση ενός αναστολέα που θα μπορεί να αξιοποιεί και τις υδρόφοβες και τις υδρόφιλες περιοχές της β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου, αποτελεί την επόμενη πρόκληση στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων για την *GP*.

5.3.5. Στόχευση του κέντρου αναστολής της *GP* με ανάλογα χρυσίνης

Το κέντρο αναστολής της *GP* δεν έχει μελετηθεί σε βάθος όπως το καταλυτικό κέντρο αλλά παρουσιάζει ενδιαφέρον για το σχεδιασμό αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων. Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή, αναστολές οι οποίοι προσδένονται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου δρουν σε συνέργεια με τη γλυκόζη κάτι το οποίο σημαίνει ότι οι δράση των αναστολέων θα μπορεί να ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Επομένως, σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας ο αναστολέας θα αναστέλλει ισχυρά το ένζυμο ενώ σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης ο αναστολέας θα προκαλεί ασθενέστερη αναστολή με αποτέλεσμα να μη προκαλείται υπογλυκαιμία [84, 87, 89, 92]. Λόγω αυτής της ιδιότητας, ο σχεδιασμός ενώσεων που στοχεύουν το συγκεκριμένο κέντρο είναι αρκετά ελκυστικός για την παραγωγή νέων αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων. Η φλαβοπιριδόλη, ($K_i \sim 1.2 \mu M$ [70, 89]) και ένα ανάλογο της ($K_i = 0.83 \mu M$ [90]) είναι η πιο ισχυρή ένωση που έχει βρεθεί να προσδένεται σε αυτό το κέντρο.

Αν και τα φυσικά προϊόντα, όπως τα φλαβονοειδή αποτελούν ικρίωματα για το σχεδιασμό αναστολέων για την *GP*, οι μόνες ενώσεις των οποίων η πρόσδεση έχει μελετηθεί λεπτομερώς

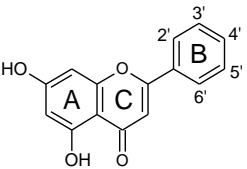
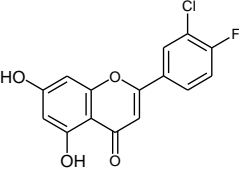
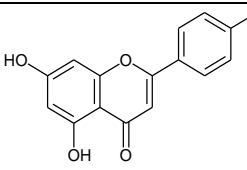
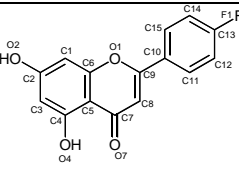
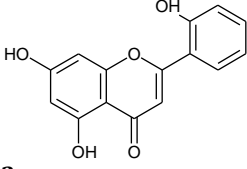
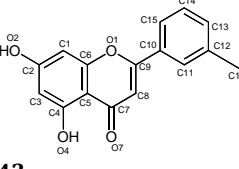
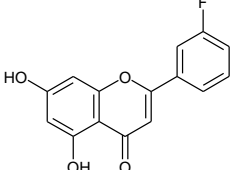
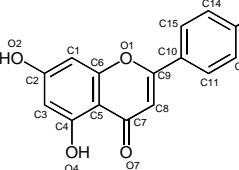
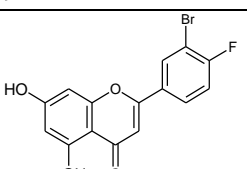
στο κέντρο αναστολής είναι η χρυσίνη ($K_i = 19.01 \mu M$, *rmGPb*) [89] και το ελλαγικό οξύ ($K_i = 7.5 \mu M$, *rmGPa*) [92]. Σε αυτή την ενότητα μελετήθηκαν ενώσεις που προέκυψαν ύστερα από σάρωση της βάσης δεδομένων ZINC (<http://zinc.docking.org>) [286] χρησιμοποιώντας την χρυσίνη ως ένωση οδηγό. Η σάρωση και οι *in silico* μελέτες έγιναν από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή *Joseph M. Hayes* από το Πανεπιστήμιο του *Central Lancashire* στο Ηνωμένο Βασίλειο. Οκτώ υποψήφια μόρια με διαφορετικούς υποκαταστάτες στις θέσεις -όρθο, -μέτα, -πάρα του δακτυλίου Β της χρυσίνης (Πίνακας 46) επιλέχθηκαν για μελέτες στην GP. Η σύνθεση των χημικών ενώσεων έγινε από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή *Timothy J. Snape* από το Πανεπιστήμιο του *Central Lancashire* στο Ηνωμένο Βασίλειο. Οι ενώσεις αυτές μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν τα ένζυμα *rmGPb*, *rmGPa* και *hlGPa* και μελετήθηκε ο τρόπος πρόσδεσης τους στο ένζυμο.

Κινητικές μελέτες

Η ικανότητα των ενώσεων **1**, **2**, **9**, **10**, **11**, **20**, **43** και **52** (Πίνακας 46) να ανατέλλουν την GP αξιολογήθηκε ως προς τα ένζυμα *rmGPa* και *hlGPa*. Κινητικές μελέτες διεξήχθησαν επίσης και ως προς την *rmGPb* για λόγους σύγκρισης καθώς οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έγιναν με κρυστάλλους που είχαν αναπτυχθεί από το συγκεκριμένο ένζυμο. Επιπλέον, έγινε προσδιορισμός της K_i της χρυσίνης καθώς σε προηγούμενη μελέτη η K_i της είχε προσδιοριστεί ως προς την πορεία αποικοδόμησης του γλυκογόνου και όχι προς τη σύνθεση [89]. Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών, μαζί με την αρίθμηση των ατόμων που χρησιμοποιήθηκε για τις κρυσταλλογραφικές μελέτες παρουσιάζονται στον Πίνακας 46. Οι **1**, **2**, και **10** επέφεραν μόνο 14 - 27 % αναστολή σε συγκέντρωση $100 \mu M$ ως προς την *rmGPb* και ως εκ τούτου δεν προχωρήσαμε σε περαιτέρω κινητικές μελέτες. Το μοτίβο αναστολής των ενώσεων φαίνεται να ακολουθεί το ίδιο πρότυπο ως προς τα τρία ένζυμα (τιμές K_i για *hlGPa* > *rmGPa* > *rmGPb*). Οι ενώσεις **11**, **20** και **43** είναι πιο ισχυροί αναστολείς και για τα τρία ένζυμα συγκριτικά με τη χρυσίνη ($K_i < 4 \mu M$, Πίνακας 46), η ένωση **9** εμφανίζει παρόμοια αναστολή με τη χρυσίνη, ενώ η ένωση **52** είναι λιγότερο δραστικός αναστολέας συγκριτικά με τη χρυσίνη (Πίνακας 46). Ο αναστολέας **43** είναι η πιο δραστική από όλες τις ενώσεις που μελετήθηκαν και εμφανίζεται ισοδύναμος με τη φλαβοπιριδόλη για το κέντρο αναστολής της GP. Επιπλέον, οι αναστολείς **11** και **20** εμφανίζουν παρόμοια σταθερά αναστολής και κατατάσσονται ανάμεσα στους πιο ισχυρούς αναστολείς της GP που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα. Συγκρίνοντας τους υποκαταστάτες του δακτυλίου Β (Πίνακας 46), φαίνεται πως η παρουσία αλογόνου στη θέση 3', επηρεάζει την αναστολή η οποία είναι ισχυρότερη όταν στη θέση αυτή

υπάρχει χλώριο και ελαφρώς λιγότερη ισχυρή όταν υπάρχει φθορίο. Η αναστολή όμως γίνεται φανερά ασθενέστερη όταν στη θέση αυτή (3') υπάρχει βρώμιο (**10**). Σε ότι αφορά τη θέση 4' του δακτυλίου B, η ύπαρξη φθορίου σε αυτή τη θέση αυξάνει την αναστολή (**11** και **20**) ενώ η παρουσία μεθυλομάδας (**52**) έχει, για κάποιο λόγο, αρνητική επίδραση. Όμως, όταν υπάρχει βρώμιο στη θέση 4', τότε και πάλι η αναστολή γίνεται ιδιαίτερα ασθενής (**1**). Η ύπαρξη μεθυλομάδας στη θέση 3' (ή 5') του δακτυλίου B (**43**) οδηγεί στη μεγαλύτερη αναστολή που παρατηρήθηκε συγκριτικά με τις υπόλοιπες ενώσεις που αξιολογήθηκαν σε αυτή την ενότητα.

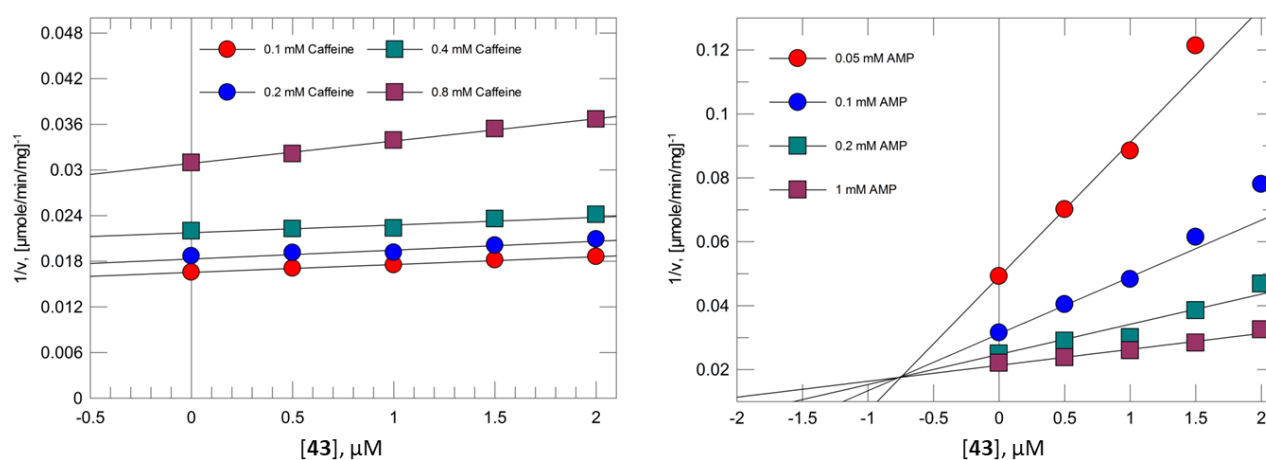
Πίνακας 46: Παρουσιάζονται οι σταθερές αναστολής για τα ανάλογα χρυσίνης που μελετήθηκαν σε αυτή την ενότητα ως προς την GP. Επιπλέον, αναγράφεται η αρίθμηση που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα κρυσταλλογραφίας.

Ένωση	K _i [μM]			Ένωση	K _i [μM]		
	rmGPb	rmGPa	hlGPa		rmGPb	rmGPa	hlGPa
 Χρυσίνη	7.6 ± 0.8	5.1 ± 0.1	7.3 ± 0.1	 11	1.9 ± 0.1	2.3 ± 0.1	3.4 ± 0.2
 1	14 % *	-	-	 20	2.3 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.9 ± 0.1
 2	16 % *	-	-	 43	1.0 ± 0.1	1.8 ± 0.2	2.2 ± 0.1
 9	7.3 ± 0.6	8.6 ± 0.6	7.4 ± 0.1	 52	11.4 ± 0.4	17.8 ± 2.4	21.4 ± 1.0
 10	27 % *	-	-				

* Η επί τοις εκατό αναστολή υπολογίστηκε σε 100 μM αναστολέα ως προς δείγμα ελέγχου.

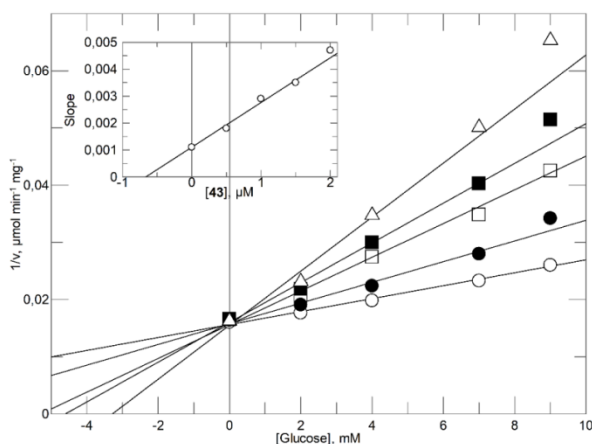
Για να ταυτοποιήσουμε το κέντρο πρόσδεσης των ενώσεων **11**, **20**, **43** και **52**, μελετήσαμε τη κινητική συμπεριφορά του αναστολέα **43** παρουσία καφεΐνης η οποία προσδένεται στο κέντρο αναστολής και παρουσία της AMP η οποία προσδένεται στο αλλοστερικό κέντρο (Βλ.

παραγράφους 4.1.5.3.1 και 4.7.1.5). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σε διαγράμματα Dixon από τα οποία μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο αναστολέων [287]. Στις μελέτες που έγιναν ως προς την καφεΐνη, το διάγραμμα Dixon έδωσε ένα πρότυπο παράλληλων γραμμών (Διάγραμμα 2) δηλώνοντας ότι υπάρχει συναγωνισμός του αναστολέα και της καφεΐνης ως προς το κέντρο αναστολής [287]. Στις μελέτες που έγιναν ως προς την AMP, το διάγραμμα Dixon έδωσε ευθείες οι οποίες τέμνονταν μεταξύ τους (Διάγραμμα 2) δηλώνοντας ότι αυτές οι δύο ενώσεις μπορούν να συνδεθούν ταυτόχρονα στο ένζυμο [287]. Το αποτέλεσμα αυτά προτείνουν ότι οι υπό μελέτη ενώσεις προσδένονται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου.



Διάγραμμα 2: Παρουσιάζονται τα διαγράμματα Dixon. **Αριστερά:** Συναγωνισμός του αναστολέα 43 με την καφεΐνη για την σύνδεση στο κέντρο αναστολής. **Δεξιά:** Μη συναγωνισμός του αναστολέα 43 με την AMP για το αλλοστερικό κέντρο.

Έπειτα, ερευνήσαμε με κινητικές μελέτες εάν η πρόσδεση του 43 στη GPb αλληλεπιδρά με την πρόσδεση της γλυκόζης όπως συμβαίνει με την καφεΐνη [88], η οποία εμφανίζει μια σταθερά αλληλεπίδρασης $\alpha = 0.2$ [88].



Διάγραμμα 3: Αναστολή της *rmGPb* από την ένωση 43 παρουσία γλυκόζης. Παρουσιάζεται το διάγραμμα Dixon και στο ένθετο ένα διάγραμμα της κλίσης κάθε ευθείας (*slope*) ως προς τη συγκέντρωση του 43 από όπου υπολογίζεται η σταθερά αλληλεπίδρασης του αναστολέα 43 με τη γλυκόζη. Οι συγκεντρώσεις του 43 που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0 (○), 0.5 (●), 1.0 (□), 1.5 (■) και 2 μM (Δ).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων σε διάγραμμα Dixon έδωσε ευθείες οι οποίες τέμονταν μεταξύ τους αριστερά του άξονα yy' (Διάγραμμα 3). Επομένως, πρόσδεση του **43** αλληλεπιδρά με τη γλυκόζη με συνεργιστικό τρόπο με σταθερά αλληλεπίδρασης $\alpha = 0.65$. Αυτό σημαίνει ότι η γλυκόζη και ο **43** είναι ικανοί να προσδένονται στο ένζυμο συγχρόνως [287] και η σύνδεση του ενός να προάγει τη σύνδεση του άλλου όπως συμβαίνει με την καφεΐνη και τη γλυκόζη [88] αλλά και με το ελλαγικό οξύ και την γλυκόζη [92].

Κρυσταλλογραφία ακτίνων-X

Ο προσδιορισμός του τρόπου πρόσδεσης των υπό μελέτη ενώσεων στη GP έγινε με χρήση κρυστάλλων της *rmGPb*, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως (Βλ. παράγραφο 4.8.2). Πιο συγκεκριμένα οι κρύσταλλοι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 10 mM BES pH 6.7, 25 % *v/v* DMSO και αναστολέα. Παρακάτω αναφέρονται οι συγκεντρώσεις του κάθε αναστολέα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και ο χρόνος επώασης του κρυστάλλου με το διάλυμα πριν τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων:

- **20**: 10 mM, 38 h
- **43**: 10 mM, 24 h
- **52**: 10 mM, 47 h

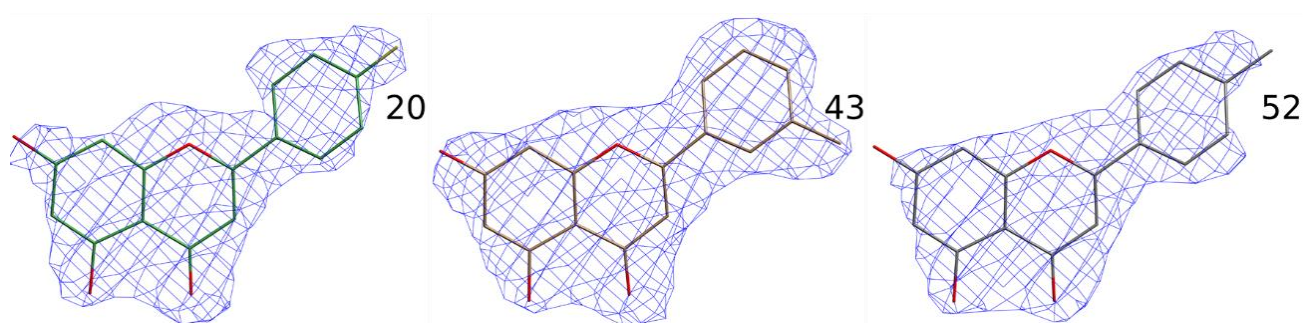
Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε σε συμβατή πηγή ακτίνων-X (CuK α) με το σύστημα περίθλασης Oxford Diffraction SuperNova όπως αναλύεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο (Βλ. παράγραφο 4.8.2). Τα στατιστικά που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων περίθλασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 47. Προσδιορίστηκε η κρυσταλλική δομή της *rmGPb* σε σύμπλοκο με τους αναστολείς **20**, **43** και **52** ώστε να μπορέσουμε να εξηγήσουμε την ισχυρή αναστολή που προκαλούν στο ένζυμο. Οι τρεις ενώσεις βρέθηκαν όπως ήταν αναμενόμενο συνδεδεμένες στο κέντρο αναστολής του ενζύμου με τα άτομα των αναστολέων να εντοπίζονται καλά στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας (Εικόνα 66).

Οι αναστολείς προσδένονται με παρόμοιο τρόπο τόσο μεταξύ τους όσο και ως προς τη χρυσίνη [89] και τη φλαβοπιριδόλη [70]. Η τιμή *r.m.s.d.* μεταξύ των συμπλόκων **20**, **43**, **52** και της ελεύθερης από αναστολείς *rmGPb* για τα καλά καθορισμένα κατάλοιπα (18-249, 262-312, 326-829) ήταν 0.8 Å κάτι το οποίο δηλώνει ότι η πρόσδεση των αναστολέων δεν προκαλεί κάποια σημαντική μεταβολή στην ολική διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Οι δακτύλιοι A και C (Πίνακας 46) τοποθετούνται μεταξύ των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων της Phe285 και της Tyr613 σχηματίζοντας παράλληλες αλληλεπιδράσεις π-επιστοίβαξης (Εικόνα 67). Το

άτομο του φθορίου του **20** βρίσκεται σε απόσταση 3.1 Å από το άτομο *NH1* της πλευρικής αλυσίδας της *Arg770* και 3.2 Å από το άτομο *OE2* της πλευρικής αλυσίδας της *Glu382* με αποτέλεσμα να σχηματίζει δύο δεσμούς φθορίου [288]. Σε όλες τις δομές των συμπλόκων, δύο αλληλεπιδράσεις του ατόμου της υδροξυλομάδας (*O4*, Πίνακας 46) των αναστολέων με τα άζωτα των κύριων αλυσίδων των καταλοίπων *Pro611* και *Gly612* γεφυρώνονται από μόρια ύδατος (Εικόνα 67). Επιπλέον δύο αλληλεπιδράσεις του ατόμου του οξυγόνου (*O7*, Πίνακας 46) της καρβονυλομάδας των αναστολέων με το άζωτο και του οξυγόνου του καρβονυλίου της κύριας αλυσίδας της *Asp283* γεφυρώνονται επίσης από μόρια ύδατος (Εικόνα 67).

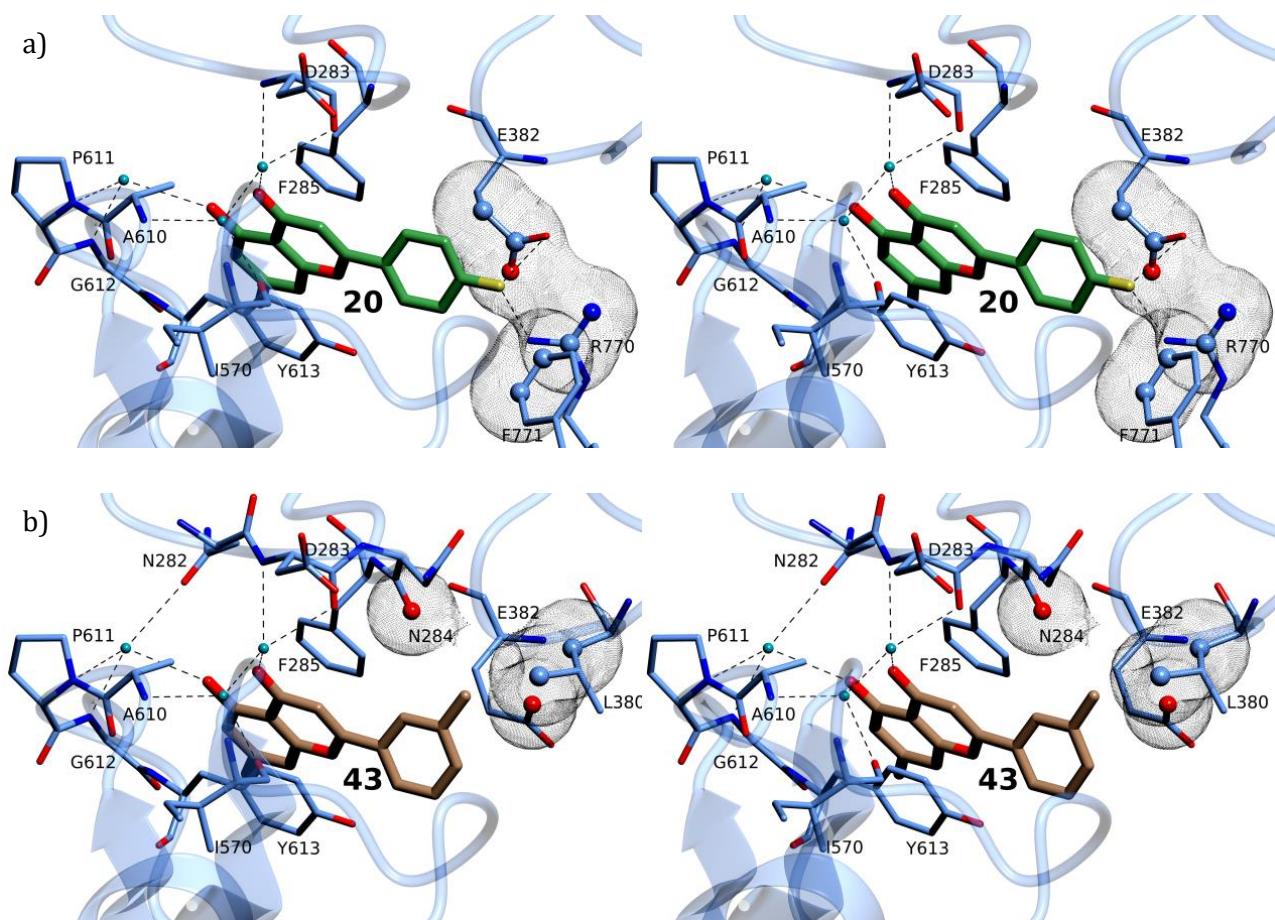
Πίνακας 47: Σύνοψη των στατιστικών παραμέτρων από την επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης και τη διαδικασία της βελτιστοποίησης για τα σύμπλοκα της *rmGPb* με τους αναστολείς. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

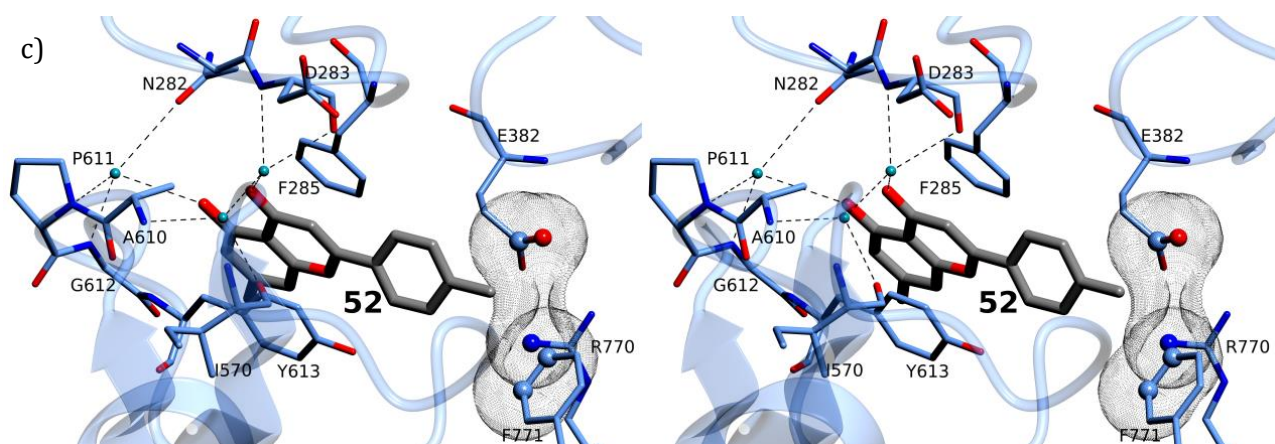
Σύμπλοκο <i>rmGPb</i>	20	43	52
Στατιστικοί δείκτες συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων			
Ευκρίνεια (Å)	13.74 - 2.33	13.67 - 2.38	13.68 - 2.40
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2.42 - 2.33	2.47 - 2.38	2.49 - 2.40
Ανακλάσεις	175524	200647	164680
Μοναδικές ανακλάσεις	38529 (3446)	34581 (3009)	34314 (3151)
Πολλαπλότητα	4.6 (3.1)	5.8 (4.3)	4.8 (3.4)
R_{merge}	0.085 (0.596)	0.095 (0.570)	0.101 (0.623)
Πληρότητα (%)	92.6 (80.3)	90.1 (75.7)	91.2 (80.2)
$\langle I/\sigma I \rangle$	10.7 (1.7)	11.3 (1.9)	10.7 (1.4)
$CC^{1/2}$	0.991 (0.768)	0.995 (0.840)	0.988 (0.754)
Στατιστικοί δείκτες βελτιστοποίησης			
R_{cryst}	0.164 (0.256)	0.157 (0.238)	0.168 (0.264)
R_{free}	0.212 (0.294)	0.211 (0.244)	0.211 (0.301)
Αριθμός μορίων διαλύτη	241	227	244
Απόκλιση r.m.s. από τις ιδεατές τιμές			
Μήκος δεσμών (Å)	0.005	0.004	0.003
Γωνίες (°)	1.3	1.2	0.9
Μέση τιμή παράγοντα θερμικής κίνησης (Å²)			
Άτομα πρωτεΐνης	28.8	31.5	27.1
Μόρια διαλύτη	29.1	29.2	24.2
Άτομα αναστολέα	49.7	41.4	50.7
PDB entry	6Y5C	6Y55	6Y50



Εικόνα 66: Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ που υπολογίστηκαν για τις ενώσεις **20**, **43** και **52** οι οποίες προσδένονται στο κέντρο αναστολής. Οι χάρτες ήταν προσαρμοσμένοι σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των αναστολέων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Συνολικά, ο **20** σχηματίζει 101 (58 μη-πολικές/μη-πολικές, 6 πολικές/πολικές και 37 μη-πολικές/πολικές) αλληλεπιδράσεις *van der Waals* κυρίως με τα κατάλοιπα *Phe285*, *Tyr613* (64 αλληλεπιδράσεις) και με τα κατάλοιπα *Asn282*, *Glu382*, *His571*, *Ala610*, *Gly612* και *Arg770*, *Phe771* (Εικόνα 67). Ο **43** σχηματίζει 91 (58 μη-πολικές/μη-πολικές, 4 πολικές/πολικές και 29 μη-πολικές/πολικές) αλληλεπιδράσεις *van der Waals* κυρίως με τα κατάλοιπα *Phe285*, *Tyr613* (64 αλληλεπιδράσεις) και με τα κατάλοιπα *Asn282*, *Asn284*, *Leu380*, *Glu382*, *Glu572*, *Ala610*, *Gly612* και *Arg770* (Εικόνα 67). Ο **52** σχηματίζει 89 (55 μη-πολικές/μη-πολικές, 4 πολικές/πολικές και 30 μη-πολικές/πολικές) αλληλεπιδράσεις *van der Waals* κυρίως με τα κατάλοιπα *Phe285*, *Tyr613* (59 αλληλεπιδράσεις) και τα κατάλοιπα *Asn282*, *Asn284*, *Glu382*, *His571*, *Glu572*, *Ala610*, *Gly612*, *Arg770*, και *Phe771* (Εικόνα 67). Το άτομο του φθορίου του **20** συμμετέχει σε 7 (2 πολικές/πολικές και 5 πολικές/μη-πολικές) αλληλεπιδράσεις *van der Waals* με τα κατάλοιπα *Glu382*, *Arg770* και *Phe771* (Εικόνα 67). Η μεθυλομάδα του **43** συμμετέχει σε 4 (2 μη-πολικές/μη-πολικές και 2 μη-πολικές/πολικές) αλληλεπιδράσεις *van der Waals* με τα κατάλοιπα *Asn284*, *Leu380* and *Glu382* (Εικόνα 67). Η μεθυλομάδα του **52** συμμετέχει σε 5 (3 μη-πολικές/μη-πολικές και 2 μη-πολικές/πολικές) αλληλεπιδράσεις *van der Waals* με τα κατάλοιπα *Glu382*, *Arg770* και *Phe771* (Εικόνα 67).



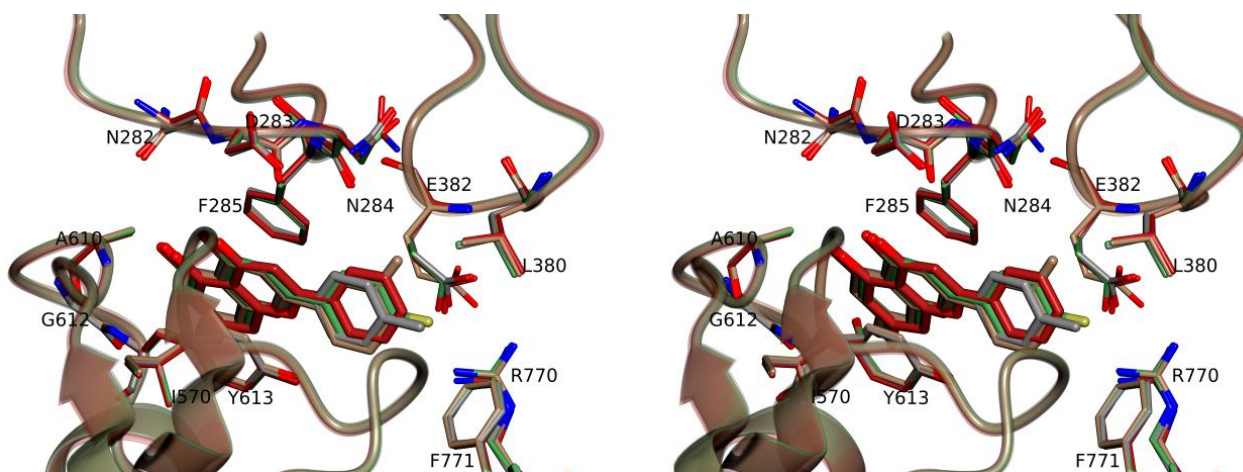


Εικόνα 67: Στέρεο-απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούν οι αναστολείς α) **20** β) **43** και γ) **52** στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Οι αναστολείς παρουσιάζονται ως χοντροί κύλινδροι, τα μόρια ύδατος ως κυανές σφαίρες, οι δεσμοί υδρογόνου ως διακεκομμένες γραμμές και οι αλληλεπιδράσεις *van der Waals* που δημιουργούν οι υποκαταστάτες του δακτυλίου B ως νέφος από κουκκίδες.

Η εκτεθειμένη επιφάνεια των **20**, **43** και **52** είναι 432, 450 και 448 Å². Όταν αυτοί προσδένονται στην πρωτεΐνη, οι τιμές αυτές μειώνονται σε 83, 88 και 91 Å² υποδεικνύοντας ότι το 80 % περίπου της επιφάνειας τους επικαλύπτεται. Η μεγαλύτερη συνεισφορά είναι από τα μη-πολικά κατάλοιπα της *rmGPb* τα οποία συνεισφέρουν το 77 %, 81 % και 86% της επιφάνειας των **20**, **43** και **52** αντίστοιχα, η οποία επικαλύπτεται κατά τη σύνδεση τους.

Σύγκριση της δομής των συμπλόκων των τριών αναστολέων δείχνει ότι ενώ οι **20** και **43** προσδένονται στην ίδια περιοχή του κέντρου αναστολής της *rmGPb*, η περιοχή πρόσδεσης του **52** διαφέρει κατά 0.4 Å και έτσι είναι πιο εκτεθειμένος στο διαλύτη (ή λιγότερο θαμμένος στο εσωτερικό της δομής της πρωτεΐνης, Εικόνα 68). Η σημαντική διαφορά στις σταθερές αναστολής μεταξύ των **20** και **52** (Πίνακας 46) μπορεί να αποδοθεί στους δύο δεσμούς φθορίου και στις 12 παραπάνω αλληλεπιδράσεις *van der Waals* που σχηματίζει ο **20** σε σύγκριση με τον **52**. Παρότι ο **20** σχηματίζει δύο δεσμούς φθορίου και 10 παραπάνω αλληλεπιδράσεις *van der Waals* από τον αναστολέα **43**, οι δύο αναστολείς εμφανίζουν παρόμοιες σταθερές αναστολής (Πίνακας 46). Η παρουσία της μεθυλομάδας στον αναστολέα **43** επάγει μια μικρή αλλά σημαντική αλλαγή της διαμόρφωσης της *Glu382* (η τιμή της *r.m.s.d.* μεταξύ των δύο διαμορφώσεων είναι 1.1 Å), συγκριτικά με τα άλλα δύο σύμπλοκα (η τιμή της *r.m.s.d.* μεταξύ των δύο διαμορφώσεων είναι 0.2 Å), με την πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου να προβάλλει προς το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Επιπλέον, η μεθυλομάδα του **43** δημιουργεί δύο μη-πολικές αλληλεπιδράσεις *van der Waals*, συγκριτικά με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, με το κατάλοιπο *Leu380* το οποίο αποτελεί βασικό δομικό συστατικό του υδρόφοβου κέντρου αναστολής. Φαίνεται πως η αλλαγή της διαμόρφωσης της *Glu382* και οι μη-πολικές αλληλεπιδράσεις *van der Waals* του **43** με την *Leu380* σταθεροποιούν τον βρόχο

380s και ακολούθως το ένζυμο στην ανενεργή στερεοδιαμόρφωση -T με αποτέλεσμα να αντισταθμίζονται η επίδραση των δεσμών φθορίου του **20** και το ενεργειακό κόστος από τη δομική μεταβολή της *Glu382*. Υπέρθωση των δομών των τριών συμπλόκων στο σύμπλοκο της *rmGPb*-χρυσίνης [89] (Εικόνα 68) δείχνει ότι παρότι η πρόσδεση της χρυσίνης είναι παρόμοια με τους τρεις νέους αναστολείς, η χωροθέτηση της διαφέρει κατά 0.4, 0.6 και 0.8 Å από αυτή των **20**, **43** και **52**, αντίστοιχα. Η χρυσίνη, κατά τη πρόσδεση της στην *rmGPb* σχηματίζει 96 (54 μη-πολικές/μη-πολικές, 4 πολικές/πολικές και 38 πολικές/μη-πολικές) αλληλεπιδράσεις *van der Waals* και δύο αλληλεπιδράσεις που γεφυρώνονται από μόρια ύδατος [89]. Η διαφορά στις σταθερές αναστολής μεταξύ της χρυσίνης και του **20** μπορεί να σχετίζεται με τους δεσμούς φθορίου που δημιουργεί ο **20**. Τέλος, η διαφορά στις σταθερές αναστολής μεταξύ της χρυσίνης και του **43** φαίνεται πως και πάλι σχετίζεται με την αλλαγή της διαμόρφωσης της *Glu382* και τις μη-πολικές αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει η μεθυλομάδα του **43** με το κατάλοιπο *Leu380*, όπως αναλύθηκε παραπάνω.



Εικόνα 68: Στέρεο-απεικόνιση της υπέρθεσης των συμπλόκων των **20** (πράσινο), **43** (καφέ) και **52** (γκρι) στο σύμπλοκο της *rmGPb*-χρυσίνη [89].

Η ένωση **43** έχει υποβληθεί και σε *ex vivo* μελέτες ώστε να προσδιοριστεί αν μπορεί να αναστείλει την *GP* σε ηπατοκύτταρα *HepG2* στα οποία η γλυκογονόλυση είχε διεγερθεί από γλυκαγόνη [151]. Η ένωση **43** έχει την ικανότητα να αναστέλλει το ένζυμο με τιμή της IC_{50} ίση με 70 μM , προτείνοντας ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε *in vivo* μελέτες [151].

Συμπεράσματα

- Ανάλογα χρυσίνης ($K_i = 7.6 \mu M$) μελετήθηκαν με κινητικές και δομικές μελέτες ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την *GP*.
- Κινητικές μελέτες ως προς την *rmGPb* έδειξαν ότι οι αναστολείς **11** ($K_i = 1.9 \mu M$), **20** ($K_i = 2.3 \mu M$) και **43** ($K_i = 1.0 \mu M$) είναι από τους πιο ισχυρούς για το κέντρο αναστολής

που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα αλλά και πιο ισχυροί από οποιοδήποτε άλλο φυσικό φλαβονοειδές.

- Κινητικές μελέτες έδειξαν ότι οι αναστολές προσδένονται στο κέντρο αναστολής και η εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ επιβεβαίωσε αυτό το αποτέλεσμα.
- Η επίλυση των δομών των συμπλόκων της *rmGPb* με τους αναστολές αποκάλυψε τις αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε αυξημένη αναστολή. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται αλληλεπιδράσεις που δημιουργούν τα άτομα αλογόνου του δακτυλίου B που βρίσκονται στις θέσεις 3' και 4' αλλά πιο σημαντική αποτελεί η υποκατάσταση της θέσης -πάρρα του δακτυλίου B από μια ομάδα μεθυλίου.
- Η βελτιστοποίηση του φαρμακολογικού δυναμικού των ενώσεων μπορεί να περιλαμβάνει την τροποποίηση των A ή C δακτυλίων με προσθήκη υποκαταστατών. Η αυξημένη ισχύς της φλαβοπιριδόλης έναντι της χρυσίνης, με υποκαταστάτες στο δακτύλιο A ενισχύει αυτή την υπόθεση [89, 90].

5.4. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΕΝΖΥΜΟ ΑΠΟΔΙΑΚΛΑΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ (*hGDE*)

Μέχρι το 2016 δεν υπήρχε διαθέσιμη κρυσταλλική δομή για ευκαρυωτικό *GDE*. Όπως έχουμε αναφέρει και στην εισαγωγή, το ευκαρυωτικό *GDE* είναι ένα διλειτουργικό ένζυμο που αποτελείται από μια περιοχή α-1,4 γλυκοτρανσφεράσης και μια περιοχή α-1,6 γλυκοζιτάσης. Οι *Zhai, L.*, και συνεργάτες [44] προσδιόρισαν τη δομή του *Candida glabrata GDE* και έδειξαν ότι το ένζυμο έχει μια επιμήκη δομή με τα δύο καταλυτικά κέντρα να βρίσκονται στις δύο άκρες του ενζύμου [44], όπως είχε προταθεί προηγουμένως για το *rmGDE* [104]. Η *GP* απουσία του *GDE* μπορεί να καταναλώσει μόνο το 30 % του γλυκογόνου, καθώς η δράση της σταματάει τέσσερα κατάλοιπα γλυκόζης πριν από μια α-1,6 διακλάδωση [103]. Το υπόλοιπο 70 % μπορεί να καταναλωθεί μόνο μετά τη δράση του *GDE* [103] το προϊόν της αντίδρασης του οποίου είναι ελεύθερη γλυκόζη. Δεδομένου ότι η *GP* αποτελεί έναν φαρμακευτικό στόχο για τη διαχείριση του ΣΔ2 [29], η εύρεση φαρμάκων που θα αναστέλλουν το *GDE* ή και τα δύο ένζυμα αποτελεί μια υποσχόμενη προσέγγιση για την αναστολή της γλυκογονόλυσης στον ΣΔ2 που θα οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα των ασθενών όπως έχει προταθεί για την *GP* από *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* μελέτες. Ωστόσο, εκτός από δύο αναφορές στη βιβλιογραφία, που αφορούν την παραγωγή του ανθρώπινου *GDE* σε έντομα [115] και σε ρίζες του φυτού *N. Benthamiana* [116], δεν υπάρχουν πληροφορίες για τον βιοχημικό και δομικό χαρακτηρισμό του ενζύμου. Ο βιοχημικός και δομικός χαρακτηρισμός του ανθρώπινου *GDE*

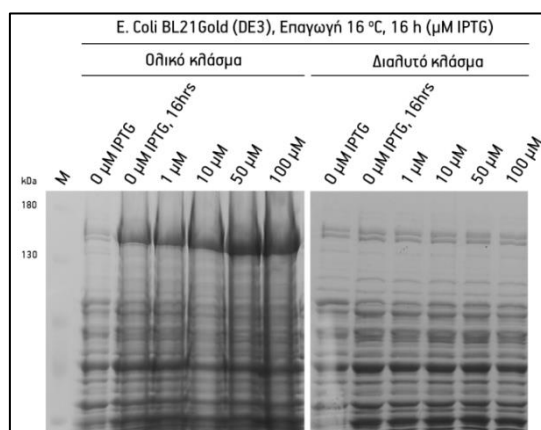
δεν είναι ελκυστικός μόνο για φαρμακευτικούς σκοπούς καθώς η μελέτη του θα μας δώσει νέα στοιχεία για τη συμμετοχή του στο μεταβολισμό του κυττάρου καθώς έχει βρεθεί επίσης να εμπλέκεται στη βιολογία του καρκίνου [103, 128, 129].

Η παραγωγή διαλυτού *CgGDE* στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης *E. coli* [44] μας προέτρεψε να χρησιμοποιήσουμε το ίδιο σύστημα για την παραγωγή του *hGDE*, ωστόσο, η απουσία βιβλιογραφίας για παραγωγή *hGDE* στο σύστημα *E. coli* μας θορύβησε ως προς τα προβλήματα που θα ήταν πιθανό να συναντήσουμε κατά την πορεία παραγωγής διαλυτής πρωτεΐνης. Όπως έχει αναφερθεί στη παράγραφο 4.1.1, το πιο σύνηθες πρόβλημα είναι η αδυναμία έκφρασης του γονιδίου στόχου από το *E. coli* κάτι το οποίο έχει άμεση σχέση με τον αριθμό των σπάνιων κωδικονίων στην αλληλουχία. Για το λόγο αυτό έγινε σύνθεση της βελτιστοποιημένης αλληλουχίας για το *E. coli* από την εταιρεία *GenScript* ώστε να αντικατασταθούν τα σπάνια κωδικόνια με άλλα πιο φιλικά για το *E. coli* χωρίς όμως να αλλάξει η αλληλουχία της πρωτεΐνης που θα παραχθεί. Στο παράρτημα (Στοιχισή 3), παρουσιάζεται η βελτιστοποιημένη αλληλουχία σε στοιχισή με τη φυσιολογική καθώς και ένα διάγραμμα με τη συχνότητα χρήσης των κωδικονίων πριν και μετά τη βελτιστοποίηση. Η διαδικασία της βελτιστοποίησης της αλληλουχίας εξασφαλίζει την επιτυχή έκφραση του γονιδίου στόχου αλλά όχι και τη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης και ως εκ τούτου την παραγωγή της στο διαλυτό κλάσμα. Διάφοροι τρόποι με τους οποίους μπορεί να υπερκερασθεί αυτό το εμπόδιο αναγράφονται στην παράγραφο 4.1.1.1.2. Επιλέξαμε να γίνει κλωνοποίηση της βελτιστοποιημένης αλληλουχίας σε φορέα έκφρασης *pET26b* στα σημεία που αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα *NdeI/XhoI* για αναδίπλωση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα και από τα περιοριστικά ένζυμα *NcoI/XhoI* για αναδίπλωση της πρωτεΐνης στο περιπλασματικό χώρο ή έκκρισης της στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των βακτηρίων.

5.4.1. Δοκιμές έκφρασης – Διαρρέον πλασμίδιο

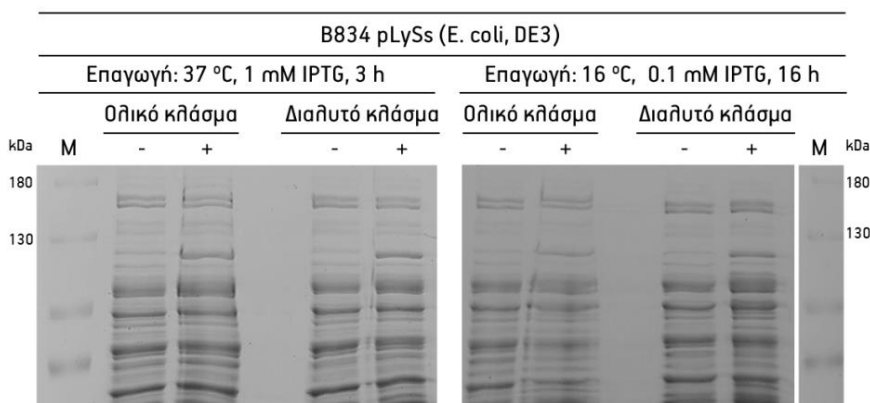
Αρχικά, ξεκινήσαμε ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι το γονίδιο όντως εκφράζεται σε υψηλά ποσοστά και να ελέγξουμε αν παράγεται διαλυτή πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου χρησιμοποιώντας το βακτηριακό στέλεχος *BL21Gold (DE3)*. Κρατήσαμε ένα δείγμα από την καλλιέργεια πριν την προσθήκη του *IPTG* και η επαγωγή της υπερέκφρασης έγινε σε θερμοκρασία 16 °C για 16 h παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων *IPTG*. Ακολουθήσαμε τη διαδικασία όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.6.1.1 και τα δείγματα αναλύθηκαν σε *SDS-PAGE* (Εικόνα 69). Παρατηρήσαμε ότι στις ~4 h που χρειάστηκαν για να αναπτυχθούν τα

βακτήρια δεν υπήρξε παραγωγή *hGDE* χωρίς την προσθήκη του *IPTG*. Ωστόσο, μεγάλες ποσότητες *hGDE* παρήχθησαν στο ολικό κλάσμα σε 16 h χωρίς την προσθήκη *IPTG*, ένα φαινόμενο που ονομάζεται διαρρέον πλασμίδιο (*leaky plasmid*) και είναι αρκετά κοινό όταν γίνεται χρήση των φορέων έκφρασης *pET* (βλ. παράγραφο 4.1.1). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης (Εικόνα 69) κάτι το οποίο μπορεί να οφείλεται στο διαρρέον πλασμίδιο καθώς πολλές φορές τοξικές για το *E. coli* πρωτεΐνες οδηγούνται σε έγκλειστα σώματα. Επομένως, είναι απαραίτητο να υπάρχει αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου στόχου.



Εικόνα 69: Δοκιμή έκφρασης του *hGDE* σε στέλεχος *BL21Gold (DE3)*. Ως ολικό κλάσμα αναφέρουμε τα διαλυτοποιημένα κύτταρα στα οποία έχει επέλθει λύση με εφαρμογή υπερήχων. Ως διαλυτό κλάσμα αναφέρουμε το δείγμα που προήλθε μετά από φυγοκέντρηση στο ολικό κλάσμα. Η έκφραση του γονιδίου επάγεται ακόμα και χωρίς την προσθήκη του *IPTG*. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη παρουσιάζεται στο ολικό κλάσμα και όχι στο διαλυτό.

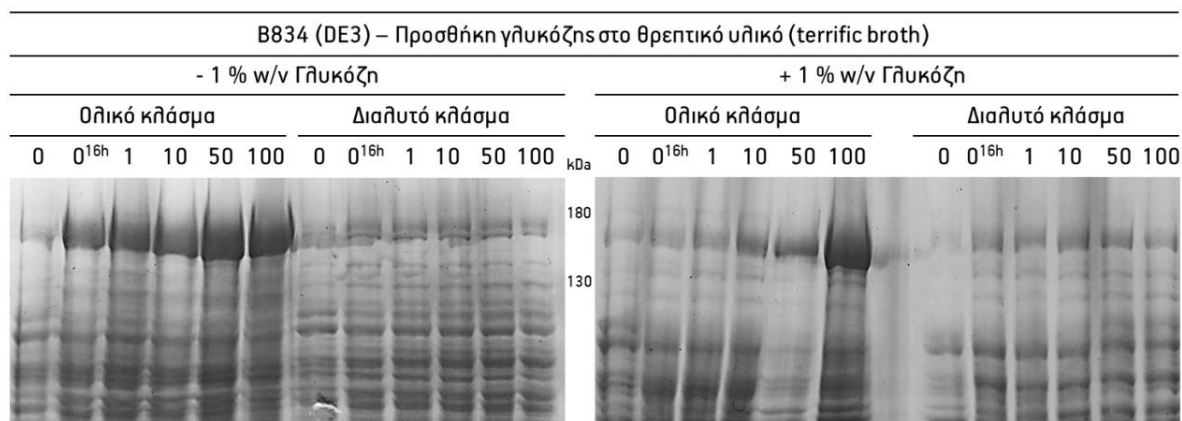
Για να ρυθμίσουμε το σύστημα έκφρασης μπορούμε είτε να χρησιμοποιήσουμε τα στελέχη *B834pLysS (DE3)* είτε να προσθέσουμε στο θρεπτικό υλικό γλυκόζη (βλ παράγραφο 4.1.1).



Εικόνα 70: Δοκιμή ρύθμισης του συστήματος έκφρασης σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* στελέχους *B834pLysS*. Δεν παρατηρείται παραγωγή πρωτεΐνης ούτε στο ολικό ούτε στο διαλυτό κλάσμα, προτείνοντας ότι δεν εκφράζεται το γονίδιο που κωδικοποιεί το *hGDE*. Ως ολικό κλάσμα αναφέρουμε τα διαλυτοποιημένα στα οποία έχει επέλθει λύση με εφαρμογή υπερήχων. Ως διαλυτό κλάσμα αναφέρουμε το δείγμα που προήλθε μετά από φυγοκέντρηση στο ολικό κλάσμα.

Η χρήση του στελέχους *B834pLysS (DE3)* δεν οδήγησε σε παραγωγή πρωτεΐνης ούτε στο ολικό ούτε στο διαλυτό κλάσμα, σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, χωρίς να μπορούμε να

προσδιορίσουμε το λόγο που συνέβη αυτό. Ακολουθώντας, δοκιμάσαμε να ρυθμίσουμε το σύστημα έκφρασης με προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των βακτηρίων. Στην Εικόνα 71 παρατηρούμε ότι η προσθήκη της γλυκόζης οδήγησε σε αυστηρή ρύθμιση του συστήματος έκφρασης και η έκφραση του γονιδίου επάγεται μόνο μετά τη προσθήκη του *IPTG* σε αναλογία με την αύξηση της συγκέντρωσης του (Εικόνα 71, ολικό κλάσμα). Ωστόσο, παρά τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου στόχου, δεν παρατηρήθηκε και πάλι παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης.

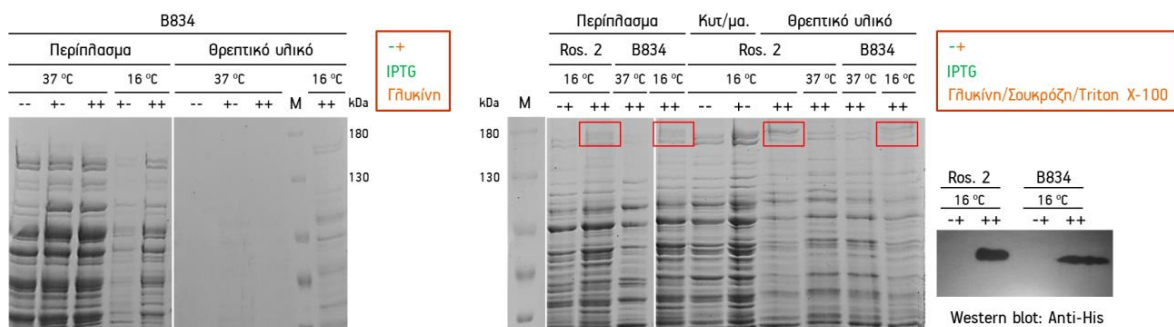


Εικόνα 71: Δοκιμή ρύθμισης του συστήματος έκφρασης σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* στελέχους B834 με προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των βακτηρίων. Παρατηρούμε ότι το σύστημα ρυθμίζεται καλά καθώς δεν υπάρχει παραγωγή *hGDE* στο ολικό κλάσμα χωρίς την προσθήκη του *IPTG*. Ωστόσο, δεν παρατηρείται παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης. Οι αριθμοί πάνω από τις θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων αναφέρονται σε μM *IPTG*. Ως «0» ορίζεται το δείγμα που συλλέχθηκε πριν την προσθήκη του *IPTG* και ως «0^{16h}» το δείγμα χωρίς *IPTG* το οποίο συλλέχθηκε μετά από 16 ώρες που έγινε η επαγωγή της υπερέκφρασης. Ως ολικό κλάσμα αναφέρουμε τα διαλυτοποιημένα στα οποία έχει επέλθει λύση με εφαρμογή υπερήχων. Ως διαλυτό κλάσμα αναφέρουμε το δείγμα που προήλθε μετά από φυγοκέντρηση στο ολικό κλάσμα.

5.4.2. Αναδίπλωση του *hGDE* στον περιπλασματικό χώρο του βακτηρίου

Από τα παραπάνω πειράματα, επειδή φάνηκε πως η πρωτεΐνη δεν αναδιπλώνεται σωστά στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου, και πριν προσπαθήσουμε να αυξήσουμε τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης εκεί, στραφήκαμε στην παραγωγή σωστά αναδιπλωμένης στον περιπλασματικό χώρο του βακτηρίου. Το περίπλασμα (για λεπτομέρειες Βλ. παράγραφο 4.1.1) είναι ο χώρος που βρίσκεται μεταξύ της εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου. Μια πρωτεΐνη που φέρει στην *N*-τελική της περιοχή μια κατάλληλη σηματοδοτική αλληλουχία μπορεί να εισέλθει στο περίπλασμα και ύστερα να αναδιπλωθεί αφού πρώτα αποκοπεί η σηματοδοτική αλληλουχία [185]. Στην περίπτωση μας, η αλληλουχία αυτή (*pelB*) παρέχεται από τον φορέα έκφρασης *pET-26b*. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών στον περιπλασματικό χώρο έχει μια σειρά από πλεονεκτήματα όπως τα μειωμένα επίπεδα πρωτεόλυσης και το γεγονός ότι ευνοείται η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Επιπλέον, είναι δυνατή η έκκριση της πρωτεΐνης στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης του βακτηρίου παρουσία γλυκίνης, *Triton X-100* και σουκρόζης [188-190]. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 72, δεν παρατηρήσαμε την μετακίνηση

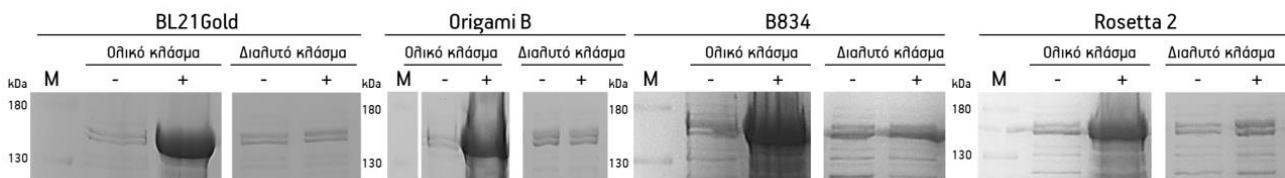
και αναδίπλωση του *hGDE* στο περίπλασμα. Μόνο όταν η επαγωγή της υπερέκφρασης έγινε παρουσία γλυκίνης, *Triton X-100* και σουκρόζης παρατηρήσαμε μια ζώνη που αντιστοιχούσε στο μοριακό βάρος του *hGDE* (Εικόνα 72, ~ 175 kDa) τόσο στο περίπλασμα όσο και στο θρεπτικό υλικό. Ανάλυση κατά *Western* χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τις *His₆* επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα μόνο για το περίπλασμα. Ωστόσο, πριν προχωρήσουμε με μελέτες σε μεγαλύτερη κλίμακα έπρεπε να γίνει έλεγχος αν η σηματοδοτική αλληλουχία έχει απομακρυνθεί από την πρωτεΐνη καθώς και αν υπάρχει λύση των βακτηριακών κυττάρων. Όμως, φαίνεται πως ποσότητα του *hGDE* δεν είναι αρκετή για δομικές μελέτες.



Εικόνα 72: Αριστερά, δεν παρατηρήθηκε παραγωγή της πρωτεΐνης στο περίπλασμα όταν η επαγωγή της υπερέκφρασης έγινε σε θερμοκρασία 37 °C ή 16 °C για 4 ή 16 ώρες αντίστοιχα. Η παρουσία γλυκίνης οδήγησε σε έκκριση πρωτεϊνών στο θρεπτικό υλικό αλλά δεν υπήρχε ζώνη που να αντιστοιχούσε στο μοριακό βάρος του *hGDE*. Δεξιά, παρατηρήθηκε ζώνη που αντιπροσώπευε το *hGDE* στο περίπλασμα και στο θρεπτικό υλικό όταν η υπερέκφραση έγινε σε θερμοκρασία 16 °C παρουσία γλυκίνης, *Triton X-100* και σουκρόζης. Ανάλυση κατά *Western* επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα για το περίπλασμα.

5.4.3. Αύξηση της ποσότητας διαλυτού *hGDE* του κυτταρόπλασμα του *E. coli*

Από τα πειράματα της προηγούμενης παραγράφου, φάνηκε ότι παράγεται μια μικρή ποσότητα του *hGDE* στο περίπλασμα του βακτηριακού κύτταρου αλλά προτού στραφούμε εντελώς προς αυτή τη κατεύθυνση, θελήσαμε να εξαντλήσουμε τις πιθανότητες παραγωγής διαλυτής πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα του *E. coli*. Αρχικά, δοκιμάσαμε διαφορετικά στελέχη *E. coli* (*BL21Gold*, *B834*, *Rosetta 2*, *Origami*). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 73, επιτεύχθηκε παραγωγή της πρωτεΐνης στο ολικό κλάσμα και όχι στο διαλυτό.



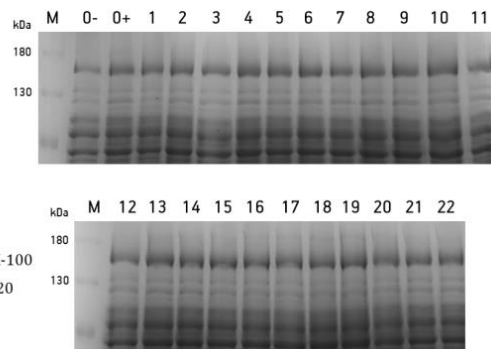
Εικόνα 73: Δοκιμές έκφρασης του *hGDE* στον κυτταροπλασματικό χώρο του *E. coli* σε διαφορετικά στελέχη. Η υπερέκφραση έγινε παρουσία 0.1 mM IPTG για 16 h σε θερμοκρασία 16 °C υπό ανακίνηση (210 rpm). Ως ολικό κλάσμα αναφέρουμε τα διαλυτοποιημένα στα οποία έχει επέλθει λύση με εφαρμογή υπερήχων. Ως διαλυτό κλάσμα αναφέρουμε το δείγμα που προήλθε μετά από φυγοκέντρηση στο ολικό κλάσμα.

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως (βλ. παράγραφο 4.1.1), οι συνθήκες λύσης των βακτηριακών κυττάρων μπορούν να επηρεάσουν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Για αυτό το

λόγο δοκιμάσαμε διαφορετικά διαλύματα λύσης των βακτηριακών κυττάρων με σκοπό να ανακτήσουμε μεγαλύτερες ποσότητες *hGDE* από το ολικό στο διαλυτό κλάσμα. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 74, η εφαρμογή διαφορετικών διαλυμάτων λύσης δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση της παραγωγής διαλυτού *hGDE*.

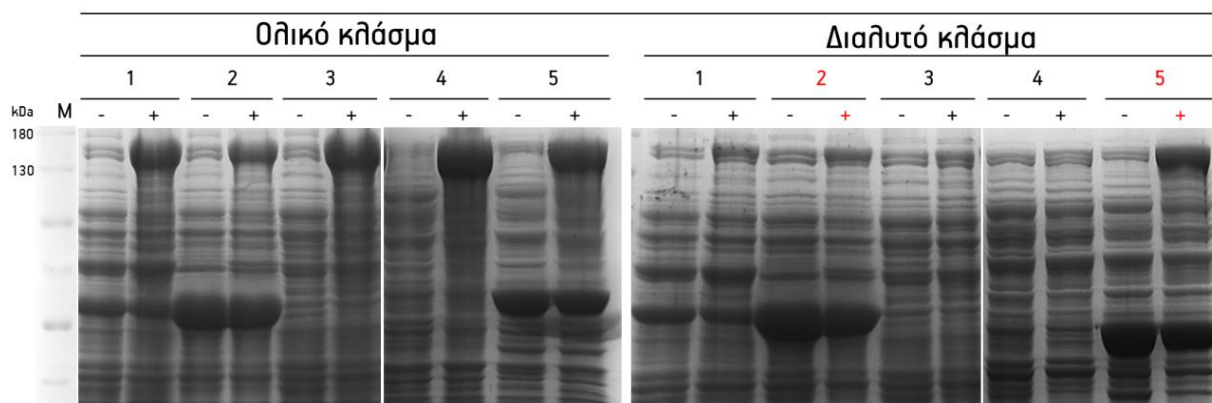
0-: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.3 M NaCl, 2mM β-Merc
 0+: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.3 M NaCl, 2mM β-Merc
 1: 50 mM Na Acetate pH 5, 50 mM NaCl
 2: 50 mM MES pH 6, 50 mM NaCl
 3: 50 mM Tris pH 7, 50 mM NaCl
 4: 50 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl
 5: 50 mM Tris pH 9, 50 mM NaCl
 6: 50 mM Tris pH 7.5, 0.1 M NaCl
 7: 50 mM Tris pH 7.5, 0.5 M NaCl
 8: 50 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl
 9: 50 mM Tris pH 7.5, 2 M NaCl
 10: 50 mM Tris pH 7.5, 0.1 M KCl

11: 10: 50 mM Tris pH 7.5, 1 M KCl
 12: 50 mM Tris pH 7.5, 0.5 M Urea, 50 mM NaCl
 13: 50 mM Tris pH 7.5, 1 M Urea, 50 mM NaCl
 14: 50 mM Tris pH 7.5, 2 M Urea, 50 mM NaCl
 15: 50 mM Tris pH 7.5, 3 M Urea, 50 mM NaCl
 16: 50 mM Tris pH 7.5, 4 M Urea, 50 mM NaCl
 17: 50 mM Tris pH 7.5, 5 M Urea, 50 mM NaCl
 18: 50 mM Tris pH 7.5, 6 M Urea, 50 mM NaCl
 19: 20mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.2% Triton X-100
 20: 20mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.2% Tween-20
 21: 20mM Tris HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 10% glycerol
 22: 20mM Tris HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 50% glycerol



Εικόνα 74: Δοκιμές βελτίωσης της διαλυτότητας του *hGDE* με χρήση διαφορετικών διαλυμάτων λύσης. **Αριστερά,** αναγράφονται τα διαφορετικά διαλύματα λύσης [196] και **Δεξιά,** η ανάλυση των δειγμάτων σε SDS-PAGE. Ως διάλυμα λύσης «0-» ή «0+» αναφέρεται αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τη λύση των κυττάρων στις παραπάνω μελέτες. Το σύμβολο - ή + δηλώνει την παρουσία (+) ή απουσία (-) IPTG.

Τέλος, στις προσπάθειες μας να επιτύχουμε την παραγωγή διαλυτού *hGDE* στο κυτταρόπλασμα του βακτηριακού κυττάρου δοκιμάσαμε συν-έκφραση με μοριακές συνοδούς οι οποίες βοηθούν την πρωτεΐνη να πάρει τη σωστή της διαμόρφωση (βλ παράγραφο 4.1.1). Δοκιμάσαμε πέντε διαφορετικά πλασμίδια τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές μοριακές συνοδούς ή συνδυασμό μοριακών συνοδών (*TaKaRa chaperone plasmid set*).



Εικόνα 75: Συνέκφραση του *hGDE* με μοριακές συνοδούς. Αύξηση της παραγωγής διαλυτής πρωτεΐνης παρατηρήθηκε με την μοριακή συνοδό *trigger factor* (πλασμίδιο 5), με τις μοριακές συνοδούς *GroES/GroEL* (πλασμίδιο 2) αλλά και με τις μοριακές συνοδούς *dnaK-dnaJ-grpE-groES-groEL* (πλασμίδιο 1). Ως ολικό κλάσμα αναφέρουμε τα διαλυτοποιημένα κύτταρα στα οποία έχει επέλθει λύση με εφαρμογή υπερήχων. Ως διαλυτό κλάσμα αναφέρουμε το δείγμα που προήλθε μετά από φυγοκέντρηση στο ολικό κλάσμα. Οι αριθμοί στην κορυφή της πηκτής αναφέρονται στην κωδική ονομασία του πλασμιδίου που κωδικοποιεί την/τις μοριακή/ές συνοδό/ούς (βλ. εικόνα 39) ενώ τα σύμβολα + και - αναφέρονται στην απουσία (-) ή παρουσία (+) του επαγωγέα της υπερέκφρασης (IPTG).

Η παραγωγή μεγάλης ποσότητας διαλυτής πρωτεΐνης επιτεύχθηκε με συν-έκφραση με τη μοριακή συνοδό *trigger factor* (πλασμίδιο 5, Εικόνα 75), με τις μοριακές συνοδούς

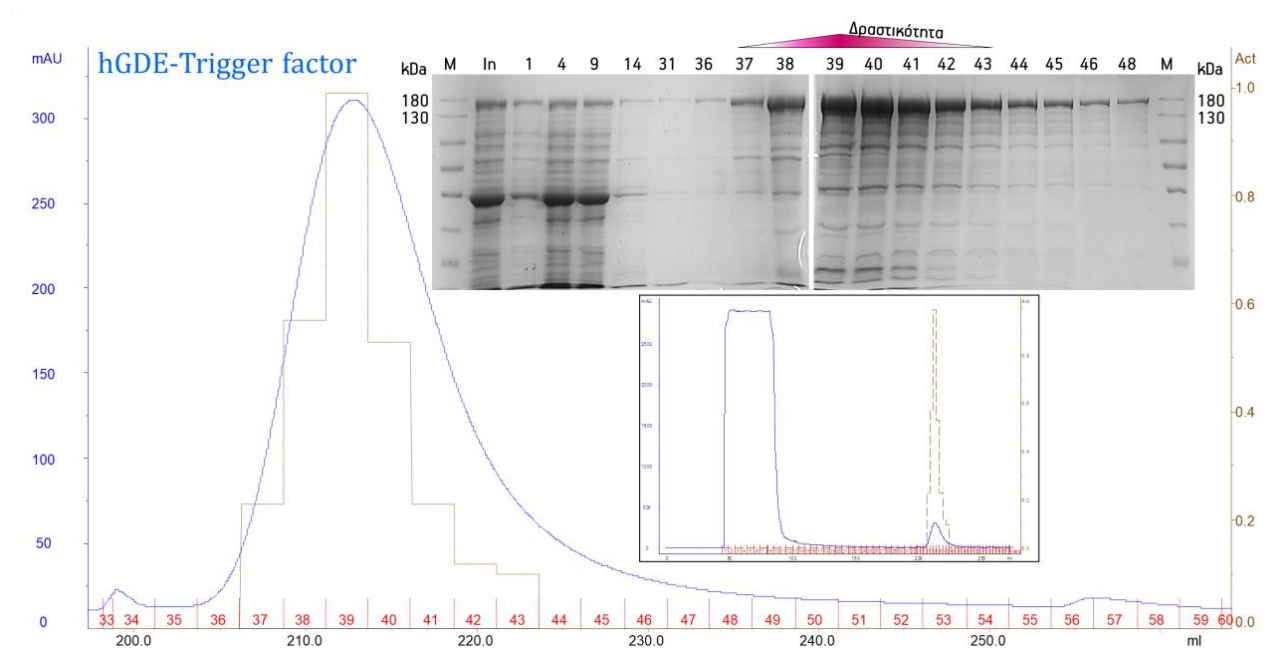
GroEs/GroEL (πλασμίδιο 2, Εικόνα 75) αλλά και με τις μοριακές συνοδούς *dnaK-dnaJ-grpE-groES-groEL* (πλασμίδιο 1, Εικόνα 75). Η συν-έκφραση με μοριακές συνοδούς όπως η *trigger factor* και οι *GroES/EL* έχει οδηγήσει με επιτυχία σε παραγωγή λειτουργικών πρωτεϊνών φαρμακευτικού ενδιαφέροντος, μεταξύ των οποίων και η *GP* του εγκεφάλου [54], με αυξημένη σταθερότητα και μειωμένη τάση δημιουργίας συσσωματωμάτων [174-177]. Ωστόσο, η παρατήρηση απλά μιας αυξημένης παραγωγής διαλυτής πρωτεΐνης σε ανάλυση *SDS-PAGE* με τη χρήση μοριακών συνοδών μπορεί να οφείλεται σε παραγωγή διαλυτών συσσωματωμάτων και όχι σε παραγωγή λειτουργικής πρωτεΐνης, κάτι το οποίο πρέπει να ελεγχθεί [179].

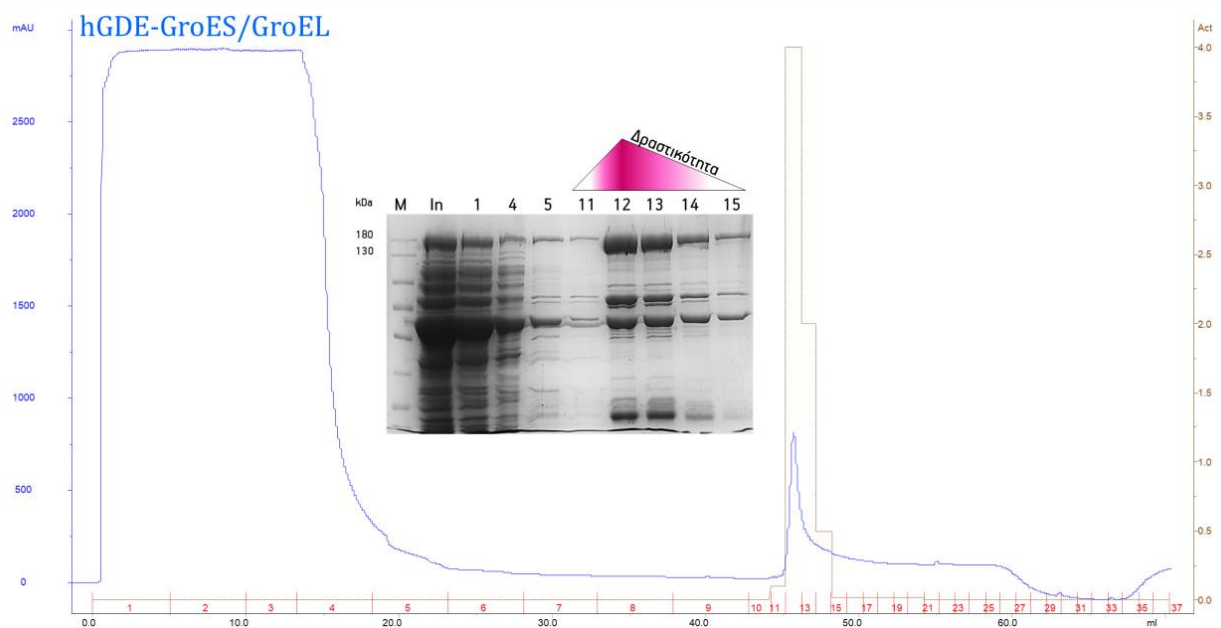
5.4.4. Απομόνωση και καθαρισμός του *hGDE*

Έγινε προσπάθεια απομόνωσης και καθαρισμού του *hGDE* που είχε παραχθεί με τη βοήθεια της μοριακής συνοδού *trigger factor* ή με τις μοριακές συνοδούς *GroES/EL*. Η διαδικασία έγινε παράλληλα και για τις δύο μοριακές συνοδούς από αρχική καλλιέργεια όγκου 750 mL. Η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων αλλά και οι διαδικασίες χειρισμού, λύσης και τα βήματα καθαρισμού αναγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 4.6.1.2.

1^ο Βήμα καθαρισμού: HisTrap FF, 5 mL (IMAC με ακινητοποιημένα Ni²⁺, GE HealthCare)

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από την *FPLC* αναλύθηκαν σε *SDS-PAGE* και ακολούθησαν δοκιμές δραστηριότητας σε αυτά που περιείχαν το *hGDE* (βλ. παράγραφο 4.7.2.4). Στην Εικόνα 76, παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα, οι αναλύσεις *SDS-PAGE* καθώς και οι δοκιμές δραστηριότητας. Οι δοκιμές δραστηριότητας αποτυπώνονται τόσο στο δεξί άξονα των χρωματογραφήματων, όσο και πάνω από την ανάλυση *SDS-PAGE* για λόγους ευκολίας.



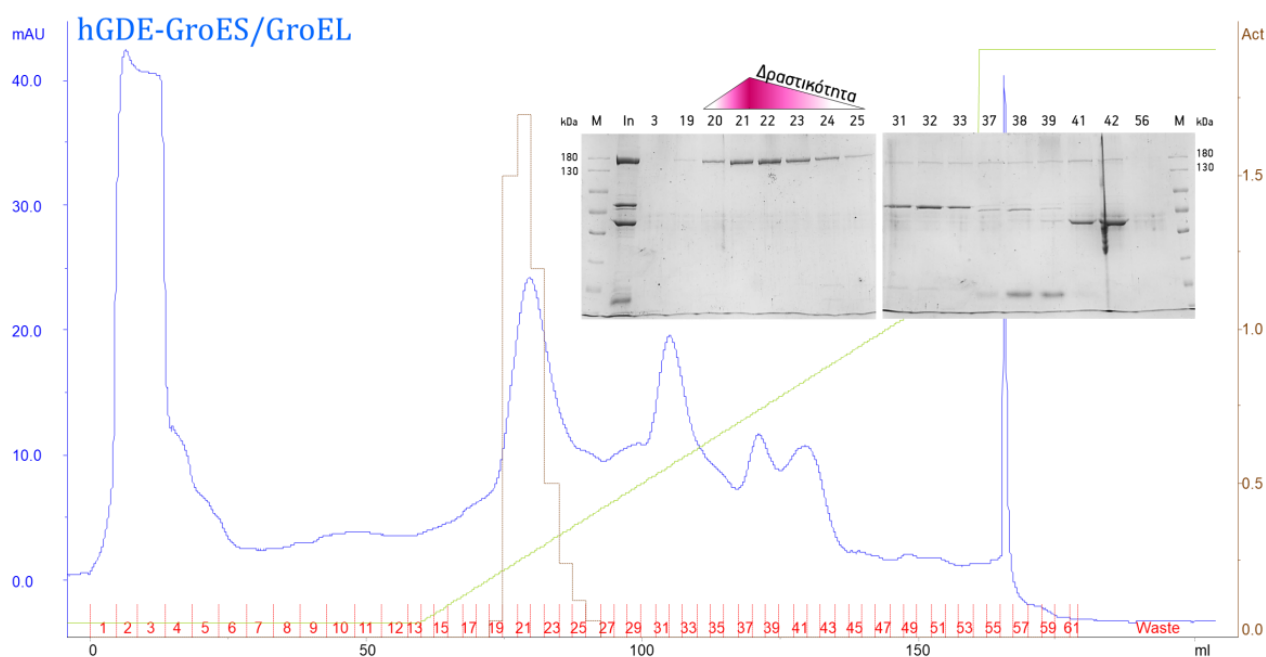
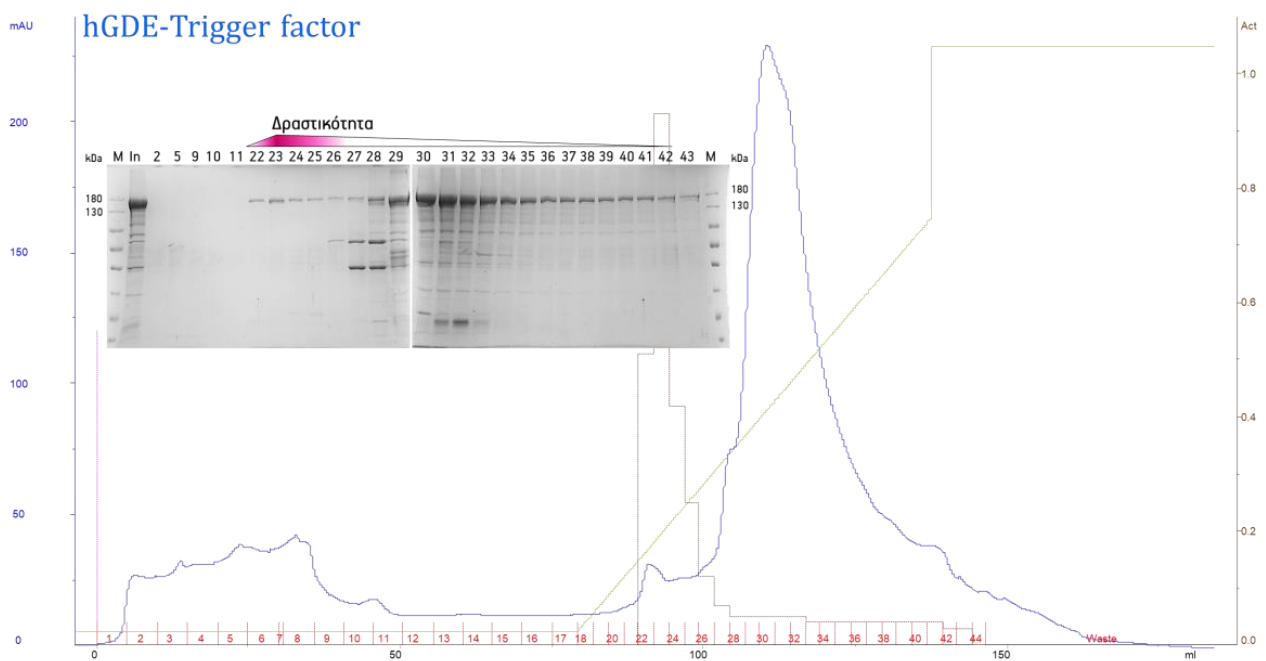


Εικόνα 76: Χρωματογραφήματα από την εφαρμογή *IMAC* μετά από παραγωγή του *hGDE* με τη βοήθεια των μοριακών συνοδών *trigger factor* (πάνω) και των *GroES/EL* (κάτω). Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του *UV* (280 nm) του δείγματος που έβγαινε από τη στήλη. Παρουσιάζονται επίσης οι αναλύσεις *SDS-PAGE* και οι δοκιμές δραστηκότητας τόσο στον δεξί άξονα του χρωματογραφήματος (καφέ γραμμή, *Act*) όσο και στην κορυφή των πηκτών πολυακρυλαμίδης. Φαίνεται πως η χρήση των μοριακών συνοδών *GroES/EL* οδήγησε σε παραγωγή περισσότερης δραστήκης πρωτεΐνης συγκριτικά με τη χρήση της μοριακής συνοδού *trigger factor*.

Συγκρίνοντας τα δύο χρωματογραφήματα μπορούμε εύκολα να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι η συνέκφραση με τη μοριακή συνοδό *trigger factor* οδήγησε σε σημαντικά περισσότερη διαλυτή πρωτεΐνη συγκριτικά με τις μοριακές συνοδούς *GroES/EL*. Όμως, φαίνεται ότι παρότι οι *GroES/EL* παρήγαγαν λιγότερη διαλυτή πρωτεΐνη, αυτή εμφάνισε σημαντικά υψηλότερη δραστηκότητα από αυτή που είχε παραχθεί με την μοριακή συνοδό *trigger factor*. Κάτι τέτοιο ίσως οφείλεται στη παρουσία δύο ή περισσότερων διαφορετικών διαμορφώσεων της πρωτεΐνης, όταν αυτή αναδιπλώνεται παρουσία της *trigger factor* ή σε παραγωγή διαλυτών συσσωματωμάτων.

2^ο Βήμα καθαρισμού: *HiTrap Q HP*, 5 mL (*IEC*, *GE HealthCare*)

Τα κλάσματα που περιείχαν το *hGDE* υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία άνιο-ιοντοανταλλαγής. Η έκλουση έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης *NaCl* και τα κλάσματα που προέκυψαν από τον καθαρισμό αναλύθηκαν σε *SDS-PAGE* και υποβλήθηκαν σε δομικές δραστηκότητας. Στην Εικόνα 77 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα, οι αναλύσεις *SDS-PAGE* καθώς επίσης και οι δοκιμές δραστηκότητας, τόσο στο δεξί άξονα του χρωματογραφήματος όσο και στην κορυφή των πηκτών πολυακρυλαμίδης για λόγους ευκολίας. Σε ότι αφορά το *hGDE* που είχε παραχθεί με τη βοήθεια της μοριακής συνοδού *trigger factor* παρατηρήσαμε δύο κορυφές στο χρωματογράφημα (Εικόνα 77).



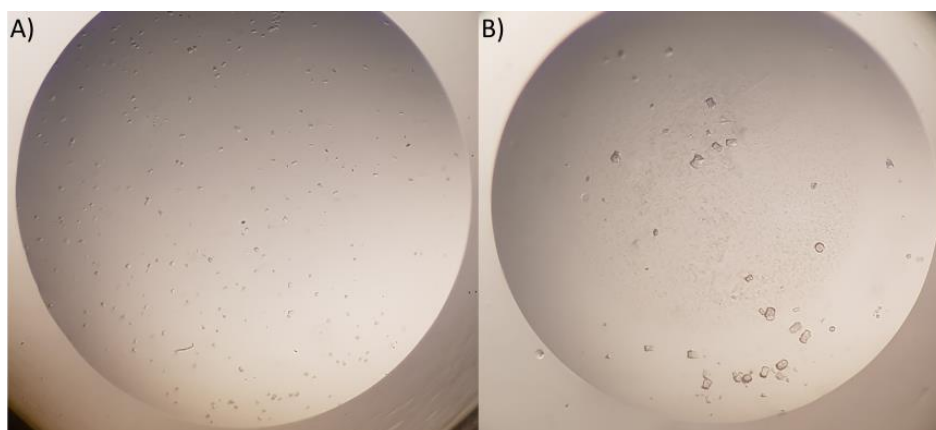
Εικόνα 77: Χρωματογραφήματα που προέκυψαν μετά την εφαρμογή χρωματογραφίας άνιο-ιοντοανταλλαγής. **Πάνω**, παρουσιάζονται το χρωματογράφημα και η SDS-PAGE ανάλυση για το hGDE που είχε παραχθεί με τη βοήθεια της trigger factor και **κάτω** με τη βοήθεια των GroES/EL. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του UV (280 nm) του δείγματος που έβγαινε από τη στήλη και η πράσινη γραμμή το επί τοις εκατό ποσοστό του διαλύματος B. Παρουσιάζονται επίσης οι δοκιμές δραστικότητας τόσο στο δεξί άξονα του χρωματογραφήματος (καφέ γραμμή, Act) όσο και στην κορυφή των πηκτών πολυακρυλαμίδης. Φαίνεται πως η χρήση των μοριακών συνοδών GroES/EL οδήγησε σε παραγωγή περισσότερης δραστικής πρωτεΐνης συγκριτικά με τη χρήση της μοριακής συνοδού trigger factor. Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις τα κλάσματα που περιείχαν τη δραστική πρωτεΐνη εμφάνισαν την ίδια βιοχημική καθαρότητα. Η μέγιστη συγκέντρωση NaCl που χρησιμοποιήθηκε κατά την έκλυση ήταν 1 M.

Η πρώτη κορυφή (κλάσματα 22-25) εμφανίστηκε σε περίπου 12 % διαλύματος B και περιείχε μικρή ποσότητα του hGDE σε υψηλή καθαρότητα. Η δεύτερη κορυφή περιείχε σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα, σε σχέση με την πρώτη, αλλά το δείγμα εμφάνισε σαφώς μειωμένη

βιοχημική καθαρότητα. Δοκιμές δραστηριότητας έδειξαν ότι μόνο το ένζυμο που βρισκόταν στην πρώτη κορυφή ήταν δραστικό. Επομένως, το μεγαλύτερο μέρος του *hGDE* που παράχθηκε με τη βοήθεια της μοριακής συνοδού *trigger factor* δεν ήταν δραστικό. Όπως αναφέραμε και παραπάνω, κάτι τέτοιο θα μπορούσε να οφείλεται στην παρουσία δύο ή περισσότερων διαφορετικών διαμορφώσεων της πρωτεΐνης, ή σε παραγωγή διαλυτών συσσωματωμάτων. Σε ότι αφορά το *hGDE* το οποίο είχε παραχθεί με τη βοήθεια των μοριακών συνοδών *GroES/EL* παρατηρήσαμε ότι στο χρωματογράφημα προέκυψαν τέσσερις κορυφές (Εικόνα 77). Η πρώτη κορυφή (κλάσματα 20-24) εμφανίστηκε σε περίπου 12 % διαλύματος B και περιείχε το *hGDE* σε υψηλή βιοχημική καθαρότητα. Οι υπόλοιπες κορυφές περιείχαν μικρή ποσότητα από το *hGDE* και άλλες πρωτεΐνες. Δοκιμές δραστηριότητας σε αυτά τα κλάσματα έδειξαν ότι η πρώτη κορυφή περιείχε δραστικό ένζυμο, όπως και στην περίπτωση με τη μοριακή συνοδό *trigger factor*. Τα παραπάνω προτείνουν ότι η παραγωγή του *hGDE* με τη βοήθεια των μοριακών συνοδών *GroES/EL* πλεονεκτεί έναντι της χρήσης της *trigger factor* καθώς παράγεται αρκετή διαλυτή και δραστική πρωτεΐνη. Η απόδοση της μεθόδου καθαρισμού με τη μοριακή συνοδό *trigger factor* και τις μοριακές συνοδούς *GroES/EL* ήταν 0.35 mg και 0.5 mg αντίστοιχα, ανά λίτρο υγρής βακτηριακής καλλιέργειας.

5.4.5. Κρυστάλλωση του *hGDE*

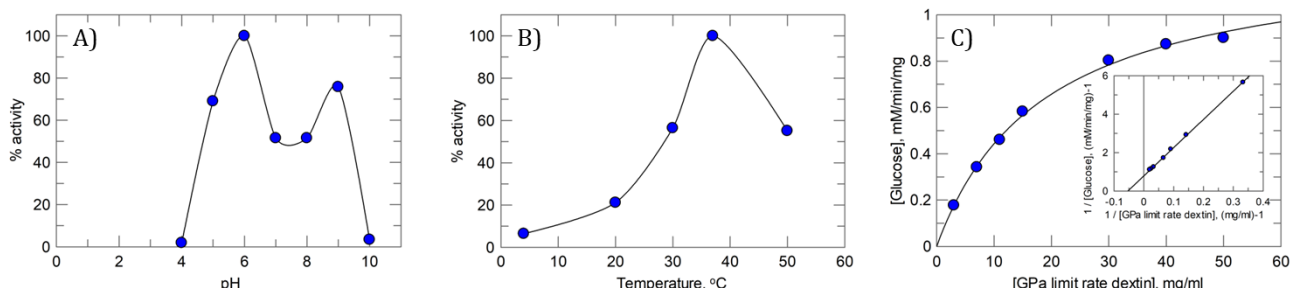
Η εκτίμηση της βέλτιστης συγκέντρωσης πρωτεΐνης για πειράματα κρυστάλλωσης έγινε με το με το κιτ *pre-crystallization test* της εταιρείας *Hamton Research* και προσδιορίστηκε στα 5 mg/ml. Κρύσταλλοι φαίνεται πως αναπτύχθηκαν σε δύο συνθήκες (Εικόνα 78). Η πρώτη συνθήκη είχε ως διάλυμα κρυστάλλωσης 0.1 M *Tris-HCl* pH 8.8, 10 % w/v *PEG4000* και η δεύτερη συνθήκη 0.1 M *Hepes-NaOH* pH 7.5, 12 % w/v *PEG8000*. Χρειάζεται βελτιστοποίηση των συνθηκών κρυστάλλωσης ώστε να προκύψουν μεγαλύτεροι μονοκρύσταλλοι.



Εικόνα 78: Κρύσταλλοι του *hGDE* που αναπτύχθηκαν ύστερα από διαλογή 380 διαφορετικών συνθηκών κρυστάλλωσης. **A)** 0.1 M *Tris-HCl* pH 8.8, 10 % w/v *PEG4000* **B)** 0.1 M *Hepes-NaOH* pH 7.5, 12 % w/v *PEG8000*.

5.4.6. Κινητικές μελέτες έναντι του *hGDE*

Αρχικά, προσδιορίσαμε το βέλτιστο *pH* δραστηριότητας του *hGDE* προσδιορίζοντας τη δραστηριότητα του ενζύμου σε ένα εύρος τιμών *pH* (4-10, Βλ. παράγραφο 4.7.2.5.1) και έπειτα σε ένα εύρος διαφορετικών θερμοκρασιών.



Διάγραμμα 4: Κινητικές μελέτες για **A)** την εύρεση του βέλτιστου *pH* και **B)** της βέλτιστης θερμοκρασίας της αντίδρασης που καταλύει το *hGDE*. **C)** Η αντίδραση που καταλύει το *hGDE* ακολουθεί κινητική *Michaelis-Menten*. Στο ένθετο παρουσιάζεται το διάγραμμα *Lineweaver-Burk*.

Στο Διάγραμμα 4 παρατηρούμε ότι το *hGDE* εμφανίζει βέλτιστη δραστηριότητα πρωτίστως σε *pH* 6.0 και δευτερευόντως σε *pH* 9.0. Η βέλτιστη θερμοκρασία που ευνοεί την καταλυτική δράση του *hGDE* είναι οι 37 °C και επιπλέον παρατηρούμε ότι το ένζυμο ακολουθεί κινητική *Michaelis-Menten*. Η K_M προσδιορίστηκε στα $18.7 \pm 0.8 \text{ mg/mL}$ ϕ -*dextrin* και η V_{max} στα $1.27 \pm 0.03 \text{ mM/min/mg hGDE}$.

Συμπεράσματα

- Επετεύχθη παραγωγή του *hGDE* στο διαλυτό κλάσμα του *E. coli* με χρήση μοριακών συνοδών.
- Οι μοριακές συνοδοί *GroES/EL* οδήγησαν σε παραγωγή περισσότερης δραστητικής πρωτεΐνης συγκριτικά με την *trigger factor*.
- Το *hGDE* απομονώθηκε σε υψηλή βιοχημική καθαρότητα.
- Έγινε προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών *pH* και θερμοκρασίας για κινητικές μελέτες.
- Το *hGDE* ακολουθεί κινητική *Michaelis-Menten*.
- Κρύσταλλοι του *hGDE* φαίνεται να αναπτύχθηκαν σε δύο διαφορετικές συνθήκες.

5.5. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΑΠΟΔΙΑΚΛΑΔΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ *Candida glabrata* (*CgGDE*)

Το *hGDE* και το *CgGDE* μοιράζονται μεγάλη ομολογία στα καταλυτικά τους κέντρα παρότι εμφανίζουν μεταξύ τους συνολικά 37 % ομοιότητα [44]. Τα κατάλοιπα στα καταλυτικά κέντρα είναι συντηρημένα και ανάμεσα σε διαφορετικά ευκαρυωτικά *GDE*. Επομένως, σε περίπτωση που οι κρύσταλλοι του *hGDE* δεν περιθλούν ικανοποιητικά της ακτίνες-Χ ώστε να συλληχθούν δεδομένα για τη λύση της δομής του, θα χρησιμοποιηθεί για δομικές μελέτες το *CgGDE*. Η εύρεση αναστολέων θα βασιστεί σε κινητικές μελέτες που θα γίνονται για λόγους σύγκρισης και στα δύο ένζυμα, αλλά οι δομικές μελέτες θα πραγματοποιούνται στο *CgGDE*. Κάτι παρόμοιο συμβαίνει και με την *rmGPb* και *hlGPa* όπου έχει φανεί ότι τα δεδομένα που προκύπτουν από τις κρυσταλλικές δομές της *rmGPb* με αναστολεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την σύνθεση ισχυρών ενώσεων για την *hlGPa*. Το πλασμίδιο που κωδικοποιεί το *CgGDE* μας χορηγήθηκε από τον καθηγητή *Song Xiang* (*Shanghai Jiaotong University Medical School*) η ερευνητική ομάδα του οποίου απομόνωσε κρυστάλλωσε και έλυσε τη δομή του ενζύμου [44].

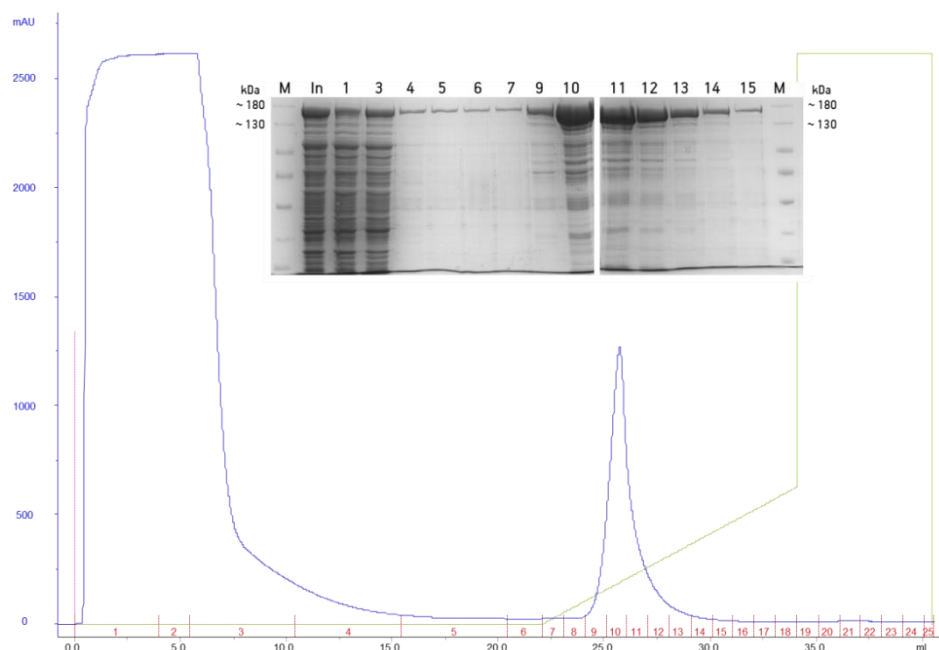
Η απομόνωση του *CgGDE* έγινε με δύο μεθοδολογίες:

- Σε ότι αφορά την πρώτη, ακολουθήσαμε παρόμοιο πρωτόκολλο με αυτό που αναφέρεται στη δημοσίευση όπου περιγράφεται η απομόνωση και κρυστάλλωση του *CgGDE* [44].
- Σε ότι αφορά τη δεύτερη μεθοδολογία, παρασκευάσαμε υλικό χρωματογραφίας το οποίο αποτελούταν από σφαιρίδια σεφαρόζης στα οποία ακινητοποιήσαμε β-κυκλοδεξτρίνη (β -CD) σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναφέρεται στη βιβλιογραφία [199, 200] και έχει αναλυθεί στην παράγραφο 4.3. Η εφαρμογή χρωματογραφίας συγγένειας με β -CD έχει οδηγήσει στο καθαρισμό του *GDE* από σακχαρομύκητα σε ένα μόνο βήμα [199]. Δεδομένου ότι το *CgGDE* και το *ScGDE* μοιράζονται μεταξύ τους περισσότερο από 70 % ομολογία, ακολουθήσαμε και αυτή τη μεθοδολογία.

5.5.1. 1^η μεθοδολογία απομόνωσης και καθαρισμού του ανασυνδυασμένου *CgGDE* με χρήση *IMAC*, *IEX* και *SEC*.

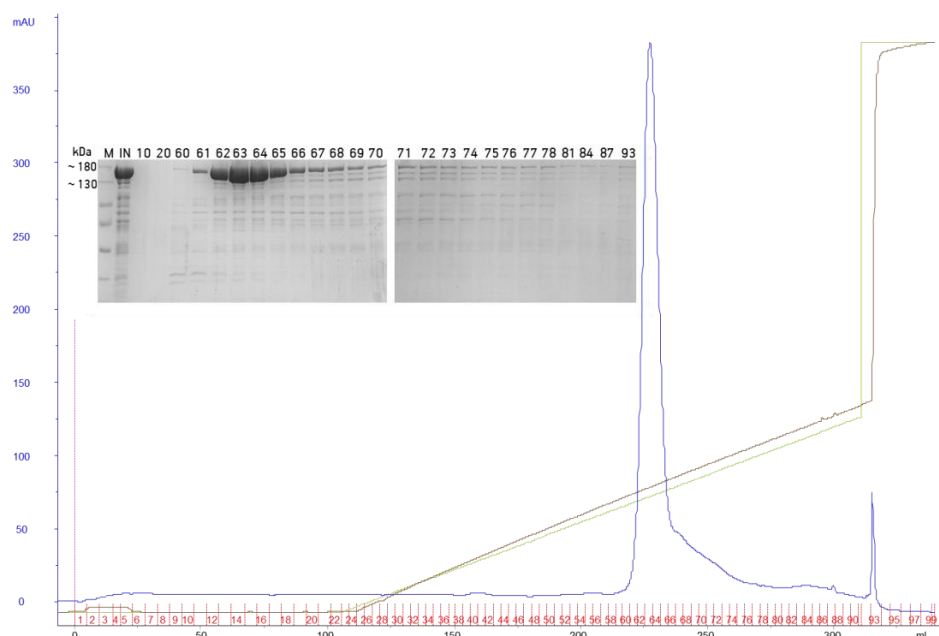
Η πρώτη μεθοδολογία απομόνωσης του *CgGDE* αποτελείται από τρία βήματα και η διαδικασία αναλύεται στην παράγραφο 4.6.2.2. Παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα και οι αναλύσεις *SDS-PAGE* από κάθε βήμα καθαρισμού.

1^ο Βήμα καθαρισμού: HiTrap TALON crude (IMAC με ακινητοποιημένα Co²⁺ σε σφαιρίδια σεφαρόζης, GE HealthCare)



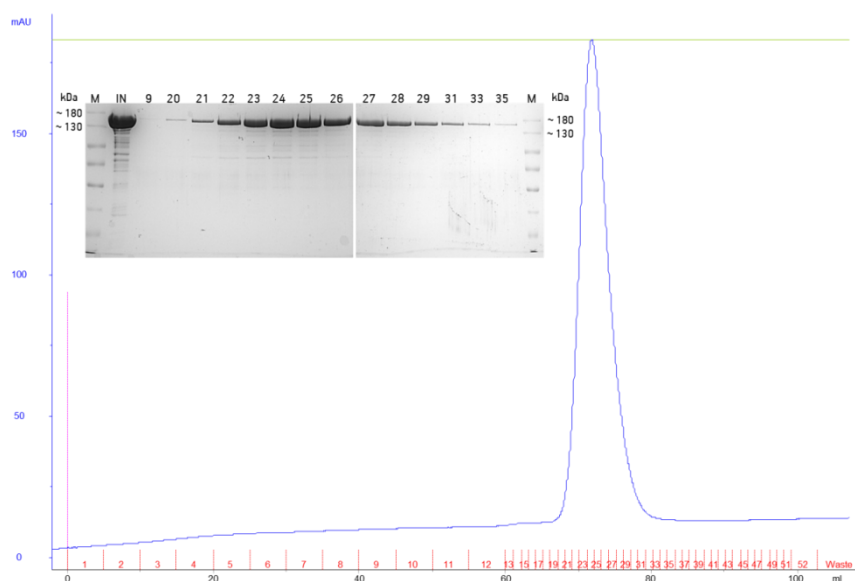
Εικόνα 79: Το χρωματογράφημα και η ανάλυση SDS-PAGE που προέκυψε από τον καθαρισμό του CgGDE με στήλη με ακινητοποιημένα Co²⁺. Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε στα κλάσμα 9-14. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του UV (280 nm) του δείγματος που έβγαине από τη στήλη και η πράσινη γραμμή το επί τοις εκατό ποσοστό του διαλύματος B.

2^ο Βήμα καθαρισμού: HiTrap Q HP, 5 mL (IEC, GE HealthCare)



Εικόνα 80: Το χρωματογράφημα και η ανάλυση SDS-PAGE που προέκυψε από τον καθαρισμό του CgGDE με στήλη με ανιόντοανταλλαγής. Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε στα κλάσμα 61-66. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του UV (280 nm) του δείγματος που έβγαине από τη στήλη και η πράσινη γραμμή το επί τοις εκατό ποσοστό του διαλύματος B.

3^ο Βήμα καθαρισμού: Superdex S200 (SEC, GE HealthCare)



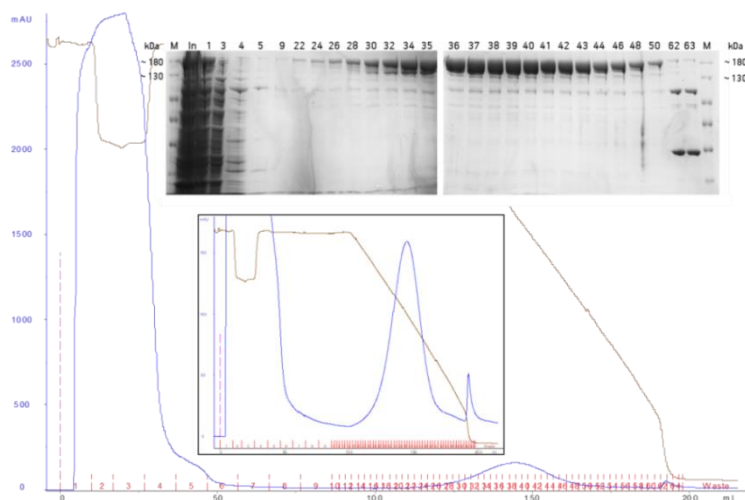
Εικόνα 81: Το χρωματογράφημα και η ανάλυση *SDS-PAGE* που προέκυψε ύστερα από καθαρισμό του *CgGDE* με στήλη με μοριακής διήθησης. Το *CgGDE* εντοπίστηκε στα κλάσματα 21-33. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του UV (280 nm) του δείγματος που έβγαине από τη στήλη.

Η απόδοση της μεθόδου καθαρισμού ήταν 0.7 mg πρωτεΐνης ανά λίτρο υγρής βακτηριακής καλλιέργειας.

5.5.2. 2^η μεθοδολογία απομόνωσης και καθαρισμού του ανασυνδυασμένου *CgGDE* με χρήση β -CD sepharose 6B και SEC

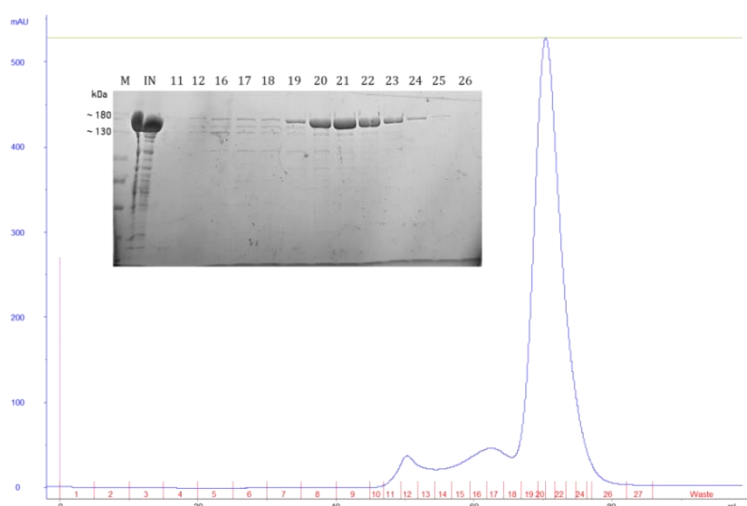
Η διαδικασία αναλύεται στην παράγραφο 4.6.2.3. Παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα και οι αναλύσεις *SDS-PAGE* από κάθε βήμα καθαρισμού.

1^ο Βήμα καθαρισμού: β -CD sepharose 6B, ~ 12 mL



Εικόνα 82: Το χρωματογράφημα και η ανάλυση *SDS-PAGE* που προέκυψε από τον καθαρισμό του *CgGDE* με στήλη β -CD sepharose 6B. Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε στα κλάσμα 30-48. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του UV (280 nm) του δείγματος που έβγαине από τη στήλη και η καφέ την αγωγιμότητα.

2ο Βήμα καθαρισμού: Superdex S200 (SEC, GE HealthCare)



Εικόνα 83: Το χρωματογράφημα που προέκυψε ύστερα από εφαρμογή του συμπυκνωμένου *CgGDE* σε στήλη μοριακής διήθησης. Τα κλάσμα που προέκυψαν από τον καθαρισμό αναλύθηκαν σε *SDS-PAGE*. Η πρωτεΐνη εντοπίστηκε στα κλάσματα 19-24. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση του *UV* (280 nm) του δείγματος που έβγαине από τη στήλη.

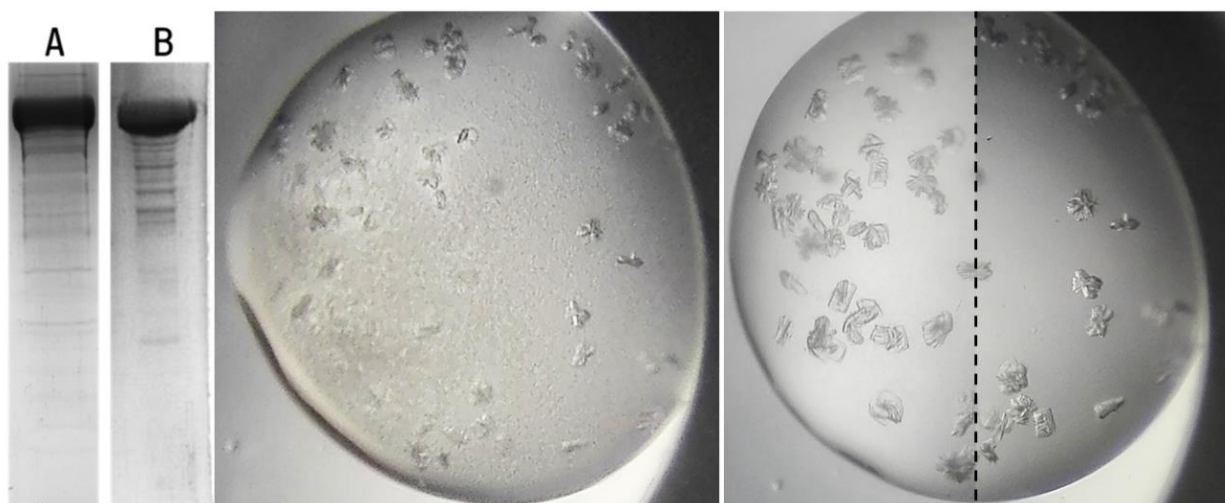
Η απόδοση της μεθόδου καθαρισμού ήταν 1.65 mg πρωτεΐνης ανά λίτρο υγρής βακτηριακής καλλιέργειας.

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους, η πρωτεΐνη απομονώθηκε σε παρόμοια επίπεδα καθαρότητας αλλά η εφαρμογή της στήλης με β -CD οδήγησε σε καθαρισμό της πρωτεΐνης σε ένα λιγότερο βήμα, με υψηλότερη απόδοση (Εικόνα 84).

5.5.3. Κρυστάλλωση του *CgGDE*

Στις δοκιμές κρυστάλλωσης που επιχειρήσαμε δεν μπορέσαμε να επιτύχουμε την παραγωγή κρυστάλλων στη συνθήκη που αναφέρεται στη σχετική δημοσίευση [10 % *PEG* 5000*mme* (*monometyl ether*), 0.1 M *Hepes-NaOH* pH 7.0 και 5 % *tacsimate* pH 7.0] [44] χωρίς την προσθήκη *tacsimate*. Από την διαλογή 96 διαφορετικών συνθηκών κρυστάλλωσης, κρύσταλλοι του *CgGDE* αναπτύχθηκαν σε καινούρια συνθήκη που περιείχε 0.1 M *Hepes-NaOH* pH 7.5, 10 % (v/v) 2-προπανόλη και 20 % w/v *PEG*4000. Η πρωτεΐνη είχε αρχική συγκέντρωση 20 mg/mL και αραιώθηκε σε αναλογία 1:1 με το διάλυμα κρυστάλλωσης κατά την εναπόθεση της σταγόνας (10 mg/mL *CgGDE* στη σταγόνα). Οι κρύσταλλοι άρχισαν να εμφανίζονται σε μια μέρα και η ανάπτυξη τους ολοκληρώθηκε εντός 10 ημερών (Εικόνα 84). Επιπλέον, κάναμε δοκιμές ανάπτυξης κρυστάλλων με αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης 10 mg/mL όπου πάλι έγινε ανάμιξη με το διάλυμα κρυστάλλωση σε αναλογία 1:1 κατά την εναπόθεση της σταγόνας (5 mg/mL *CgGDE* στη σταγόνα). Οι κρύσταλλοι άρχισαν να αναπτύσσονται σε 2-3 ημέρες και σταμάτησαν να αναπτύσσονται μετά από 7 ημέρες. Οι κρύσταλλοι σε αυτή τη περίπτωση ήταν

περισσότεροι με μικρότερο μέγεθος (Εικόνα 85). Χρειάζεται βελτιστοποίηση των συνθηκών κρυστάλλωσης ώστε να προκύψουν μεγαλύτεροι μονοκρύσταλλοι.



Εικόνα 84: **A)** Συμπυκνωμένη πρωτεΐνη με τη μέθοδο των *Zhai, L., et al., [44]* **B)** συμπυκνωμένη πρωτεΐνη με χρήση στήλης με β -CD. Κρύσταλλοι του *CgGDE* άρχισαν να εμφανίζονται σε μια μέρα (αριστερή εικόνα) και η ανάπτυξη τους ολοκληρώθηκε σε ~ 10 ημέρες (δεξιά εικόνα). Στη δεξιά εικόνα των κρυστάλλων, επειδή ήταν δύσκολη η εστίαση με τον φακό σε όλη τη σταγόνα, η εικόνα που παρουσιάζεται αποτελείται από ένωση δύο διαφορετικών φωτογραφιών. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε αυτή τη σταγόνα ήταν 10 mg/mL .



Εικόνα 85: Κρύσταλλοι του *CgGDE* που αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση 5 mg/mL *CgGDE*.

Συμπεράσματα

- Το *CgGDE* απομονώθηκε με στήλη συγγένειας *sepharose 6B* με ακινητοποιημένη β -κυκλοδεξτρίνη αυξάνοντας την απόδοση κατά ~ 2.5 φορές συγκριτικά με την μέθοδο που αναφέρεται στην δημοσίευση όπου περιγράφεται ο καθαρισμός και η κρυστάλλωση του ενζύμου [44].
- Το *CgGDE* κρυσταλλώθηκε σε μια νέα συνθήκη.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Στην διδακτορική διατριβή έγινε αξιολόγηση μικρών μορίων ως εν δυνάμει αναστολέων της γλυκογονόλυσης. Η αναστολή της γλυκογονόλυσης αποτελεί μια προσέγγιση για τη θεραπευτική διαχείριση της υπεργλυκαιμίας που παρουσιάζεται στον ΣΔ2 και τα ένζυμα αποικοδόμησης του γλυκογόνου αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους [29, 30, 33, 35-40, 45]. Οι μελέτες της διδακτορικής διατριβής αποκάλυψαν έναν από τους δέκα πλέον ισχυρούς αναστολείς για το καταλυτικό κέντρο της *GP* και έναν από τους πέντε για το κέντρο αναστολής του ενζύμου. Η εύρεση ενός αναστολέα που θα αξιοποιεί τόσο τις υδρόφιλες όσο και τις υδρόφοβες περιοχές της β-εσοχής του ενζύμου αποτελεί την επόμενη πρόκληση στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό αναστολέων για το καταλυτικό κέντρο της *GP*. Επιπλέον, η βελτιστοποίηση του πλέον ισχυρού αναστολέα για το κέντρο αναστολής θα οδηγήσει, ενδεχομένως, σε πιο βιοδραστικές ενώσεις οι οποίες θα εμφανίζουν ισχυρή συνέργεια με την γλυκόζη, κάτι το οποίο έχει φαρμακολογικό ενδιαφέρον [84, 87, 89, 92]. Ο σκοπός της διδακτορικής διατριβής ήταν οι ενώσεις που αναστέλλουν ισχυρά την *GP* να δοκιμαστούν και ως προς το *hGDE*. Ωστόσο, η έλλειψη κρυσταλλικής δομής για το *hGDE* αλλά και η απουσία βιβλιογραφίας σε πρωτόκολλα παραγωγής του ενζύμου στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης *E. coli* μας οδήγησε σε ανάπτυξη πρωτοκόλλων για την παραγωγή, απομόνωση, καθαρισμό και κρυστάλλωση του *hGDE*. Επιπλέον, έγιναν κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών διεξαγωγής της αντίδρασης (*pH*, θερμοκρασία) και προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου (K_M , V_{max}). Η διδακτορική διατριβή θέτει τα θεμέλια για τον περαιτέρω βιοχημικό χαρακτηρισμό του ενζύμου ο οποίος θα μας δώσει εξαιρετικά σημαντικές πληροφορίες καθώς το *hGDE*, εκτός από το μεταβολισμό του γλυκογόνου, συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με το βασικό ρυθμιστή του μεταβολισμού, την *AMPK*, επηρεάζοντας την δράση της [132] και αποτελεί έναν καταστολέα του καρκίνου [103, 128, 129]. Παράλληλα, ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής θα προσφέρει το απαραίτητο πλαίσιο για τη συσχέτιση μεταλλάξεων με γλυκογονιάσες και για τον από την δομή κατευθυνόμενο σχεδιασμό αναστολέων για το *hGDE*.

Ενθαρρυντικό είναι το γεγονός ότι οι αναστολείς της *GP* αναστέλλουν την γλυκογονόλυση *in vivo* και μοιάζουν δομικά με αναστολείς της *SGLT2* (συμμεταφορέας νατρίου/γλυκόζης) οι οποίοι κυκλοφορούν ήδη στην αγορά [42]. Επιπλέον, η ένωση *migliol*, ένα αντι-υπεργλυκαιμικό φάρμακο [140, 141], είναι γνωστό ότι μπορεί να αναστέλλει τη δράση της γλυκοζιτάσης του *GDE* [45, 137]. Όπως και για την *GP*, έτσι και για το *GDE* έχει βρεθεί ότι

αναστολείς του μπορούν να αναστέλλουν τη γλυκογονόλυση *in vivo* [139]. Τα παραπάνω συνηγορούν ότι αναστολείς της *GP* και του *GDE* ενδεχομένως να μπορούν να περάσουν ομοίως με επιτυχία σε κλινικές μελέτες και να χρησιμοποιηθούν για τη διαχείριση του ΣΔ2.

SUMMARY

Glycogen is a branched polymer consisting of glucose monomers and serves as glucose storage for the body. It has been shown that glycogenolysis increases the blood glucose levels in type 2 diabetes (T2D) patients even more and therefore several studies have validated glycogen metabolism enzymes as pharmaceutical targets for T2D treatment. Glycogen degradation occurs mainly, by the action of glycogen phosphorylase (GP) and glycogen debranching enzyme (GDE). GP catalyzes glycogen breakdown but its action halts four residues from a branch point. GDE removes the branched residues and GP can further degrade glycogen.

GP has been studied through structure based inhibitor design to discover small molecules that could serve as anti-hyperglycaemic agents for T2D patients. Among GP's binding sites, the catalytic site has been studied in depth with glucose derivatives but less is known for the inhibitor binding site. Herein, we studied four inhibitor collections targeting the catalytic site and one collection of chrysin analogues targeting the inhibitor binding site. The first collection included (*S*) and (*R*) epimers of glucopyranosylidene-spiro-imidazolinones as inhibitors of human liver GP (hLGP). (*R*) spiro-epimers were found to be more potent than the corresponding (*S*) spiro-epimers. The most potent compound was 2-naphthyl-substituted (*R*)-imidazolinone **30** ($K_i = 1.72 \mu M$) and X-ray crystallography revealed that only the (*R*) epimers were bound in the catalytic site of GP. Furthermore, complex structures revealed the structural basis of inhibition in comparison with other glucopyranosylidene-spiro-heterocycles. In the second collection of glucose derivatives; we evaluated C- β -D-glucopyranosyl -thiazoles, -imidazoles and an N- β -D glucopyranosyl -tetrazole as inhibitors of hLGP. The most potent compound was 2-naphthyl-substituted -imidazole **9** ($K_i = 3.2 \mu M$). C- β -D-glucopyranosyl -thiazoles were less potent than the corresponding -imidazoles whereas N- β -D glucopyranosyl -tetrazole was the less potent inhibitor studied in this section. X-ray crystallography revealed crucial interactions with His377 main chain carbonyl oxygen, located at the catalytic site of GP. In the third collection of glucose derivatives, we tested β -D-Glucosaminyl triazoles as inhibitors of hLGP. In these series, the 2'-OH of the glucose unit was replaced by -NH₂ group (glucosamines). The most potent compound was the 2-naphthyl-substituted **29b** ($K_i = 7.6 \mu M$) which is classified among the top three most potent inhibitors for the catalytic site of GP with a modified glucopyranosyl ring discovered thus far. Moreover, we observed that glucose modification had a negative effect in the inhibitory potency but these inhibitors were still potent against GP, in comparison with previous reported inhibitors with modifications of the

glucose unit. In the fourth collection, we assessed the characteristics of the β -pocket of the catalytic site of GP by the binding of C- β -D-glucopyranosyl -triazoles. The most potent compound was **CK900** ($K_i = 427 \text{ nM}$) which was found bound at the catalytic site of GP. X-ray crystallography revealed hydrophilic and hydrophobic regions in the β -pocket that can be used for further rational inhibitor design. Finally, we studied the inhibitor binding site of GP with chrysin analogues ($K_i = 7.6 \text{ }\mu\text{M}$). Kinetic experiments showed that the most potent compound, **43**, displayed a K_i of $1.0 \text{ }\mu\text{M}$, similar to flavopiridol. Kinetic studies and X-ray crystallography revealed that these inhibitors bind at the inhibitor site of GP and offered insights for the next steps in the structure based inhibitor design process.

In addition to GP, we studied human Glycogen Debranching Enzyme (hGDE). There is no reference available for hGDE production in *E. coli* and the only known structure for eukaryotic GDE comes for *Candida glabrata* (CgGDE). We tried to produce and fold the protein in the periplasm and the cytoplasm of bacterial strains of *E. coli*. Regarding periplasmic localization, the amounts of hGDE folded in that area were not enough for structural studies. Focusing in the cytoplasmic space, we tried to enhance protein folding, stability and solubility using different *E. coli* strains and lysis buffers. Unfortunately, we didn't manage to produce soluble hGDE. Co-expression with molecular chaperones resulted in soluble protein production. Fast protein liquid chromatography was used to separate the active from the inactive protein form. The molecular chaperone trigger factor led to high soluble protein production but co-expression with molecular chaperones GroES/EL led to less amounts of soluble protein but with higher enzymatic activity. Kinetic studies revealed that hGDE follows the Michaelis-Menten kinetics and it reaches maximum activity at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ at pH 6.0. Finally, we manage to grow protein crystals at $16 \text{ }^\circ\text{C}$ in two different conditions ($0.1 \text{ M Tris-HCl pH } 8.8$, $10 \text{ } \%$ w/v PEG4000 και $0.1 \text{ M HEPES-NaOH pH } 7.5$, $12 \text{ } \%$ w/v PEG8000). Besides hGDE, we also purified CgGDE establishing a new protocol using affinity chromatography and a β -CD sepharose 6B column. Crystals of CgGDE were grown in a novel condition ($0.1 \text{ M HEPES-NaOH pH } 7.5$, $10 \text{ } \%$ (v/v) 2-propanol, $20 \text{ } \%$ w/v PEG4000).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αμινοξικές αλληλουχίες πρωτεϊνών

Παρακάτω παρουσιάζονται οι αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή μαζί με τα χαρακτηριστικά τους τα οποία προσδιορίστηκαν με το διαδικτυακό εργαλείο *ProtParam* [289] στον διαδικτυακό διακομιστή *ExPASy* [290]. Επιπλέον, αποτυπώνεται και η αμινοξική αλληλουχία του *ScGDE* λόγω σύγκρισης με το *CgGDE*.

rmGP (UniProtKB - P00489)

10 20 30 40 50 60
MSRPLSDQEK RKQISVRGLA GVENVTELKK NFNRLHLHFTL VKDRNVATPR DYYFALAHTV

70 80 90 100 110 120
RDHLVGRWIR TQQHYYEKDP KRIYYLSLEF YMGRTLQNTM VNLALENACD EATYQLGLDM

130 140 150 160 170 180
EELEEIEEDA GLGNGGLGRL AACFLDSMAT LGLAAYGYGI RYEFGIFNQK ICGGWQMEEA

190 200 210 220 230 240
DDWLRYGNPW EKARPEFTLP VHFYGRVEHT SQGAKWVDTQ VVLAMPYDTP VPGYRNNVNV

250 260 270 280 290 300
TMRLWSAKAP NDFNLKDFNV GGYIQAVLDR NLAENISRVL YPNDNFFEGK ELRLKQEFYV

310 320 330 340 350 360
VAATLQDIIR RFKSSKFGCR DPVRTNFDFAF PDKVAIQLND THPSLAIPEL MRVLVDLERL

370 380 390 400 410 420
DWDKAWEVTV KTCAYTNHTV LPEALERWPV HLLLETLLPRH LQIIYEINQR FLNRVAAAFF

430 440 450 460 470 480
GDVDRLRRMS LVEEGAVKRI NMAHLCIAGS HAVNGVARIH SEILKKTIFK DFYELEPHKF

490 500 510 520 530 540
QNKTNGITPR RWLVLCPNGL AEIIAERIGE EYISDLQQLR KLLSYVDDEA FIRDVAKVKQ

550 560 570 580 590 600
ENKLFKFAAYL EREYKVHINP NSLFDVQVQR IHEYKRQLLN CLHVITLYNR IKKEPNKFVV

610 620 630 640 650 660
PRTVMIGGKA APGYHMAKMI IKLITAIGDV VNHDPPVVGDR LRVIFLENYR VSLAEKVIPA

670 680 690 700 710 720
ADLSEQISTA GTEASGTGMN KFMLNGALTI GTMDGANVEM AEEAGEENFF IFGMRVEDVD

730 740 750 760 770 780
RLDQRGYNAQ EYYDRIPELR QIIIEQLSSGF FSPKQPDLFK DIVNMLMHHH RFKVFADYEE

790 800 810 820 830 840
YVKCQERVSA LYKNPREWTR MVIRNIATSG KFSSDRITIAQ YAREIWGVEP SRQRLPAPDE

KIP

rmGPb	
Αριθμός αμινοξέων	843
Μοριακή μάζα	97.29
Θεωρητικό <i>pI</i>	6.77

Αμινοξύ Σύνθεση

Ala (A) 63	7.5%
Arg (R) 63	7.5%
Asn (N) 46	5.5%
Asp (D) 49	5.8%
Cys (C) 9	1.1%
Gln (Q) 30	3.6%
Glu (E) 65	7.7%
Gly (G) 48	5.7%
His (H) 22	2.6%
Ile (I) 50	5.9%
Leu (L) 79	9.4%
Lys (K) 48	5.7%
Met (M) 22	2.6%
Phe (F) 38	4.5%
Pro (P) 36	4.3%
Ser (S) 29	3.4%
Thr (T) 36	4.3%
Trp (W) 12	1.4%
Tyr (Y) 36	4.3%
Val (V) 62	7.4%

hIGPb (UniProtKB - P06737)

10 20 30 40 50 60
 MAKPLTDQEK RRQISIRGIV GVENVAELKK SFNRHLHFTL VKDRNVATTR DYYFALAHTV

70 80 90 100 110 120
 RDHLVGRWIR TQQHYDYKCP KRYYLSLEF YMGRTLQNTM INLGLQNACD EAIYQLGLDI

130 140 150 160 170 180
 EELEEIEEDA GLGNGGLGRL AACFLDSMAT LGLAAYGYGI RYEGIFNQK IRDGWQVEEA

190 200 210 220 230 240
 DDWLRYGNPW EKS RPEFMLP VHFYGVKVEHT NTGTKWIDTQ VVLALPYDTP VPGYMNNTVN

250 260 270 280 290 300
 TMRLWSARAP NDFNLRDFNV GDYIQAVLDR NLAENISRVL YPNDNFFEGK ELRLKQYFV
 310 320 330 340 350 360
 VAATLQDIIR RFKASKFGST RGAGTVFADF PDQVAIQLND THPALAIPEL MRIFVDIEKL
 370 380 390 400 410 420
 PWSKAWELTQ KTFAYTNHTV LPEALERWV DLVEKLLPRH LEIYEINQK HLDRIVALFP
 430 440 450 460 470 480
 KDVDRLRRMS LIEEEGSKRI NMAHLCIVGS HAVNGVAKIH SDIVKTKVFK DFSELEPDKF
 490 500 510 520 530 540
 QNKTNGITPR RWLLLCNPGL AELIAEKIGE DYVKDLSQLT KLHSFLGDDV FLRELAKVKQ
 550 560 570 580 590 600
 ENKLFKFSQFL ETEYKVKINP SSMFDVQVQR IHEYKRQLLN CLHVITMYNR IKKDPKKLFV
 610 620 630 640 650 660
 PRTVIIGGKA APGYHMAKMI IKLITSVADV VNNDPMVGSK LKVIFLENYR VSLAEKVIPA
 670 680 690 700 710 720
 TDLSEQISTA GTEASGTGMN KFMLNGALTI GTMDGANVEM AEEAGEENLF IFGMRIDDDVA
 730 740 750 760 770 780
 ALDKKGYEAK EYYEALPELK LVIDQIDNGF FSPKQPDFK DIINMLFYHD RFKVFADYEA
 790 800 810 820 830 840
 YVKCQDKVSQ LYMNPKAWNT MVLKNIAASG KFSSDRTIKE YAQNIWNVEP SDLKISLSNE

SNKVNGN

	(His) ₆ -hIGP	hIGP
Αριθμός αμινοξέων	853	847
Μοριακή μάζα	97.97	97.15
Θεωρητικό <i>pI</i>	6.85	6.71

Αμινοξύ	Σύνθεση
Ala (A) 59	7.0%
Arg (R) 44	5.2%
Asn (N) 50	5.9%
Asp (D) 53	6.3%
Cys (C) 7	0.8%
Gln (Q) 29	3.4%
Glu (E) 59	7.0%
Gly (G) 48	5.7%
His (H) 19	2.2%
Ile (I) 55	6.5%

Leu (L) 84	9.9%
Lys (K) 65	7.7%
Met (M) 23	2.7%
Phe (F) 40	4.7%
Pro (P) 32	3.8%
Ser (S) 35	4.1%
Thr (T) 40	4.7%
Trp (W) 12	1.4%
Tyr (Y) 35	4.1%
Val (V) 58	6.8%

CgGDE (UniProtKB - Q6FSK0)

10 20 30 40 50 60
MSAHRLLLLR LSDSGEPVTS CSYQQGVLTLL PSLPLPQGKK LGDMPVYTVK LAIPAGSPVT

70 80 90 100 110 120
RDGLIWTNCP PDFSTQFDRE KFYKKIIKTS FHEDDHIDLD IYVPGTYCFY LSFKNKDEL

130 140 150 160 170 180
ETTRKFYFVV LPILSVNDKF IPLNSIAMQS VVSKWMGPTI KDWEKVFARV ASKKYNMIHF

190 200 210 220 230 240
TPLQHRGESN SPYSIYDQLE FDPTVFKSEK EVADMVERLR TEHNILSLTD IVFNHTANNS

250 260 270 280 290 300
QWLLDHPEAG YNHKTSPHLI SAIELDKKLL DFSEQMEALG YPVDLKTVDD LIKVMDGIKE

310 320 330 340 350 360
HVIGELKLWE FYVVDVKQTV SELREKWGNS KWSDDNIPS KDDSTNLAQF VRDNATEPGF

370 380 390 400 410 420
GSLGERGSNK INIDKFAAIL KKLHSEDYNN GIEELATKIL NDINLPFYKE YDDDINEVLE

430 440 450 460 470 480
QLFNRIKYLR IDDHGPKQGP ITKKLPLSEP YFTRFKAKDG EEYALANNGW IWDGNPLVDF

490 500 510 520 530 540
ASSQSKAYLR REVIVWGDVCV KLRYGKGPSD SPYLWERMSK YVEMNARIFN GFRIDNCHST

550 560 570 580 590 600
PLHVGQYFLD VARRVNPPLY VVAELFSGSE AMDCLFVERL GISSLIREAM QAWSEELSR

610 620 630 640 650 660
LVHRHGRPI GSYKFVPLDD FPYPADV KID EEYCAYNPDD HSVKCVSEIM IPKTLTATPP

670 680 690 700 710 720
HALFMDCTHD NETPNQKRTV EDTLPNAALV AFCSSAIGSV YGYDEVFPQL LDLVQEKRTY

730 740 750 760 770 780
SCAENTGISK VKTLLNMRE EIASEAVDIE DSEMHHVHDG QYITFHRTNA KNGKGWYLVA

790 800 810 820 830 840

RTKFHSSGDQ MLPRIKLSQT KATFKAAFSL ERTGDAPISD EIIEGIPTKL RELTGFDIGF
 850 860 870 880 890 900
 DENTKETSIL LPQDFPQSGI VIFETQQLGI DDSLDHFIRS GAIKATEKLS LESINYVLYR
 910 920 930 940 950 960
 AEQEEYDYSE GRSGAYDIPD YGKPVYCGLQ GWVSILRKII FYNDLAHPLS>NNLRNGHWAV
 970 980 990 1000 1010 1020
 DYVVNRLDLY KDKEGVAEVQ EWLRSRMERI KQLPSYLVPS FFALVVGIMY GCCRLRAMQL
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 MSDNVGKSTV FVQSLAMTSI QMVSAMKSTS ILPDQNIAM AAGLPHFSTN YMRCWGRDVF
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 ISLRGLLLTT GRYEEAKEHI LAFAKTLKHG LIPNLLDAGR NPRYNARDAW WFFVQAIQDY
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 VTIVPGGVSL LQEKVTRRFP LDDEYIPYDD PKAFSYSSTI EEIIEIILNR HAGGIKYREA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 NAGPNLDRVM KDEGFNVEVN VDWETGLIHG GSQFNCGTWM DKMGESEKAN SVGVPGTPRD
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GAAVEINGLL KSCLRFVLQL SKDGKFKYTE VTKPDGSKIS LSSWNDLLQE NFERCFYVPK
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 NKEDDNKFEI DATIINRRGI YKDLYRSGKP YEDYQFRPNF TIAMVVAPEL FTPDYAAGAI
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 ELADQVLRGP VGMRTLDPST YNYRPPYNNG EDSDDFATSK GRNYHQGPEW VWCYGYFIRA
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 YHYFNFLTNP KCQVEGSAKK LKPSSYLKRYK LYSRLLKHRE WIENSPWAGL AELTNKDGEV
 1510 1520
 CNDSSPTQAW STGCLLDLFY DLWISYEE

	CgGDE-(His) ₆	CgGDE
Αριθμός αμινοξέων	1534	1528
Μοριακή μάζα	175.09	174.27
Θεωρητικό <i>pI</i>	5.54	5.44

Αμινοξύ	Σύνθεση
Ala (A) 87	5.7%
Arg (R) 74	4.8%
Asn (N) 76	5.0%
Asp (D) 110	7.2%
Cys (C) 22	1.4%
Gln (Q) 44	2.9%
Glu (E) 104	6.8%
Gly (G) 95	6.2%

His (H) 36	2.4%
Ile (I) 90	5.9%
Leu (L) 139	9.1%
Lys (K) 98	6.4%
Met (M) 31	2.0%
Phe (F) 69	4.5%
Pro (P) 77	5.0%
Ser (S) 110	7.2%
Thr (T) 72	4.7%
Trp (W) 27	1.8%
Tyr (Y) 76	5.0%
Val (V) 91	6.0%

hGDE (UniProtKB - P35573)

10 20 30 40 50 60
 MGHSKQIRIL LLNEMEKLEK TLFRLQGGYE LQFRLGPTLQ GKAVTVYTNV PFPGETFNRE

70 80 90 100 110 120
 KFRSLDWENP TEREDDSDKY CKLNQQSGS FQYYFLQGNE KSGGGYIVVD PILRVGADNH

130 140 150 160 170 180
 VLPLDCVTLQ TFLAKCLGPF DEWESRLRVA KESGYNMIHF TPLQTLGLSR SCYSLANQLE

190 200 210 220 230 240
 LNPDFSPPNR KYTWNDVGQL VEKLLKEWNV ICITDVVYNH TAANSKWIQE HPECAYNLVN

250 260 270 280 290 300
 SPHLKPAWVL DRALWRFSCD VAEGKYKEKG IPALIENDHH MNSIRKIWE DIFPKLKLWE

310 320 330 340 350 360
 FFQVDVNKAV EQFRRLLTQE NRRVTKSDPN QHLTIIQDPE YRRFGCTVDM NIALTTFIPH

370 380 390 400 410 420
 DKGPAAIEEC CNWFHKRMEE LNSEKHRLIN YHQEQAVNCL LGNVFYERLA GHGPKLGPVT

430 440 450 460 470 480
 RKHPLVTRYF TFPFEEIDFS MEESMIHLPN KACFLMAHNG WVMGDDPLRN FAEPGSEVYL

490 500 510 520 530 540
 RRELICWGDS VKLRYGNKPE DCPYLWAHMK KYTEITATYF QGVRLDNCHS TPLHVAEYML

550 560 570 580 590 600
 DAARNLQPNL YVVAELFTGS EDLDNVFVTR LGISSLIREA MSAYNSHEEG RLVYRYGGEP

610 620 630 640 650 660
 VGSFVQPCLR PLMPAIAHAL FMDITHDNEC PIVHRSAYDA LPSTTIVSMA CCASGSTRGY

670 680 690 700 710 720
 DELVPHQISV VSEERFYTKW NPEALPSNTG EVNFQSGIIA ARCAISKLHQ ELGAKGFIQV

730 740 750 760 770 780
YVDQVDEDIV AVTRHSPSIH QSVVAVSRTA FRNPKTSFY S KEVPQMCIPG KIEEVVLEAR
790 800 810 820 830 840
TIERNTKPYR KDENSINGTP DITVEIREHI QLNESKIVKQ AGVATKGPNE YIQEIEFENL
850 860 870 880 890 900
SPGSVIIIFRV SLDPHAQVAV GILRNHLTQF SPHFKSGSLA VDNADPILKI PFASLASRLT
910 920 930 940 950 960
LAELNQILYR CESEEKEDGG GCYDIPNWSA LKYAGLQGLM SVLAEIRPKN DLGHPFCNNL
970 980 990 1000 1010 1020
RSGDWMIDYV SNRLISRSRG IAIEVKGWLQA MFFYLKQIPR YLIPCYFDAI LIGAYTTLLD
1030 1040 1050 1060 1070 1080
TAWKQMSFV QNGSTFVKHL SLGVSQLCGV GKFPSPILS PALMDVPYRL NEITKEKEQC
1090 1100 1110 1120 1130 1140
CVSLAAGLPH FSSGIFRCWG RDTFIALRGI LLITGRYVEA RNIILAFAGT LRHGLIPNLL
1150 1160 1170 1180 1190 1200
GEGIYARYNC RDAVWWWLQC IQDYCKMVPN GLDILKCPVS RMYPTDD SAP LPAGTLDQPL
1210 1220 1230 1240 1250 1260
FEVIQEAMQK HMOGIQFRER NAGPQIDRNM KDEGFNITAG VDEETGFVYG GNRFNCGTWM
1270 1280 1290 1300 1310 1320
DKMGESDRAR NRGIPATPRD GSAVEIVGLS KSAVRWLLEL SKKNIFPYHE VTVKRHGKAI
1330 1340 1350 1360 1370 1380
KVSUDEWNRK IQDNFEKLFH VSEDPSDLNE KHPNLVHKRG IYKDSYGASS PWCYQLRPN
1390 1400 1410 1420 1430 1440
FTIAMVVAPE LFTTEKAWKA LEIAEKKLLG PLGMKTLDPD DMVYCGIYDN ALDNDNYNLA
1450 1460 1470 1480 1490 1500
KGFNYHQGPE WLWPIGYFLR AKLYFSRLMG PETTAKTIVL VKNVLSRHYV HLEERSPWKGL
1510 1520 1530
PELTNENAQY CPFSCETQAW SIATILETLY DL

	hGDE-(His) ₆	hGDE
Αριθμός αμινοξέων	1538	1532
Μοριακή μάζα	175.6	174.8
Θεωρητικό <i>pI</i>	6.38	6.31

Αμινοξύ Σύνθεση

Ala (A)	94	6.1%
Arg (R)	84	5.5%
Asn (N)	82	5.4%
Asp (D)	75	4.9%
Cys (C)	38	2.5%

Gln (Q)	56	3.7%
Glu (E)	108	7.0%
Gly (G)	96	6.3%
His (H)	45	2.9%
Ile (I)	91	5.9%
Leu (L)	148	9.7%
Lys (K)	83	5.4%
Met (M)	33	2.2%
Phe (F)	66	4.3%
Pro (P)	85	5.5%
Ser (S)	90	5.9%
Thr (T)	71	4.6%
Trp (W)	31	2.0%
Tyr (Y)	63	4.1%
Val (V)	93	6.1%

ScGDE (UniProtKB - Q06625)

10 20 30 40 50 60
MNRSLLLRLS DTGEPITSCS YGKGVLTLPF IPLPKDAPKD QPLYTVKLLV SAGSPVARDG

70 80 90 100 110 120
LVWTNCPDPH NTPFKRDKFY KKIIHSSFHE DDCIDLNVYA PGSYCFYLSF RNDNEKLETT

130 140 150 160 170 180
RKYYFVALPM LYINDQFLPL NSIALQSVVS KWLGSWEPI LSKIAAKNYN MVHFTPLQER

190 200 210 220 230 240
GESNSPYSIY DQLQFDQEHF KSPEDVKNLV EHIHRDLNML SLTDIVFNHT ANNSPWLVHEH

250 260 270 280 290 300
PEAGYNHITA PHLISAIELD QELLNFSRNL KSWGYPTELK NIEDLKFIMD GIKVHVLGSL

310 320 330 340 350 360
KLWEYYAVNV QTALRDIKAH WNDESNESES FPENIKDISS DFVKLASFVK DNVTEPNFGT

370 380 390 400 410 420
LGERNSNRIN VPKFIQLLKL INDGGSDDSE SSLATAQNIL NEVNLPLYRE YDDDVSEILE

430 440 450 460 470 480
QLFNRIKYLK LDDGGPKQGP VTVDVPLTEP YFTRFKGKDG TDYALANNGW IWNGNPLVDF

490 500 510 520 530 540
ASQNSRAYLR REVIVWGDCV KLRYGKSPED SPYLWERMSK YIEMNAKIFD GFRIDNCHST

550 560 570 580 590 600
PIHVGHEYFLD LARKYNPNLY VVAELFSGSE TLDCLFVERL GISSLIREAM QAWSEEEELSR

610 620 630 640 650 660
LVHKKHGRPI GSYKFVPMDD FSYPADINLN EEHCFNDSND NSIRCVSEIM IPKILTATPP
670 680 690 700 710 720
HALFMDCTHD NETPFKERTV EDTLPNAALV ALCSSAIGSV YGYDEIFPHL LNLVTEKRHY
730 740 750 760 770 780
DISTPTGSPS IGITKVKATL NSIRTSIGEK AYDIEDSEMH VHHQGQYITF HRMDVKSGKG
790 800 810 820 830 840
WYLIARMKFS DNDDPNETLP PVVLNQSTCS LRFSYALERV GDEIPNDDKF IKGIPTKLKE
850 860 870 880 890 900
LEGFDISYDD SKKISTIKLP NEFPQGSIAI FETQQNGVDE SLDHFIRSGA LKATSSLTLE
910 920 930 940 950 960
SINSVLYRSE PEEYDVSAGE GGAYIIPNFG KPVYCGLQGW VSVLRKIVFY NDLAHPLSAN
970 980 990 1000 1010 1020
LRNGHWALDY TISRLNYYS D EAGINEVQNW LRSRFRVKK LPSYLVPSYF ALIIGILYGC
1030 1040 1050 1060 1070 1080
CRLKAIQLMS RNIGKSTLFFV QLSMSTSIQM VSRMKSTSIL PGENVPSMAA GLPHFSVNYM
1090 1100 1110 1120 1130 1140
RCWGRDVFIS LRGMLLTTGR FDEAKAHILA FAKTLKHGLI PNLLDAGRNP RYNARDAAWF
1150 1160 1170 1180 1190 1200
FLQAVQDYVY IVPDGEKILQ EQVTRRFPLD DTYIPVDDPR AFSYSSTLEE IIEYELSRHA
1210 1220 1230 1240 1250 1260
KGIKFREANA GPNLDRVMTD KGFNVEIHVD WSTGLIHGGS QYNCGTWMDK MGESEKAGSV
1270 1280 1290 1300 1310 1320
GIPGTPRDGA AIEINGLLKS ALRFVIELKN KGLFKFSDVE TQDGGRIDFT EWNQLLQDNF
1330 1340 1350 1360 1370 1380
EKRYYPEDP SQDADYDVSA KLGVNRRGIY RDLYKSGKPY EDYQLRPNFA IAMTVAPELF
1390 1400 1410 1420 1430 1440
VPEHAIKAIT IADEVLRGPV GMRTLDPSTY NYRPPYNNGE DSDDFATSKG RNYHQGPPEW
1450 1460 1470 1480 1490 1500
WLYGYFLRAF HHHFKTSR CQNAAKEKPS SYLYQQLYR LKGHRKWIFE SVWAGLTEL
1510 1520 1530
NKDGEVCNDS SPTQAWSSAC LLDLFYDLWD AYEDDS

ScGDE

Αριθμός αμινοξέων	1536
Μοριακή μάζα	174.97
Θεωρητικό <i>pI</i>	5.48

Αμινοξύ Σύνθεση

Ala (A) 84 5.5%

Arg (R) 75 4.9%

Asn (N)	89	5.8%
Asp (D)	110	7.2%
Cys (C)	20	1.3%
Gln (Q)	41	2.7%
Glu (E)	94	6.1%
Gly (G)	93	6.1%
His (H)	41	2.7%
Ile (I)	96	6.2%
Leu (L)	148	9.6%
Lys (K)	86	5.6%
Met (M)	26	1.7%
Phe (F)	70	4.6%
Pro (P)	84	5.5%
Ser (S)	123	8.0%
Thr (T)	67	4.4%
Trp (W)	27	1.8%
Tyr (Y)	78	5.1%
Val (V)	84	5.5%

Στοίχιση αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ *rmGP*/*hlGP*

Στοίχιση 1: Στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας της *rmGP* (Uniprot-ID: P00489) ως προς της *hlGP* (Uniprot-ID: P06737). Με κίτρινο επισημαίνονται τα κατάλοιπα που απαρτίζουν το καταλυτικό κέντρο και την β-εσοχή του ενζύμου ενώ με πράσινο τα κατάλοιπα που απαρτίζουν το κέντρο αναστολής.

<i>rmGP</i>	1	MSRPLSDQEKRKQISVRGLAGVENVTTELKKNFNRLHFTLVKDRNVATPRDYFALAHTV	60
<i>hlGP</i>	1	.AK..T.....R...I..IV.....A.....S.....T.....	60
<i>rmGP</i>	61	RDHLVGRWIRTQQHYEYKDPKRIYYLSLEFYMGRTLQNTMVNLALENACDEATYQLGLDM	120
<i>hlGP</i>	61D.C..V.....I..G.Q.....I.....I	120
<i>rmGP</i>	121	EELEEIEEDAGLGN NGGLG RLAACFLDSMATLGLAAYGYGIRYEFGIQKICGGWQMEEA	180
<i>hlGP</i>	121 YRD...V...	180
<i>rmGP</i>	181	DDWLRYGNPWEKARPEFTLPVHFYGRVEHTSQGAKWVDTQVVLAMPYDTPVPGYRNNVNVN	240
<i>hlGP</i>	181S...M.....K...NT.T.I.....L.....M..T..	240
<i>rmGP</i>	241	TMRLWSAKAPNDFNLKDFNVGGYIQAVLDRNLAENISRVLV PNDN FEGKELRLKQ EYFV	300
<i>hlGP</i>	241R.....R.....D..... Y	300
<i>rmGP</i>	301	VAATLQDIIRRFKSSKFGCRDPVRTNFDAFPDKVAIQLNDRHPSLAIPELMRVLDLERL	360
<i>hlGP</i>	301A...STRGAG.V...Q.....A.....IF..I.K.	360
<i>rmGP</i>	361	DWDKAWEVTVKTCAYTN HTV PEALER WPVHLLLETLLPRHLQIIYEINQRFVLRVAAAFP	420
<i>hlGP</i>	361	P.S...L.Q.F... YD.V.K.....E.....KH.D.IV.L..	420
<i>rmGP</i>	421	GDVDRLRRMSLVEEGAVKRINMAHLCIAGSHAVNGVARIHSEILKKTIFKDFYELEPHKF	480
<i>hlGP</i>	421	K.....I..EGS.....V.....K...D.V.TKV...S...D..	480
<i>rmGP</i>	481	QNK TNG ITPRRWLVLCNPLAEIIAERIGEEYISDLDQLRKLLSYVDDEAFIRDVAKVKQ	540
<i>hlGP</i>	481	... YL.....L..K...D.VK..S..T..H.FLG.DV.L.EL.....	540
<i>rmGP</i>	541	ENKLFKFAAYLEREYKVHINPNSLFDVQV KR HEYKRQ LNCLHVITLYNRIKKEPNKFVV	600
<i>hlGP</i>	541SQF..T...K...S.M... YM.....D.K.LF.	600
<i>rmGP</i>	601	PRTVMIGGKAAPG V HMAKMIIKLITAIGDVVNHDVVGDRRLRVIFLENYRVSLAEKVIPA	660
<i>hlGP</i>	601	...I..... VSVA...N.M.SK.K.....	660
<i>rmGP</i>	661	ADLSEQISTAG TEASGTGNMKFM LNGALTIGTMDGANVEMAEAGEENFFIFGMRVEDVD	720
<i>hlGP</i>	661	T..... YL.....ID..A	720
<i>rmGP</i>	721	RLDQRGYNAQEYYDRIPELRQIIIEQLSSGFFSPKQPDLFKDIVNMLMHHD R KVFADYEE	780
<i>hlGP</i>	721	A..KK..E.K...EAL...KLV.D.IDN.....I..FY.. YA	780
<i>rmGP</i>	781	YVKCQERVSAlyKNPREWTRMVIRNIATSGKFSSDRRTIAQYAREIWGVEPSRQRLPAPDE	840
<i>hlGP</i>	781DK..Q..M..KA.NT..LK...A.....KE..QN..N...DLKISLSN..	840

Consensus	XXNXXLYRXXEEX--XXXXXGXYPXXXXXXYGLQGXSXXXIXXNDLHPXXXNLRGXWXXDYXXRL--XXXXXXXXXEVXXWLXXXXXXXXKX
CgGDE [UniProtKB: Q6FSK0] ScGDE [UniProtKB-ID: Q06625] pGDE [UniProt...: A0A287B3F4] hGDE [UniProtKB-ID: P35573] rGDE [UniProtKB-ID: P35574]	<p>1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100</p> <p>SINYYLVYRAEQLVEEYDVSSEGRSAYDIPDYGKPVYGLQGWVYILRKEIFVNDLHAFPLSNLNRNGHWAVDVYVNVLDLYKDKEGVAEVEQEWLRSRHERIKQ 992</p> <p>SINSVLYRSEPEEYDVSAGEGGAYIIPNFAGKPVYGLQGWVYVLRKEIFVNDLHAFPLSNLNRNGHWAHDVYVNVYDSEAGINEVQNWLRFRDRVKK 1000</p> <p>ELNQVLYRCESEE--QEDGGGCVNIPNWSPLKYAGLQGLMSVMAEIRPKNDLGHFFCDNLRSGDWMIIDVYSNRL--ISRSGTIAEVGKWLQAMFFYLKQ 1006</p> <p>ELNQVLYRCESEE--QEDGGGCVNIPNWSALKYAGLQGLMSVLAERPKNDLGHFFCDNLRSGDWMIIDVYSNRL--ISRSGTIAEVGKWLQAMFFYLKQ 997</p> <p>ETINQVLYRCESEE--QEDGGGCVNIPNWSLKYAGLQGLMSVLAERPKNDLGHFFCDNLRSGDWMIIDVYSGRLL--ISRSGTIAEVGKWLQAMFFYLKQ 1202</p>
Consensus	XPYLPXPFXXXXXXXXXYXXXXXAXXXMSXXXXXXXXXFXVXLXXSQXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXK-----XXXXXXXXXAAAGLPHF
CgGDE [UniProtKB: Q6FSK0] ScGDE [UniProtKB-ID: Q06625] pGDE [UniProt...: A0A287B3F4] hGDE [UniProtKB-ID: P35573] rGDE [UniProtKB-ID: P35574]	<p>1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200</p> <p>LPSYLVPSFFALVVGIMYGCCRLRAMQLMSDNVKGSTVVFVQSLAMTSIQM-----VSAAMKSTILPDQNIAMAAGLPHF 1067</p> <p>LPSYLVPSYFALIIIGILYGCCRLKAIQLMSRNIIGKSTLFLVQSLAMTSIQM-----VSRMKSTILPDGENVPSMAAGLPHF 1075</p> <p>IPRYLIPCYFDAILIGAYTLLDIAWQMSDFVQNGSTFVKHLSLGSVQMGCVGVRFPSPPLPSPLTDVPPYRLNEITREK-----EQCCVSLAAGLPHF 1100</p> <p>IPRYLIPCYFDAILIGAYTLLDIAWQMSDFVQNGSTFVKHLSLGSVQMGCVGVRFPSPPLPSPALMDVPPYRLNEITREK-----EQCCVSLAAGLPHF 1091</p> <p>IPRYLIPCYFDAILIGAYTLLDIAWQMSDFVQNGSTFVKHLSLGSVQMGCVGVRFPSPPLPSPLTDVPPYRLNEITREK-----EQCCVSLAAGLPHF 1114</p>
Consensus	SXXXXXXXXRCWRDRFI LRG LL TGRXXEAXXILAFATL HGLIPNLLXGXRYN RDA WXXQXXQDYXXVXPXGX LXXXV RXXPXXDDX-X P
CgGDE [UniProtKB: Q6FSK0] ScGDE [UniProtKB-ID: Q06625] pGDE [UniProt...: A0A287B3F4] hGDE [UniProtKB-ID: P35573] rGDE [UniProtKB-ID: P35574]	<p>1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300</p> <p>STNYHRCWRDRVFISLRGLLITGRYEAEKEHILFAKTLKHGLIPNLLDAGRNRYNARDAAWFFVQATQDYVTIVPQVSLLEQEVTRRFPDDEVIP 1167</p> <p>SVNYHRCWRDRVFISLRGLLITGRFDEAKAHILFAKTLKHGLIPNLLDAGRNRYNARDAAWFFLQAVQDYVYVDPDGEKIQEQVTRRFPDDEVIP 1175</p> <p>SSGIFRCWRDRVFIALRGLLITGRYLEARNIILAFAGTLRHGLIPNLLGEGTHARYNCRDAVWWWLQCTQDYCKMVFNGLDIICKCPVSRMYPDTS-VP 1199</p> <p>SSGIFRCWRDRVFIALRGLLITGRYEARNIILAFAGTLRHGLIPNLLGEGIYARYNCRDAVWWWLQCTQDYCKMVFNGLDIICKCPVSRMYPDTS-AP 1190</p> <p>SSGIFRCWRDRVFIALRGLLITGRYLEARNIILAFAGTLRHGLIPNLLGEGTVIARYNCRDAVWWWLQCTQDYCKMVFNGLDIICKCPVSRMYPDTS-AP 1213</p>
Consensus	XX--AXXXXXXXXXXIXEXXXXHXGXIRE NAGPXXDR M D GFXXXXVXXXXTGXXXXGGXXNCGTWMDKMGESXXAXXXG P TPRDG A EIX
CgGDE [UniProtKB: Q6FSK0] ScGDE [UniProtKB-ID: Q06625] pGDE [UniProt...: A0A287B3F4] hGDE [UniProtKB-ID: P35573] rGDE [UniProtKB-ID: P35574]	<p>1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400</p> <p>YDDPKAFYSYSTIEEIIYVILNRHAGGIKYREANAGPNLDRVMKDEGFNVVFNVDWETGLIHGGSQVFCGTWMDKMGESKANSVQVPGTFRDGAIVEIN 1267</p> <p>YDDPKAFYSYSTIEEIIYVILSRHAKGIKFRANAGPNLDRVMKDEGFNVVFNVDWETGLIHGGSQVFCGTWMDKMGESKAGSVQVPGTFRDGAIVEIN 1275</p> <p>LS--AGTLDQPLFEVIQEQAMQKHMGIQFRERNAAGPIIDRNMKDEGFNITAGVDEETGFVYGGNRFNCGTWMDKMGESDRARNRGIIPATPRDGSAVEIV 1296</p> <p>LP--AGTLDQPLFEVIQEQAMQKHMGIQFRERNAAGPIIDRNMKDEGFNITAGVDEETGFVYGGNRFNCGTWMDKMGESDRARNRGIIPATPRDGSAVEIV 1287</p> <p>LP--AGTLDQPLFDVIQEQAMQKHMGIQFRERNAAGPIIDRNMKDEGFVIAGVNEETGFVYGGNRFNCGTWMDKMGESDRARNRGIIPATPRDGSAVEIV 1310</p>
Consensus	GLKXSXRXXXXLXXXXFXXXXXVXXXXXXXXXXXXXXXXXWXXXXQXXFEXXXXVXXXXXXXXXX--XXXXXXXX-XXRGXYDYXXPXXDYQXRPNFIA
CgGDE [UniProtKB: Q6FSK0] ScGDE [UniProtKB-ID: Q06625] pGDE [UniProt...: A0A287B3F4] hGDE [UniProtKB-ID: P35573] rGDE [UniProtKB-ID: P35574]	<p>1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500</p> <p>GLLKSCLRFVYLQSKDQKFKYTEVTKP---DGSKISLSLWNDLLENFERCFVVPKNKEDDNKFEIDATI-INRRGIYKDLVRSQKPYEDYQFRPNTFIA 1363</p> <p>GLLKSALRFVIELKNGKLFKFSQVETQ---DGGRIDFTFENWQLQDNFEKRYVVPEDPSQADVDVSAKLGVNRRIYRDLVYKSGKPYEDYQFRPNTFIA 1372</p> <p>GLSKSAVRWLLLELSSKNIFPYHEVTVKRHGKAVVRSYDEWNRKIQDHFKEFFVSEDPDNLN--EKHPNL-VHKRGIYKDSYGASSPWCQDYQLRPNFTIA 1393</p> <p>GLSKSAVRWLLLELSSKNIFPYHEVTVKRHGKAVVRSYDEWNRKIQDHFKEFFVSEDPDNLN--EKHPNL-VHKRGIYKDSYGASSPWCQDYQLRPNFTIA 1384</p> <p>GLCKSTVRWLLLELSSKNIFPYHEVTVKRHGKAVVRSYDEWNRKIQDHFKEFFVSEDPDNLN--EKHPNL-VHKRGIYKDSYGASSPWCQDYQLRPNFTIA 1407</p>
Consensus	MVAPELFXXXAXXAXXAXXLPXGXGN TLDP DXXYXXYXND DXXXXXKGNYHQGPEWXXGYFRAXXXFXXXXXXXXXXX-----
CgGDE [UniProtKB: Q6FSK0] ScGDE [UniProtKB-ID: Q06625] pGDE [UniProt...: A0A287B3F4] hGDE [UniProtKB-ID: P35573] rGDE [UniProtKB-ID: P35574]	<p>1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600</p> <p>MVVAPELFTPDYAAGAIELADQVLRGVPVGMRTLDPSDNYRPPYNNGEDSDDFATSKGRNYHQGPEWVWCGYGFIRAYHYFNFLTNPKCQVEGSAKLLK 1463</p> <p>MTVAPELFTVPEHAIAKAITIADQVLRGVPVGMRTLDPSDNYRPPYNNGEDSDDFATSKGRNYHQGPEWVWCGYGFIRAFHFFHFKTSRRCQ---NAAKEKP 1469</p> <p>MVVAPELFTIERAWKALEIAEKKLLGLPLMKTLDPDDHVVYCGIYDNDNDNYNLAAGFNHYHQGPEWVWCGYGFIRAKLYFSLKMGPEATAK----- 1485</p> <p>MVVAPELFTTEKAWKALEIAEKKLLGLPLMKTLDPDDHVVYCGIYDNDNDNYNLAAGFNHYHQGPEWVWCGYGFIRAKLYFSLKMGPEATAK----- 1476</p> <p>MVVAPELFTTEKAWKALEIAEKKLLGLPLMKTLDPDDHVVYCGIYDNDNDNYNLAAGFNHYHQGPEWVWCGYGFIRAKLYFSLKMGPEATAK----- 1499</p>
Consensus	---XXXXXXXXXXLXHXXXXXSXWGLXELTNXXXXXSXXTQAWSXXXXLXXXXDL-----
CgGDE [UniProtKB: Q6FSK0] ScGDE [UniProtKB-ID: Q06625] pGDE [UniProt...: A0A287B3F4] hGDE [UniProtKB-ID: P35573] rGDE [UniProtKB-ID: P35574]	<p>1610 1620 1630 1640 1650 1660</p> <p>SSYLYRKLKYSRLKHKREWITENSPWAGLAEITNKDGEVNDNSPTQAWSSTGCLDLDFYDLWISYEE-- 1528</p> <p>SSYLYQQLYRLLKGRKWIIFESVWAGLAEITNKDGEVNDNSPTQAWSACCLDLDFYDLWDAVEDDS 1536</p> <p>---TIFLVKNVLSRHYVHLERSPWKGLPELTNENGOYCFPFCETQAWSIATIIETLHDL----- 1541</p> <p>---TIFLVKNVLSRHYVHLERSPWKGLPELTNENGOYCFPFCETQAWSIATIIETLYDL----- 1532</p> <p>---TIFLVKNVLSRHYVHLERSPWKGLPELTNENGOYCFPFCETQAWSIATIIETLYDL----- 1555</p>

Βελτιστοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του *GDE* για έκφραση στο σύστημα έκφρασης *E. coli*

Στοιχισμός 3: Σύγκριση της αλληλουχίας που κωδικοποιεί για το *hGDE* μετά (κόκκινο) και πριν (μαύρο) τη βελτιστοποίηση.

Optimized 7	ATGGGT CATAGCAAAACAATCCG TATC CTGCTG CTGAAC GAGATGGAGAAGCTGGAGAAG
Original 7	ATGGGACACAGTAAACAGATTCCGAATTTACTTCTGAACGAAATGGAGAACTGGAAAAAG
Optimized 67	ACC CTGTTTCGCCTG GAACAAG GTACGCTG CGATT CCGCTGGGTCGGACCC TCGAA
Original 67	ACCCTCTCAGACTTGAACAAGGTATGAGCTACAGTTCGGATTAGGCCCAACTTTACAG
Optimized 127	GGCAAGCGGT GACCGTTTACACCAACTATCCG TTT CCGGGTGAAACCTTCAACCGTGAG
Original 127	GGAAAAGCAGTACCGGTATACAAATTACCCATTTCTGGAGAAACATTTAATAGAGAA
Optimized 187	AAAT TTTCGTAGC CTG GACTGGGAGAACCGACCGAGCCTG AGAG CGATAGCGATAAATAC
Original 187	AAATTCGGTTCTCTGGATTGGGAAAATCCAACGAAAGAGAAGATGATTCTGATAAATAC
Optimized 247	TGCAAGCTGAAC CTG CAGCAAAGCGGCAGCTTTCAGTACTATTTCTCGAGGGTAACGAA
Original 247	TGTAAACTTAATCTGCAACAATCTGGTTCATTTTCAGTATTTCTTCTCAAGGAAATGAG
Optimized 307	AAGAGCGGTGGCGGTTATATTTGGT TGAC CCGATCCTGCGTGTGGGCGGGACAACCAC
Original 307	AAAAGTGGTGGAGTTACATAGTTGGACCCCATTTTACGTGTTGGTGTGATAATCAT
Optimized 367	GTTCTGCCGCTGGATTGGCTGACCTG CAG ACCTTCTGGCGAAGTGCCTGGTCCGTTT
Original 367	GTGCTACCTTGGACTGTGTTACTCTCAGACATTTTACGTAAGTGTGGGACCTTTT
Optimized 427	GAT GAGTGGGAAAGCGCTGCTGCTG TT GCGAAAGAGAGCGGCTACAACATGATCCACTTT
Original 427	GATGAATGGGAAAGCAGACTTAGGGTTGCAAAAAGAAATCAGGCTACAACATGATTCATTTT

Optimized 487
Original 487
ACCCCGCTGCAGACCCTGGGTCTGAGCCGTAGCTGCTATAGCCTGGCGAACCAACTGGAA
ACCCCATTCGAGACTCTTGGACTATCTAGGTGCTACTCCCTTGCCAATCAGTTAGAA

Optimized 547
Original 547
CTGAACCCGACTTTAGCCGTCGGAACCGTAAATACACCTGGAACGATGTGGGTGAGCTG
TTAAATCTGACTTTTCAAGACCTAATAGAAAGTATACCTGGAATGATGTTGGACAGCTA

Optimized 607
Original 607
GTTGAAAAGCTGAAGAAAGAGTGGAAACGTTATCTGCATTACCGACGTGGTTTACAACCAC
GTGAAAAAATTAAGAAAGGAATGGAATGTTATTTGATTACTGATGTTGTCTACAATCAT

Optimized 667
Original 667
ACCGCGGCGAACAGCAAGTGGATCCAAAGAACACCCGGAGTGGCGGTATAACCTGGTTAAC
ACTGCTGCTAATAGTAAATGGATCCAGGAACATCCAGAATGTGCCTATAATCTTGTGAAT

Optimized 727
Original 727
AGCCCGCACCTGAAACCCGGCTGGGTGCTGGACCGTGGCGTGTGGCGTTTACGCTGGAT
TCTCCACACTTAAACCTGCCTGGGTCTTAGACAGGACTTTGGCGTTTCTCCTGTGAT

Optimized 787
Original 787
GTGGCGGAGGGTAAGTACAAAAGAGAGGGCATCCCGGCGCTGATTGAGAACGACCACAC
GTTGCAGAAAGGAAATACAAAGAAAAGGAATACCTGCTTTGATTGAAAATGATCACCAT

Optimized 847
Original 847
ATGAACAGCATTCGTAAGATCATTGGGAGGATATCTTCCGAAACTGAAGCTGTGGGAA
ATGAATCCATCCGAAAATAATTTGGGAGGATATTTTCCAAAGCTTAAACTCTGGGAA

Optimized 907
Original 907
TTCTTTCAGGTGGATGTTAAACAAGCGGTTGAGCAGTTTCGTCGCTGCTGACCCAAGAA
TTTTTCCAAGTAGATGTCAACAAAGCGGTTGAGCAATTTAGAAGACTTCTTACACAAGAA

Optimized 967
Original 967
AACCGTCGTGTGACAAAAGCGACCCGAACAGCACCTGACCATCATTCAAGATCCGAAA
AATAGCGAGTAACCAAGTCTGATCCAAACCAACACCTTACGATTATTCAAGATCCTGAA

Optimized 1027
Original 1027
TACCGTCGTTTCGGCTGCACCGTTGACATGAACATTGCGCTGACCACCTTTATCCCGCAC
TACAGACGGTTTGGCTGTACTGTAGATATGAACATTGCTACTAACGACTTTCATACCACAT

Optimized 1087
Original 1087
GATAAAGTCCGGCGCGGATCGAGGAATGCTGCAACTGGTCCACAAACGATGGAGGAA
GACAAGGGGCCAGCAGCAATTGAAGAATGCTGTAATTGGTTTCATAAAAAGAAATGGAGGAA

Optimized 1147
Original 1147
CTGAACAGCGAGAAGCACCGTCTGATTAACACCACCAGGAAACAAGCGTTAACTGCCTG
TTAAATTCAGAGAAGCATCGACTCATTAACATCATCAGGAACAGGCAGTTAATTGCCTT

Optimized 1207
Original 1207
CTGGGCAACGTGTTTTATGAACGTCTGCGGGTCATGGTCCGAAAACGGGTCCGGTTACC
TTGGGAAATGTGTTTTATGAACGACTGGCTGGCCATGGTCCAAAACCTAGGACCTGTCACT

Optimized 1267
Original 1267
CGTAAGCACCCGCTGGTGACCGTTACTTACCTTTCCGTTTCGAGGAAATCGACTTCAGC
AGAAAAGCATCTTTAGTTACCAGGTATTTTACTTTCCCATTTGAAGAGATAGACTTCTCC

Optimized 1327
Original 1327
ATGGAGGAAAGCATGATTACCTGCGGAACAAGGCGTCTTTCTGATGGCGACAACGGT
ATGGAAGAATCTATGATTCTGCCAAATAAAGCTTGTTTCTGATGGCACACAATGGA

Optimized 1387
Original 1387
TGGGTGATGGGGACGATCCGCTGCGTAACTTCGCGGAACCGGGCAGCGAGGTTTATCTG
TGGGTAATGGGAGATGATCCTTTCGAAACTTTGCTGAACCGGTTTCAGAAAGTTACCTA

Optimized 1447
Original 1447
CGTCGTGAGCTGATCTGCTGGGGGACAGCGTGAACCTGCGTTACGGTAACAAGCCGAG
AGGAGAGAACTTATTGTCTGGGAGACAGTGTTAAATTACGCTATGGGAATAAACCAGAG

Optimized 1507
Original 1507
GATTGCCCGTATCTGTGGGCGCACATGAAGAAATACCCGAAATCACCGCGACCTATTTT
GACTGTCTTATCTCTGGGCACACATGAAAAATACACTGAAATAACTGCAACTTATTTT

Optimized 1567
Original 1567
CAGGGTTCGTCGACAACTGCCACAGCACCCCGCTGCATGTGGCGGAAATACATGCTG
CAGGGAGTACGTCCTGATAACTGCCACTCAACACCTTTCAGTAGCTGAGTACATGTTG

Optimized 1627
Original 1627
GATCGGGCGGTAACCTGCAACCGAACCTGTATGTGGTTGCGGAACTGTTACCGGCAGC
GATGCTGCTAGGAATTTGCAACCAATTTATATGTAAGTACTGAACTGTTACAGGAAGT

Optimized 1687
Original 1687
GAGGACCTGATAACGTTTGTACTCCGCTGCGGTATCAGCAGCCTGATTCTGAGGCG
GAAGATCTGGACAATGCTTTGTTACTAGACTGGGCATTAGTTCTTAATAAGAGAGGCA

Optimized 1747
Original 1747
ATGAGCGCTACAACAGCCAGGAGAAAGCCGCTCTGGTGTACCGTTATGGCGGTGAACCG
ATGAGTGCATATAATAGTCATGAAGAGGGCAGATTAGTTTACCGATATGGAGGAGAACCT

Optimized 1807
Original 1807
GTGGGTAGCTTCTTCAACCGTGCCTGCGTCCGCTGATGCCGCGATTGCGCATGCGCTG
GTTGGATCCTTTGTTACGCCCTGTTTGGAGCCCTTAATGCCAGCTATTGCACATGCCCTG

Optimized 1867
Original 1867
TTTATGGACATCACCCACGATAACGAGTGCCCGATTGTTACCGTAGCGCGTATGACGCG
TTTATGGATATTACGCATGATAATGAGTGTCTATTGTGCATAGATCAGCGTATGATGCT

Optimized 1927
Original 1927
CTGCCGAGCACCACTCGTGAGCATGGCTGTGCGGAGCGGTAGCACCCGTGGCTAC
CTTCCAAGTACTACAATGTTTCTATGGCATGTTGTGCTAGTGAAGTACAAGAGGCTAT

Optimized 1987
Original 1987
GATGAACTGGTTCCGCACAGATTAGCGTGGTTAGCGAGGAACGTTTCTATACCAAATGG
GATGAATTAGTGCCTCATCAGATTTAGTGGTTTCTGAAGAACGGTTTTACACTAAGTGG

Optimized 2047
Original 2047
AACCCGGAGGCGCTGCCGAGCAACACCCGGCAAGTGAACCTTCAGAGCGGTATCATTGCG
AATCCTGAAGCATTGCCTTCAAACACAGGTGAAGTTAATTTCCAAAGCGCATTATTGCA

Optimized 2107
Original 2107
GCGCGTTGCGCGATCAGCAAACCTGCACCAAGAGCTGGGTGCGAAGGGCTTCATTCAGGTG
GCCAGGTGTGCTATCAGTAAACTTCATCAGGAGCTGGAGCCAAGGGTTTTATTCAGGTG

Optimized 2167
Original 2167
TACGTTGACCAAGTTGACGAAGATATCGTGGCGGTTACCCGTCACAGCCCGAGCATTAC
TATGTGGATCAAGTTGATGAAGACATAGTGGCAGTAACAAGACACTCACCTAGCATCCAT

Optimized 2227
Original 2227
CAGAGCGTGGTTGCGGTTAGCCGTACCCGTTCCGTAACCCGAAAACCAGCTTTTACAGC
CAGTCTGTTGTGGCTGTATCTAGAAGTCTTTCAGGAATCCCAAGACTTCATTTTACAGC

Optimized 2287
Original 2287
AAAGAGGTGCGCAAATGTGCATCCCGGGCAAGATTGAGGAAAGTGTCTGGAAGCGCGT
AAGGAAGTGCCTCAAATGTGCATCCCTGGCAAATGAAGAAGTAGTTCTTGAAGCTAGA

Optimized 2347
Original 2347
ACCATCGAGCGTAACACCAAACCGTATCGTAAGGACGAAAACAGCATTAAACGGTACCCCG
ACTATTGAGAGAAACACGAAACCTTATAGGAAGGATGAGAATTCAATCAATGGAACACCA

Optimized 2407
Original 2407
GATATCACCGTGGAAATTCGTGAGCACATCCAGCTGAACGAGAGCAAAATCGTGAAGCAA
GATATCACAGTAGAAATTAGAGAACATATTCAGCTTAATGAAAGTAAAATTTAAACAA

Optimized 2467
Original 2467
GCGGGTGTTCGACCAAAGGCCGAACGAATACATCCAGGAGATTGAATTCGAGAACCTG
GCTGGAGTTGCCACAAAAGGCCCAATGAATATATTCAAGAAATAGAATTTGAAAACCTG

Optimized 2527
Original 2527
AGCCCGGTAGCGTGATCATTTTTCGTGTTAGCCTGGACCCGACCGCGAGGTGGCGGTT
TCTCCAGGAAGTGTATTATATTCAGAGTTAGTCTTGATCCACATGCACAAGTCGCTGTT

Optimized 2587
Original 2587
GGCATCTGCGTAACCACCTGACCCAAATTTAGCCCGCACCTTCAAAGCGGTAGCCTGGCG
GGAATTTGAAATCATCTGACACAATTCAGTCTCACTTTAAATCTGGCAGCCTAGCT

Optimized 2647
Original 2647
GTTGACAACGCGGATCCGATCCTGAAGATTCCGTTTTCGAGCCTGGCGAGCCGCTGACC
GTTGACAATGCAGATCCTATATTAATAATTCCTTTTGCCTTCTTGGCTCCAGATTAAT

Optimized 2707
Original 2707
CTGGCGGAGCTGAACCAGATCCTGTACCGTTGCGAAAGCGAGGAAAAGAGGACGGCGGT
TTGGCTGAGCTAAATCAGATCCTTTACCGATGTGAATCAGAAGAAAAGGAAGATGGTGA

Optimized 2767
Original 2767
GGCTGCTACGATATTCGAACTGGAGCGCGCTGAAATATGCGGGTCTGCAAGGCCTGATG
GGTGTCTATGACATACCAAACCTGGTCCAGCCCTTAAATATGCAGGCTCTTCAAGGTTAATG

Optimized 2827
Original 2827
AGCGTGTGGCGGAGATCCGTCCGAAAACGACCTGGGCCACCCGTTTTGCAACAACCTG
TCTGTATTGGCAGAAATAAGACCAAAGAATGACTTGGGGCATCCTTTTTGTAATAATTTG

Optimized 2887
Original 2887
CGTAGCGGTGACTGGATGATTGATTATGTTAGCAACCGTCTGATTAGCCGTAGCGGTACC
AGATCTGGAGATTGGATGATTGACTATGTCAGTAACCGGCTTATTTACAGATCAGGAAT

Optimized 2947
Original 2947
ATCGCGGAAAGTGGGCAAATGGCTGCAGCGATGTTCTTTTACCTGAAGCAAATTCGCGT
ATTGCTGAAGTTGGTAAATGGTTGCAGGCTATGTTCTTCTACCTGAAGCAGATCCCACGT

Optimized 3007
Original 3007
TACCTGATCCCGTGCTATTTTCGACGGATCCTGATTGGTGGCTATACCAACCTGCTGGAT
TACCTTATCCCATGTTACTTTGATGCTATATTAATTTGGTGCATATACCACTCTTCTGGAT

Optimized 3067
Original 3067
ACCGCGTGAAAACAGATGAGCAGCTTCGTTCAAACCGGCAGCACCTTTGTGAAGCACCTG
ACAGCATGGAAGCAGATGCAAGCTTTGTTGAGAAATGTTCAACCTTTGTGAAACACCTT

Optimized 3127
Original 3127
AGCCTGGTAGCGTGCAGCTGTGCGGTGTTGGCAAATTTCCGAGCCTGCCGATCCTGAGC
TCATTGGTTTCAGTCAACTGTGTGGAGTAGGAAAATTCCTTCCCTGCCAATTTCTTTCA

Optimized 3187
Original 3187
CCGGCGTGATGACGTTCCGTTACCGTCTGAACGAGATTACCAAGAAAGAGCAATGC
CCTGCCAATGGATGTACCTTATAGGTTAAATGAGATCACAAGAAAAGGAGCAATGT

Optimized 3247
Original 3247
TGGCTGAGCCTGGCGGGGCTGCGGCACTTCAGCAGCGGTATCTTTTCGTTGCTGGGGC
TGTTTTCTCTAGCTGCAGGCTTACCTCATTTTTCTTCTGGTATTTTCCGCTGCTGGGA

Optimized 3307
Original 3307
CGTGATACCTTCAATTGCGCTGCGTGGTATCCTGCTGATTACCGGCCGTTATGTTGAGGCG
AGGATACTTTTATTGCACCTTAGAGGTACTGCTGATTACTGGACGCTATGTAGAAGCC

Optimized 3367
Original 3367
CGTAACATCATTCTGGGCTTTGCGGGTACCCTGCGTCATGGCCTGATCCCGAACCTGCTG
AGGAATATTTTATGACTTTGCGGGTACCCTGAGGCATGGTCTCATTCTAATCTACTG

Optimized 3427
Original 3427
GGTGAAGGCATT**TACGCGCGTTATAACTGCCGTGACGCGG**GTGTGGTGGTGGCTGCAG**TGC**
GGTGAAGGAATTTATGCCAGATACAATTTGCTGGGATGCTGTGTGGTGGTGGCTGCAGTGT

Optimized 3487
Original 3487
AT**CCAAGACTACTGC**AAAATGGTT**CCGAACGGCCTGGAT**ATT**CTGA**AGT**GCCGGTGAGC**
ATCCAGGATTACTGTAAAATGGTTCCAATGGTCTAGACATTCTCAAGTGCCAGTTTCC

Optimized 3547
Original 3547
CGTATGTAT**CCGACCGATGATAGCGCGCGCTGCCGCGGGTACC**CTGGATCAG**CCGCTG**
AGAATGTATCCTACAGATGATTTGCTCCTTTGCCTGCTGGCACACTGGATCAGCCATTG

Optimized 3607
Original 3607
TTCGAAGTTATCCAGGAA**GCG**ATGCAA**AAG**CACATGCAGGGC**ATTCAATTT****TCGTGAGCGT**
TTTGAAGTCATACAGGAAGCAATGCAAAAACACATGCAGGGCATACAGTTCCGAGAAAG

Optimized 3667
Original 3667
AACGCGGGTCCGCAAATCGACCGTAACATG**AAAGAT**GAAGGTT**CAACATTACC****GCGGGC**
AATGCTGGTCCCAGATAGATCGAAACATGAAGGACGAAGGTTTTAATAACTGCAGGA

Optimized 3727
Original 3727
GTT**GACGAG**GAA**ACCGGTTTTCGTGTACGGTGGCAACCGT**TT**TA**ACT**GC**GGC**ACCT**GGATG
GTTGATGAAGAAACAGGATTTGTTTATGGAGGAAATCGTTTCAATTGTGGCACATGGATG

Optimized 3787
Original 3787
GACAAGAT**GGGGAGAGCGATCGTGC**CGCTAAC**CGTGGTATTCCGGCGACCCCGCGT**GAT
GATAAAATGGGAGAAAGTGACAGAGCTAGAAAACAGAGGAATCCAGCCACACCAAGAGAT

Optimized 3847
Original 3847
GGTAGCGCGGTGGAAAT**GTTGGTCTGAGCAAGAGCGCG**GTT**CGTTGGCTGCTGAGCTG**
GGGTCTGCTGTGGAAATGTGGGCTGAGTAAATCTGCTGTTCGCTGGTTGCTGGAATTA

Optimized 3907
Original 3907
AGCAAGAAA**AACATCTTCCCGTACCAC**GAA**GTGACCGTTAA**CGT**CACGGTAAAGCGATC**
TCCAAAAAATATTTTCCCTTATCATGAAGTCACAGTAAAAGACATGGAAAGGCTATA

Optimized 3967
Original 3967
AAG**GTGAGCTATGAC**GAGTGAAC**CGTAAGATCCAGGAT**AA**CTTC**GAAAAG**CTGTTCAC**
AAGGTCTCATATGATGAGTGAACGAAAAATACAAGACAACCTTTGAAAAGCTATTTTAT

Optimized 4027
Original 4027
GTT**AGCGAGGACCCGAGCGATCTGAAC**GAAAAG**CACCCGAACCTG****GTG**CACAAACGTGGC
GTTTCCGAAGACCCTTCAGATTTAAATGAAAAGCATCCAAATCTGGTTCACAAACGTGGC

Optimized 4087
Original 4087
ATCTACAAGGACAGCTAT**GGTGC**GAGCAG**CCCGTGGTGC**GAT**TACCA**ACT**CGCTCCGAAC**
ATATACAAAGATAGTTATGGAGCTTCAAGTCCCTGGTGTGACTATCAGTCCAGGCCTAAT

Optimized 4147
Original 4147
TTACCATCGCGAT**GGTGGTTGGCCGGA**ACT**GTTACC**CCGAGAA**GCGTGG**AAG**GCG**
TTTACCATAGCAATGGTTGTGGCCCTGAGCTCTTACTACAGAAAAAGCATGGAAAGCT

Optimized 4207
Original 4207
CTGGAAATTCGGGAGAAGAAACT**GCTGGTCCGCTGG**GCATGAAA**ACCCTGGACCCGGAC**
TTGGAGATTGCAGAAAAAAATGCTTGGTCCCCTGGCATGAAAACCTTTAGATCCAGAT

Optimized 4267
Original 4267
GATAT**GTGTACTGCGGTATCTATGATA**AC**CGCGTGGACA**AC**GATA**AACTACA**ACTGGCG**
GATATGGTTACTGTGGAATTTATGACAATGCATTAGACAATGACAACACTACAATCTTGCT

Optimized 4327
Original 4327
AAGGGCTTCAACTATC**AC**AGGGT**CCGGA**ATGGCTGTGG**CCGATCGGCTACTTCTG**CGT
AAAGGTTTCAATTATCACCAAGGACCTGAGTGGCTGTGGCCTATGGGTATTTCTTCTCGT

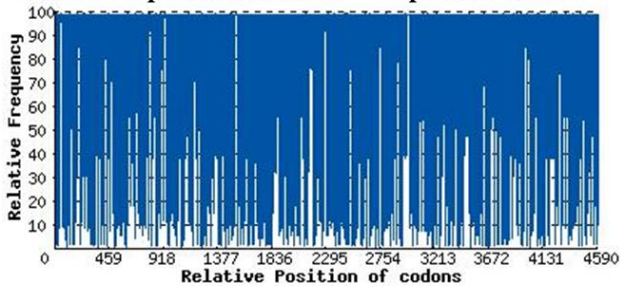
Optimized 4387
Original 4387
GCGAAACT**GATTTTTAGCGTCTG**AT**GGTCCG**GAA**ACC**CG**GAAA**ACC**ATTGTGCTG**
GCAAAATATATTTTTCCAGATTGATGGGCCGGAGACTACTGCAAAGACTATAGTTTTTG

Optimized 4447
Original 4447
GTT**AAGA**AC**GTTCTGAGCCGTCACTACGTGC**AC**CTGGA**AC**GTA**CC**CGTGG**AAA**GGTCTG**
GTTAAAAATGTTCTTTCCCGACATTATGTTTCTTTGAGAGATCCCTTTGAAAAGGACTT

Optimized 4507
Original 4507
CCGGAGCTGACC**AAC**GAG**AACGCG**CAG**TATTGCCGTTT**AG**CTGC**GAA**ACCA**AG**GCGTGG**
CCAGAACTGACCAATGAGAATGCCAGTACTGCTCTTTCAGCTGTGAAACACAAGCCTGG

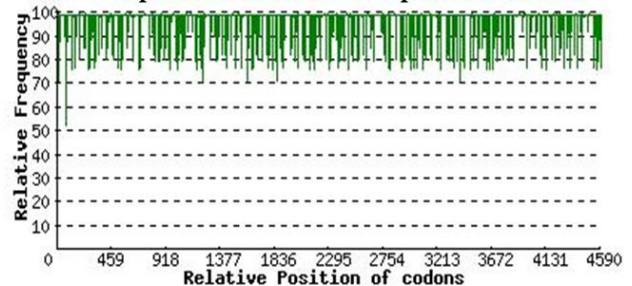
Optimized 4567
Original 4567
AGCATTGCGACC**ATCCTG**AAA**ACCCTG**TAT**GACCTG**
TCAATTGCTACTATTCTTGAGACACTTTATGATTTA

Before OptimumGene™ Optimization



Codon adaptation index: **0.33**

After OptimumGene™ Optimization

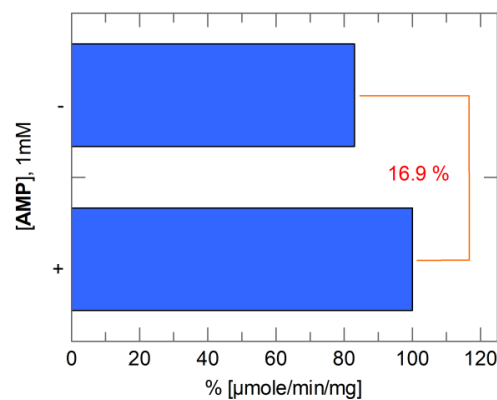
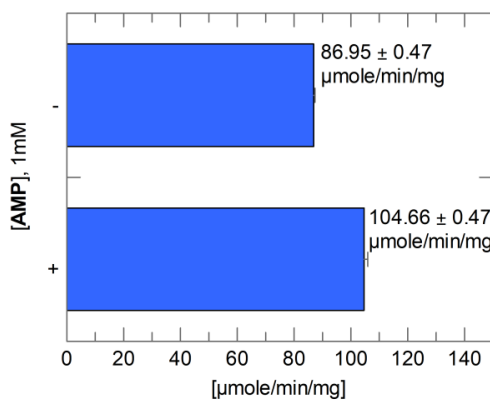


Codon adaptation index: **0.97**

Διάγραμμα 5: Παρουσιάζεται η κατανομή της συχνότητας χρήσης των σπάνιων κωδικονίων κατά το μήκος του γονιδίου. Η βέλτιστη τιμή που μπορεί να έχει το *CAI* είναι 1.0 αλλά και τιμές μεγαλύτερες του 0.8 οδηγούν σε ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης. Ο σχεδιασμός των διαγραμμάτων έγινε από την εταιρεία *GenScript*.

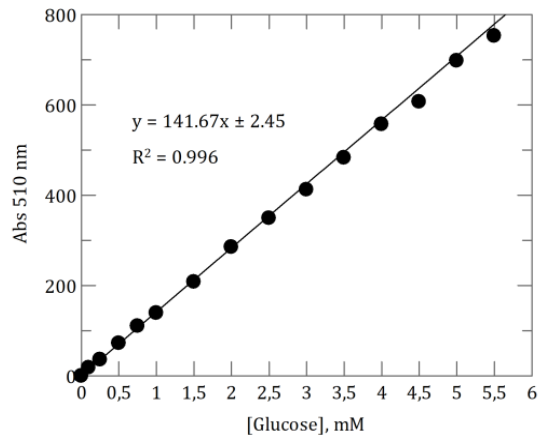
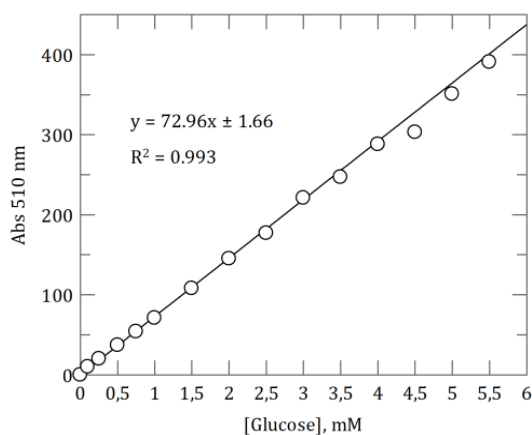
Φωσφορυλίωση *rmGPb* → *a*.

Η *rmGPa* εμφανίζει μια αύξηση της δραστηριότητας της τάξεως του 10 - 20 % [14] παρουσία της *AMP*, όπως επιβεβαιώνεται στο διάγραμμα 6.



Διάγραμμα 6: Η δραστηριότητα της *rmGPa* παρουσία και απουσία του αλλοστερικού ενεργοποιητή (*AMP*). Η δραστηριότητα της *rmGPa* παρουσία 1 mM *AMP*, 20 mM *G1P*, διαφέρει κατά ~17 %, όπως είναι αναμενόμενο από τη βιβλιογραφία [14].

Πρότυπες καμπύλες για τον ποσοτικό προσδιορισμό γλυκόζης με τη μέθοδο *GOD-POD*



Διάγραμμα 7: Οι πρότυπες καμπύλες που προσδιορίστηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό γλυκόζης με τη μέθοδο *GOD-POD*. **Αριστερά:** 10 μ L δείγμα + 1000 μ L αντιδραστήριο. **Δεξιά:** 10 μ L δείγμα + 500 μ L αντιδραστήριο.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AMP	Μονοφωσφορική αδενοσίνη
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BES	N,N-δισ (2-υδροξυαίθυλο)-2-αμινοαίθανοσουλφονικό οξύ
bGP	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου
CADD	Ανακάλυψη φαρμάκων κατευθυνόμενη από υπολογιστές
cAMP	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
CgGDE	Ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου από τον οργανισμό <i>Candida glabrata</i>
DMSO	Διμέθυλο σουλφοξείδιο
DTT	Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
FBDD	Σχεδιασμός φαρμάκων μέσω θραυσμάτων
FPLC	Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών
G1P	1-φωσφορική γλυκόζη
G6P	6-φωσφορική γλυκόζη
GC	Γλυκοζιτάση
GDE	Ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου
GP	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου
GPI	Αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου
GSD	Ασθένειες που σχετίζονται με την αποθήκευση του γλυκογόνου
GT	Γλυκοτρανσφεράση
hGDE	Ανθρώπινο ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου
hIGP	Ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου
hmGP	Ανθρώπινη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου
HTS	Διαλογή υψηλής απόδοσης
IMP	Μονοφωσφορική ινοσίνη
IPTG	Ισοπρόπυλο-θειο-γαλακτοζίτης
K_i	Σταθερά αναστολής
K_M	Σταθερά Michaelis-Menten
$K_{M(app)}$	Φαινομενική σταθερά Michaelis-Menten
MAD	Ανώμαλη περίθλαση σε πολλαπλά μήκη κύματος
NMR	Μαγνητικός πυρηνικός συντονισμός
PhK	Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου
PLP	Φωσφορική πυριδοξάλη
PP1	Πρωτεϊνική φωσφατάση 1
rmGDE	Ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων
rmGP	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων
rmPhK	Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων
SAD	Ανώμαλη περίθλαση σε ένα μήκος κύματος
SBDD	Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων
SDS	Δωδεκυκλοθειικό νάτριο

SGLT2	Συμμεταφορέας γλυκόζης-νατρίου 2
V_{\max}	Μέγιστη ταχύτητα
$V_{\max(\text{app.})}$	Φαινομενική μέγιστη ταχύτητα
β -CD	B-κυκλοδεξτρίνη
β -GP	Μετά νατρίου άλας της β -φωσφορική γλυκερόλη
ΣΔ	Σακχαρώδης διαβήτης

Συντμήσεις αμινοξέων

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

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Young, F.G., *Claude Bernard and the discovery of glycogen; a century of retrospect*. Br Med J, 1957. **1**(5033): p. 1431-7.
2. Cori, C.G. and G.T. Cori, *Polysaccharide phosphorylase*. Nobel Lectures, 1947.
3. Cori, C.F., S.P. Colowick, and G.T. Cori, *The isolation and synthesis of glucose-1-phosphoric acid*. J Biol Chem, 1937. **121**: p. 465-77.
4. Cori, C.F. and G.T. Cori, *Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new phosphate ester*. J Biol Chem, 1936. **34**: p. 702-705.
5. Adeva-Andany, M.M., et al., *Glycogen metabolism in humans*. BBA Clin, 2016. **5**: p. 85-100.
6. Roach, P.J., et al., *Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes*. Biochem J, 2012. **441**(3): p. 763-87.
7. Jiang, X., et al., *Molecular-size dependence of glycogen enzymatic degradation and its importance for diabetes*. European Polymer Journal, 2016. **82**: p. 175-180.
8. Tan, X., et al., *Proteomic Investigation of the Binding Agent between Liver Glycogen beta Particles*. ACS Omega, 2018. **3**(4): p. 3640-3645.
9. Beckett, G.J., *Lecture notes. Clinical biochemistry*. 7th ed. 2005, Malden, Mass., USA: Blackwell Pub. viii, 319 p.
10. Bollen, M., S. Keppens, and W. Stalmans, *Specific features of glycogen metabolism in the liver*. Biochem J, 1998. **336 (Pt 1)**: p. 19-31.
11. Youngren, J.F., *Regulation of insulin receptor function*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(7-8): p. 873-91.
12. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*. 7th ed. 2012, New York: W.H. Freeman. xxxii, 1054, 43, 41, 48 p.
13. Sun, R.C., et al., *Nuclear Glycogenolysis Modulates Histone Acetylation in Human Non-Small Cell Lung Cancers*. Cell Metab, 2019.
14. Coats, W.S., et al., *An engineered liver glycogen phosphorylase with AMP allosteric activation*. J Biol Chem, 1991. **266**(24): p. 16113-9.
15. Kilimann, M.W. and A. Oldfors, *Glycogen pathways in disease: new developments in a classical field of medical genetics*. J Inherit Metab Dis, 2015. **38**(3): p. 483-7.
16. Ellingwood, S.S. and A. Cheng, *Biochemical and clinical aspects of glycogen storage diseases*. J Endocrinol, 2018. **238**(3): p. R131-R141.
17. Kishnani, P.S., B. Sun, and D.D. Koeberl, *Gene therapy for glycogen storage diseases*. Hum Mol Genet, 2019. **28**(R1): p. R31-R41.
18. Laios, K., et al., *Aretaeus of Cappadocia and the first description of diabetes*. Hormones (Athens), 2012. **11**(1): p. 109-13.
19. Saeedi, P., et al., *Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition*. Diabetes Res Clin Pract, 2019. **157**: p. 107843.
20. Atkinson, M.A., G.S. Eisenbarth, and A.W. Michels, *Type 1 diabetes*. Lancet, 2014. **383**(9911): p. 69-82.

21. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Textbook of medical physiology*. 11th ed. 2006, Philadelphia: Elsevier Saunders. xxxv, 1116 p.
22. Rhodes, C.J., *Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death?* Science, 2005. **307**(5708): p. 380-4.
23. Rojas, J., et al., *Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy*. J Diabetes Res, 2018. **2018**: p. 9601801.
24. Bailey, C.J., *Biguanides and NIDDM*. Diabetes Care, 1992. **15**(6): p. 755-72.
25. Magnusson, I., et al., *Contribution of hepatic glycogenolysis to glucose production in humans in response to a physiological increase in plasma glucagon concentration*. Diabetes, 1995. **44**(2): p. 185-9.
26. Consoli, A., et al., *Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM*. Diabetes, 1989. **38**(5): p. 550-7.
27. Kerru, N., et al., *Current anti-diabetic agents and their molecular targets: A review*. Eur J Med Chem, 2018. **152**: p. 436-488.
28. Agius, L., *New hepatic targets for glycaemic control in diabetes*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2007. **21**(4): p. 587-605.
29. Oikonomakos, N.G., *Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy*. Curr Protein Pept Sci, 2002. **3**(6): p. 561-86.
30. Treadway, J.L., P. Mendys, and D.J. Hoover, *Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus*. Expert Opin Investig Drugs, 2001. **10**(3): p. 439-54.
31. Oikonomakos, N.G., et al., *Iminosugars as potential inhibitors of glycogenolysis: structural insights into the molecular basis of glycogen phosphorylase inhibition*. J Med Chem, 2006. **49**(19): p. 5687-701.
32. Fosgerau, K., et al., *Kinetic and functional characterization of 1,4-dideoxy-1, 4-imino-d-arabinitol: a potent inhibitor of glycogen phosphorylase with anti-hyperglycemic effect in ob/ob mice*. Arch Biochem Biophys, 2000. **380**(2): p. 274-84.
33. Andersen, B., et al., *Inhibition of glycogenolysis in primary rat hepatocytes by 1, 4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 545-50.
34. Chu, D.T., et al., *C57BL/6J mice as a polygenic developmental model of diet-induced obesity*. Physiol Rep, 2017. **5**(7).
35. Martin, W.H., et al., *Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1776-81.
36. Hoover, D.J., et al., *Indole-2-carboxamide inhibitors of human liver glycogen phosphorylase*. J Med Chem, 1998. **41**(16): p. 2934-8.
37. Jakobsen, P., et al., *Iminosugars: potential inhibitors of liver glycogen phosphorylase*. Bioorg Med Chem, 2001. **9**(3): p. 733-44.
38. Kantsadi, A.L., et al., *The sigma-hole phenomenon of halogen atoms forms the structural basis of the strong inhibitory potency of C5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b*. ChemMedChem, 2012. **7**(4): p. 722-32.
39. Kantsadi, A.L., et al., *The binding of C5-alkynyl and alkylfurano[2,3-d]pyrimidine glucopyranonucleosides to glycogen phosphorylase b: synthesis, biochemical and biological assessment*. Eur J Med Chem, 2012. **54**: p. 740-9.

40. Goyard, D., et al., *Glucose-based spiro-oxathiazoles as in vivo anti-hyperglycemic agents through glycogen phosphorylase inhibition*. *Org Biomol Chem*, 2020.
41. Nagy, L., et al., *Glycogen phosphorylase inhibition improves beta cell function*. *British Journal of Pharmacology*, 2018. **175**: p. 301-319.
42. Donnier-Maréchal, M. and S. Vidal, *Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review (2013 - 2015)*. *Expert. Opin. Ther. Pat.*, 2016. **26**(2): p. 199-212.
43. Begum, J., et al., *An evaluation of indirubin analogues as phosphorylase kinase inhibitors*. *J Mol Graph Model*, 2015. **61**: p. 231-42.
44. Zhai, L., et al., *Crystal structure of glycogen debranching enzyme and insights into its catalysis and disease-causing mutations*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 11229.
45. Kuriyama, C., et al., *In vitro inhibition of glycogen-degrading enzymes and glycosidases by six-membered sugar mimics and their evaluation in cell cultures*. *Bioorg Med Chem*, 2008. **16**(15): p. 7330-6.
46. Cori, G.T. and C.F. Cori, *The enzymatic conversion of phosphorylase a to b*. *J Biol Chem*, 1945. **158**: p. 321-332.
47. Green, A.A., ; Cori, G. T., *Crystalline muscle glycogen phosphorylase: I. preparation, properties, and molecular weight*. *J. Biol. Chem*, 1943. **151**: p. 21-29.
48. Rubin, R.P., *Carl and Gerty Cori: A collaboration that changed the face of biochemistry*. *Journal of Medical Biography*, 2019.
49. Livanova, N.B., et al., *Pyridoxal 5'-phosphate as a catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase B*. *Biochemistry (Mosc)*, 2002. **67**(10): p. 1089-98.
50. Monod, J., J. Wyman, and J.P. Changeux, *On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model*. *J Mol Biol*, 1965. **12**: p. 88-118.
51. Lukacs, C.M., et al., *The crystal structure of human muscle glycogen phosphorylase a with bound glucose and AMP: an intermediate conformation with T-state and R-state features*. *Proteins*, 2006. **63**(4): p. 1123-6.
52. Martin, J.L., et al., *Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: The design of potential drugs for diabetes*. *Biochemistry (USA)*, 1991. **30**(42): p. 10101-10116.
53. Rath, V.L., et al., *Activation of human liver glycogen phosphorylase by alteration of the secondary structure and packing of the catalytic core*. *Mol Cell*, 2000. **6**(1): p. 139-48.
54. Mathieu, C., et al., *Insights into Brain Glycogen Metabolism: THE STRUCTURE OF HUMAN BRAIN GLYCOGEN PHOSPHORYLASE*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(35): p. 18072-83.
55. Lillpopp, L., et al., *Prognostic information of glycogen phosphorylase isoenzyme BB in patients with suspected acute coronary syndrome*. *Am J Cardiol*, 2012. **110**(9): p. 1225-30.
56. Fischer, T., et al., *High Consistency of Structure-Based Design and X-Ray Crystallography: Design, Synthesis, Kinetic Evaluation and Crystallographic Binding Mode Determination of Biphenyl-N-acyl-beta-d-Glucopyranosylamines as Glycogen Phosphorylase Inhibitors*. *Molecules*, 2019. **24**(7).
57. Kantsadi, A.L., et al., *Synthetic, enzyme kinetic, and protein crystallographic studies of C-beta-d-glucopyranosyl pyrroles and imidazoles reveal and explain low nanomolar inhibition of human liver glycogen phosphorylase*. *Eur J Med Chem*, 2016. **123**: p. 737-745.

58. Kantsadi, A.L., et al., *van der Waals interactions govern C-beta-d-glucopyranosyl triazoles' nM inhibitory potency in human liver glycogen phosphorylase*. J Struct Biol, 2017. **199**(1): p. 57-67.
59. Johnson, L.N., et al., *Glycogen phosphoylase b in Allosteric Enzymes (Herve, G., ed) 1989*: CRC Press, Boca Raton, FL.
60. Barford, D. and L.N. Johnson, *The allosteric transition of glycogen phosphorylase*. Nature, 1989. **340**(6235): p. 609-16.
61. Fletterick, R.J. and S.R. Sprang, *Glycogen-Phosphorylase Structures and Function*. Accounts of Chemical Research, 1982. **15**(11): p. 361-369.
62. Kantsadi, A.L., et al., *Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of Vitis vinifera extracts against glycogen phosphorylase*. Food Chem Toxicol, 2014. **67**: p. 35-43.
63. Palm, D., et al., *The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis*. Biochemistry, 1990. **29**(5): p. 1099-107.
64. Johnson, L.N., S.H. Hu, and D. Barford, *Catalytic mechanism of glycogen phosphorylase*. Faraday Discuss, 1992(93): p. 131-42.
65. Johnson, L.N., et al., *Refined crystal structure of the phosphorylase-heptulose 2-phosphate-oligosaccharide-AMP complex*. J Mol Biol, 1990. **211**(3): p. 645-61.
66. Monod, J., J.P. Changeux, and F. Jacob, *Allosteric proteins and cellular control systems*. J Mol Biol, 1963. **6**: p. 306-29.
67. Κλώνης, Ι., *Ενζυμολογία*. 2007: Έμβροο. 211-250.
68. Johnson, L.N., *Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors*. FASEB J, 1992. **6**(6): p. 2274-82.
69. Martin, J.L., L.N. Johnson, and S.G. Withers, *Comparison of the binding of glucose and glucose 1-phosphate derivatives to T-state glycogen phosphorylase b*. Biochemistry, 1990. **29**(48): p. 10745-57.
70. Oikonomakos, N.G., et al., *Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34566-73.
71. Sprang, S.R., et al., *Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase b by adenosine monophosphate*. Science, 1991. **254**(5036): p. 1367-71.
72. Oikonomakos, N.G., et al., *A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions*. Structure, 2000. **8**(6): p. 575-84.
73. Pinotsis, N., et al., *The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies*. Protein Sci, 2003. **12**(9): p. 1914-24.
74. Chrysina, E.D., et al., *Kinetic and crystallographic studies on 2-(b-D-glucopyranosyl)-5-methyl-1,3,4-oxadiazole, -benzothiazole, and -benzimidazole, inhibitors of muscle glycogen phosphorylase b. Evidence for a new binding site*. Protein Science, 2005. **14**: p. 873-888.
75. Weaver, T.M., *The pi-helix translates structure into function*. Protein Sci, 2000. **9**(1): p. 201-6.
76. Oikonomakos, N.G., et al., *Activator anion binding site in pyridoxal phosphorylase b: The binding of phosphite, phosphate, and fluorophosphate in the crystal*. Protein Science, 1996. **5**(12): p. 2416-2428.

77. Hayes, J.M., A.L. Kantsadi, and D.D. Leonidas, *Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes*. *Phytochemistry Reviews*, 2014. **13**(2): p. 471-498.
78. Bokor, E., et al., *4(5)-Aryl-2-C-glucofuranosyl-imidazoles as New Nanomolar Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase*. *ACS Med Chem Lett*, 2015. **6**(12): p. 1215-9.
79. Bokor, E., et al., *Nanomolar Inhibitors of Glycogen Phosphorylase Based on beta-d-Glucosaminyl Heterocycles: A Combined Synthetic, Enzyme Kinetic, and Protein Crystallography Study*. *J Med Chem*, 2017. **60**(22): p. 9251-9262.
80. Kun, S., et al., *A multidisciplinary study of 3-(beta-D-glucofuranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazole derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors: Computation, synthesis, crystallography and kinetics reveal new potent inhibitors*. *European journal of medicinal chemistry*, 2018. **147**: p. 266-278.
81. Leonidas, D.D., N.G. Oikonomakos, and A.C. Papageorgiou, *Sulphate activates phosphorylase b by binding to the Ser (P) site*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1076**(2): p. 305-7.
82. Somsak, L., *Glucose derived inhibitors of glycogen phosphorylase*. *Comptes Rendus Chimie*, 2011. **14**(2-3): p. 211-223.
83. Somsak, L., et al., *Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments*. *Curr Pharm Des*, 2003. **9**(15): p. 1177-89.
84. Oikonomakos, N.G. and L. Somsak, *Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2008. **9**(4): p. 379-95.
85. Sprang, S.R., et al., *Catalytic site of glycogen phosphorylase: structure of the T state and specificity for alpha-D-glucose*. *Biochemistry*, 1982. **21**(21): p. 5364-71.
86. Papageorgiou, A.C., N.G. Oikonomakos, and D.D. Leonidas, *Inhibition of rabbit muscle glycogen phosphorylase by D-gluconohydroximo-1,5-lactone-N-phenylurethane*. *Arch Biochem Biophys*, 1989. **272**(2): p. 376-85.
87. Tsitsanou, K.E., V.T. Skamnaki, and N.G. Oikonomakos, *Structural basis of the synergistic inhibition of glycogen phosphorylase a by caffeine and a potential antidiabetic drug*. *Arch Biochem Biophys*, 2000. **384**(2): p. 245-54.
88. Madsen, N.B., S. Shechosky, and R.J. Fletterick, *Site-Site Interactions in Glycogen Phosphorylase-B Probed by Ligands Specific for Each Site*. *Biochemistry*, 1983. **22**(19): p. 4460-4465.
89. Tsitsanou, K.E., et al., *Sourcing the affinity of flavonoids for the glycogen phosphorylase inhibitor site via crystallography, kinetics and QM/MM-PBSA binding studies: comparison of chrysin and flavopiridol*. *Food Chem Toxicol*, 2013. **61**: p. 14-27.
90. Hampson, L.J., et al., *Bioactivity of glycogen phosphorylase inhibitors that bind to the purine nucleoside site*. *Bioorg Med Chem*, 2006. **14**(23): p. 7835-45.
91. Kosmopoulou, M.N., et al., *Binding of the potential antitumour agent indirubin-5-sulphonate at the inhibitor site of rabbit muscle glycogen phosphorylase b. Comparison with ligand binding to pCDK2-cyclin A complex*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(11): p. 2280-90.

92. Kyriakis, E., et al., *Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b*. FEBS Lett, 2015. **589**(15): p. 1787-94.
93. Jakobs, S., et al., *Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase*. Mol Nutr Food Res, 2006. **50**(1): p. 52-7.
94. Sprang, S., E. Goldsmith, and R. Fletterick, *Structure of the Nucleotide Activation Switch in Glycogen Phosphorylase-A*. Science, 1987. **237**(4818): p. 1012-1019.
95. Zographos, S.E., et al., *The structure of glycogen phosphorylase b with an alkylidihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor*. Structure, 1997. **5**(11): p. 1413-25.
96. Lu, Z., et al., *A new class of glycogen phosphorylase inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(22): p. 4125-8.
97. Ogawa, A.K., et al., *Glucose-lowering in a db/db mouse model by dihydropyridine diacid glycogen phosphorylase inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(20): p. 3405-8.
98. Rath, V.L., et al., *Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site*. Chem Biol, 2000. **7**(9): p. 677-82.
99. Larner, J., *Inositol, glycogen, insulin, and six nobelists*. J Biol Chem, 2013. **288**(17): p. 12313-24.
100. Van Holde, K.E., W.C. Johnson, and P.S. Ho, *Principles of physical biochemistry*. 2nd ed. 2006, Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall. xiii, 710, 27 p.
101. Fischer, E.H. and E.G. Krebs, *Muscle Phosphorylase-B*. Methods in Enzymology, 1962. **5**: p. 369-373.
102. Cori, G.T. and J. Larner, *Action of amylo-1,6-glucosidase and phosphorylase on glycogen and amylopectin*. J Biol Chem, 1951. **188**(1): p. 17-29.
103. Ritterson Lew, C., S. Guin, and D. Theodorescu, *Targeting glycogen metabolism in bladder cancer*. Nat Rev Urol, 2015. **12**(7): p. 383-91.
104. Bates, E.J., et al., *Debranching enzyme from rabbit skeletal muscle; evidence for the location of two active centres on a single polypeptide chain*. FEBS Lett, 1975. **58**(1): p. 181-5.
105. White, R.C. and T.E. Nelson, *Re-evaluation of the subunit structure and molecular weight of rabbit muscle amylo-1,6-glucosidase-4-alpha-glucanotransferase*. Biochim Biophys Acta, 1974. **365**(1): p. 274-80.
106. Taylor, C., et al., *Debranching enzyme from rabbit skeletal muscle. Purification, properties and physiological role*. Eur J Biochem, 1975. **51**(1): p. 105-15.
107. Gordon, R.B., D.H. Brown, and B.I. Brown, *Preparation and properties of the glycogen-debranching enzyme from rabbit liver*. Biochim Biophys Acta, 1972. **289**(1): p. 97-107.
108. Watanabe, Y., Y. Makino, and K. Omichi, *Activation of 4-alpha-glucanotransferase activity of porcine liver glycogen debranching enzyme with cyclodextrins*. J Biochem, 2006. **140**(1): p. 135-40.
109. Makino, Y. and K. Omichi, *Purification of glycogen debranching enzyme from porcine brain: evidence for glycogen catabolism in the brain*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(4): p. 907-15.

110. Nakayama, S. and Y. Nakamura, *Purification and Some Properties of Starch Branching Enzyme (Q-Enzyme) from Tuberos Root of Sweet-Potato*. *Physiologia Plantarum*, 1994. **91**(4): p. 763-769.
111. Song, H.N., et al., *Structural rationale for the short branched substrate specificity of the glycogen debranching enzyme GlgX*. *Proteins*, 2010. **78**(8): p. 1847-55.
112. Van, T.T.K., et al., *Cloning and characterization of glycogen-debranching enzyme from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae**. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007. **17**(5): p. 792-799.
113. Woo, E.J., et al., *Structural insight into the bifunctional mechanism of the glycogen-debranching enzyme TreX from the archaeon *Sulfolobus solfataricus**. *J Biol Chem*, 2008. **283**(42): p. 28641-8.
114. Ozen, H., *Glycogen storage diseases: new perspectives*. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(18): p. 2541-53.
115. Wu, J.Y., et al., *Expression of catalytically active human multifunctional glycogen-debranching enzyme and lysosomal acid alpha-glucosidase in insect cells*. *Biochem Mol Biol Int*, 1996. **39**(4): p. 755-64.
116. Rodriguez-Hernandez, M., et al., *Expression of a Functional Recombinant Human Glycogen Debranching Enzyme (hGDE) in *N. benthamiana* Plants and in Hairy Root Cultures*. *Protein Pept Lett*, 2020. **27**(2): p. 145-157.
117. Yang-Feng, T.L., et al., *Assignment of the human glycogen debrancher gene to chromosome 1p21*. *Genomics*, 1992. **13**(4): p. 931-4.
118. Bao, Y., et al., *Isolation and nucleotide sequence of human liver glycogen debranching enzyme mRNA: identification of multiple tissue-specific isoforms*. *Gene*, 1997. **197**(1-2): p. 389-98.
119. Bao, Y., T.L. Dawson, Jr., and Y.T. Chen, *Human glycogen debranching enzyme gene (AGL): complete structural organization and characterization of the 5' flanking region*. *Genomics*, 1996. **38**(2): p. 155-65.
120. Osterlund, B.R., et al., *Crystallization of glycogen debranching enzyme*. *J Mol Biol*, 1984. **174**(3): p. 557-9.
121. Scraba, D.G., et al., *Electron-Microscopy of Glycogen Degrading Enzymes*. *Febs Letters*, 1988. **240**(1-2): p. 133-138.
122. McNicholas, S., et al., *Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2011. **67**(Pt 4): p. 386-94.
123. Gillard, B.K. and T.E. Nelson, *Amylo-1,6-glucosidase/4-alpha-glucanotransferase: use of reversible substrate model inhibitors to study the binding and active sites of rabbit muscle debranching enzyme*. *Biochemistry*, 1977. **16**(18): p. 3978-87.
124. Min-Ho, L., et al., *Association of bi-functional activity in the N-terminal domain of glycogen debranching enzyme*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. **445**(1): p. 107-12.
125. Nakayama, A., K. Yamamoto, and S. Tabata, *Identification of the catalytic residues of bifunctional glycogen debranching enzyme*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(31): p. 28824-8.
126. Guin, S., et al., *Role in tumor growth of a glycogen debranching enzyme lost in glycogen storage disease*. *J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(5).

127. Guin, S., et al., *Loss of Glycogen Debranching Enzyme AGL Drives Bladder Tumor Growth via Induction of Hyaluronic Acid Synthesis*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(5): p. 1274-83.
128. Richmond, C.S., et al., *Glycogen debranching enzyme (AGL) is a novel regulator of non-small cell lung cancer growth*. Oncotarget, 2018. **9**(24): p. 16718-16730.
129. Stone, L., *Bladder cancer: In the driving seat - AGL loss drives tumour growth*. Nat Rev Urol, 2016. **13**(1): p. 3.
130. Seki, S.M. and A. Gaultier, *Exploring Non-Metabolic Functions of Glycolytic Enzymes in Immunity*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1549.
131. Yu, X. and S. Li, *Non-metabolic functions of glycolytic enzymes in tumorigenesis*. Oncogene, 2017. **36**(19): p. 2629-2636.
132. Sakoda, H., et al., *Glycogen debranching enzyme association with beta-subunit regulates AMP-activated protein kinase activity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(3): p. E474-81.
133. Ayo, S.H., et al., *High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures*. Am J Physiol, 1991. **261**(4 Pt 2): p. F571-7.
134. Hascall, V.C., et al., *The dynamic metabolism of hyaluronan regulates the cytosolic concentration of UDP-GlcNAc*. Matrix Biol, 2014. **35**: p. 14-7.
135. Vigetti, D., et al., *Hyaluronan synthesis is inhibited by adenosine monophosphate-activated protein kinase through the regulation of HAS2 activity in human aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(10): p. 7917-24.
136. Gillard, B.K., et al., *Amylo-1,6-glucosidase/4-alpha-glucanotransferase. Reaction of rabbit muscle debranching enzyme with an active site-directed irreversible inhibitor, 1-S-dimethylarsino-1-thio-beta-D-glucopyranoside*. J Biol Chem, 1980. **255**(18): p. 8451-7.
137. Bollen, M. and W. Stalmans, *The antiglycogenolytic action of 1-deoxynojirimycin results from a specific inhibition of the alpha-1,6-glucosidase activity of the debranching enzyme*. Eur J Biochem, 1989. **181**(3): p. 775-80.
138. Arai, M., et al., *N-methyl-1-deoxynojirimycin (MOR-14), an alpha-glucosidase inhibitor, markedly reduced infarct size in rabbit hearts*. Circulation, 1998. **97**(13): p. 1290-7.
139. Bollen, M., A. Vandebroek, and W. Stalmans, *1-Deoxynojirimycin and related compounds inhibit glycogenolysis in the liver without affecting the concentration of phosphorylase a*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(5): p. 905-9.
140. Scott, L.J. and C.M. Spencer, *Miglitol: a review of its therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus*. Drugs, 2000. **59**(3): p. 521-49.
141. Campbell, L.K., D.E. Baker, and R.K. Campbell, *Miglitol: assessment of its role in the treatment of patients with diabetes mellitus*. Ann Pharmacother, 2000. **34**(11): p. 1291-301.
142. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. J Comput Chem, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
143. Wang, X., et al., *Structure-Based Drug Design Strategies and Challenges*. Curr Top Med Chem, 2018. **18**(12): p. 998-1006.
144. Anderson, A.C., *The process of structure-based drug design*. Chem Biol, 2003. **10**(9): p. 787-97.

145. Congreve, M. and S. Andrews, *Perspective in Medicinal Chemistry: Structure-Based Drug Design*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2017. **17**(2): p. 93-94.
146. Carnero, A., *High throughput screening in drug discovery*. Clin Transl Oncol, 2006. **8**(7): p. 482-90.
147. Macarron, R., et al., *Impact of high-throughput screening in biomedical research*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(3): p. 188-95.
148. Doak, B.C., R.S. Norton, and M.J. Scanlon, *The ways and means of fragment-based drug design*. Pharmacol Ther, 2016. **167**: p. 28-37.
149. Schiebel, J., et al., *High-Throughput Crystallography: Reliable and Efficient Identification of Fragment Hits*. Structure, 2016. **24**(8): p. 1398-1409.
150. Aguda, A.H., et al., *Affinity Crystallography: A New Approach to Extracting High-Affinity Enzyme Inhibitors from Natural Extracts*. J Nat Prod, 2016. **79**(8): p. 1962-70.
151. Chetter, B.A., et al., *Synthetic flavonoid derivatives targeting the glycogen phosphorylase inhibitor site: QM/MM-PBSA motivated synthesis of substituted 5,7-dihydroxyflavones, crystallography, in vitro kinetics and ex-vivo cellular experiments reveal novel potent inhibitors*. SUBMITTED.
152. Stravodimos, G.A., et al., *Affinity Crystallography Reveals the Bioactive Compounds of Industrial Juicing Byproducts of Punica granatum for Glycogen Phosphorylase*. Curr Drug Discov Technol, 2018. **15**(1): p. 41-53.
153. Rodriguez de Sotillo, D.V. and M. Hadley, *Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats*. J Nutr Biochem, 2002. **13**(12): p. 717-726.
154. Polce, S.A., et al., *Ellagic Acid Alleviates Hepatic Oxidative Stress and Insulin Resistance in Diabetic Female Rats*. Nutrients, 2018. **10**(5).
155. Ahrens, M.J. and D.L. Thompson, *Effect of emulin on blood glucose in type 2 diabetics*. J Med Food, 2013. **16**(3): p. 211-5.
156. Kang, S.J., et al., *alpha-glucosidase inhibitory activities of myricetin in animal models of diabetes mellitus*. Food Science and Biotechnology, 2015. **24**(5): p. 1897-1900.
157. Ishikawa, A., et al., *Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of Nerium indicum*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2007. **53**(2): p. 166-73.
158. Docsa, T., et al., *Effect of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin on glycogen metabolism in liver tissues of streptozotocin-induced and obese diabetic rats*. Molecular Medicine Reports, 2011. **4**(3): p. 477-481.
159. Docsa, T., et al., *Insulin sensitivity is modified by a glycogen phosphorylase inhibitor: glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin in streptozotocin-induced diabetic rats*. Curr Top Med Chem, 2015. **15**(23): p. 2390-2394.
160. Goyard, D., et al., *Glucose-derived spiro-isoxazolines are anti-hyperglycemic agents against type 2 diabetes through glycogen phosphorylase inhibition*. Eur. J. Med. Chem., 2016. **108**: p. 444-454.
161. Bokor, É., et al., *C-Glycopyranosyl Arenes and Hetarenes: Synthetic Methods and Bioactivity Focused on Antidiabetic Potential*. Chemical Reviews, 2017. **117**(3): p. 1687-1764.

162. Somsak, L., et al., *New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents*. *Curr Med Chem*, 2008. **15**(28): p. 2933-83.
163. Praly, J.P. and S. Vidal, *Inhibition of Glycogen Phosphorylase in the Context of Type 2 Diabetes, with Focus on Recent Inhibitors Bound at the Active Site* Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2010. **10**: p. 1102-1126.
164. Cohen, S.N., et al., *Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973. **70**(11): p. 3240-4.
165. Cohen, S.N., *DNA cloning: a personal view after 40 years*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(39): p. 15521-9.
166. Goeddel, D.V., et al., *Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(1): p. 106-10.
167. *Human insulin receives FDA approval*. *FDA Drug Bull*, 1982. **12**(3): p. 18-9.
168. Terpe, K., *Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006. **72**(2): p. 211-22.
169. *Optimisation of expression levels*. EMBL Website, 2020.
170. Kane, J.F., *Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1995. **6**(5): p. 494-500.
171. Looman, A.C., et al., *Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in Escherichia coli*. *EMBO J*, 1987. **6**(8): p. 2489-92.
172. *Improving protein solubility*. EMBL website, 2020.
173. Hartl, F.U., A. Bracher, and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in protein folding and proteostasis*. *Nature*, 2011. **475**(7356): p. 324-32.
174. Mitsuda, M. and M. Iwasaki, *Improvement in the expression of CYP2B6 by co-expression with molecular chaperones GroES/EL in Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2006. **46**(2): p. 401-5.
175. Levy, R., et al., *Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of Escherichia coli trxB gor mutants via the coexpression of molecular chaperones*. *Protein Expr Purif*, 2001. **23**(2): p. 338-47.
176. Duan, X., et al., *Efficient production of aggregation prone 4-alpha-glucanotransferase by combined use of molecular chaperones and chemical chaperones in Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2019. **292**: p. 68-75.
177. Nishihara, K., et al., *Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2000. **66**(3): p. 884-9.
178. Martinez-Alonso, M., et al., *Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production*. *Microb Cell Fact*, 2010. **9**: p. 64.
179. Haacke, A., et al., *Chaperone over-expression in Escherichia coli: apparent increased yields of soluble recombinant protein kinases are due mainly to soluble aggregates*. *Protein Expr Purif*, 2009. **64**(2): p. 185-93.
180. Prinz, W.A., et al., *The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(25): p. 15661-7.

181. Costa, S., et al., *Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli: the novel Fh8 system*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 63.
182. Gleiter, S. and J.C. Bardwell, *Disulfide bond isomerization in prokaryotes*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(4): p. 530-4.
183. Mergulhao, F.J. and G.A. Monteiro, *Periplasmic targeting of recombinant proteins in Escherichia coli*. Methods Mol Biol, 2007. **390**: p. 47-61.
184. Mergulhao, F.J., D.K. Summers, and G.A. Monteiro, *Recombinant protein secretion in Escherichia coli*. Biotechnol Adv, 2005. **23**(3): p. 177-202.
185. Choi, J.H. and S.Y. Lee, *Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2004. **64**(5): p. 625-35.
186. Sletta, H., et al., *The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(3): p. 906-12.
187. Sockolosky, J.T. and F.C. Szoka, *Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone*. Protein Expr Purif, 2013. **87**(2): p. 129-35.
188. Yang, J., et al., *One hundred seventy-fold increase in excretion of an FV fragment-tumor necrosis factor alpha fusion protein (sFV/TNF-alpha) from Escherichia coli caused by the synergistic effects of glycine and triton X-100*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(8): p. 2869-74.
189. Bao, R.M., et al., *An efficient protocol to enhance the extracellular production of recombinant protein from Escherichia coli by the synergistic effects of sucrose, glycine, and Triton X-100*. Protein Expr Purif, 2016. **126**: p. 9-15.
190. Li, B., et al., *Glycine and Triton X-100 Enhanced Secretion of Recombinant alpha-CGTase Mediated by OmpA Signal Peptide in Escherichia coli*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2012. **17**(6): p. 1128-1134.
191. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.
192. Studier, F.W., et al., *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes*. Methods Enzymol, 1990. **185**: p. 60-89.
193. Dubendorff, J.W. and F.W. Studier, *Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor*. J Mol Biol, 1991. **219**(1): p. 45-59.
194. Pan, S.H. and B.A. Malcolm, *Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3)*. Biotechniques, 2000. **29**(6): p. 1234-8.
195. Grossman, T.H., et al., *Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability*. Gene, 1998. **209**(1-2): p. 95-103.
196. Perry, J., *Solubility studies. Preparation of soluble/insoluble protein from cells*. EMBL Website, 2020.
197. Madadlou, A., S. O'Sullivan, and D. Sheehan, *Fast protein liquid chromatography*. Methods Mol Biol, 2011. **681**: p. 439-47.

198. Schmitt, J., H. Hess, and H.G. Stunnenberg, *Affinity purification of histidine-tagged proteins*. Mol Biol Rep, 1993. **18**(3): p. 223-30.
199. Nakayama, A., K. Yamamoto, and S. Tabata, *High expression of glycogen-debranching enzyme in Escherichia coli and its competent purification method*. Protein Expr Purif, 2000. **19**(2): p. 298-303.
200. Vretblad, P., *Immobilization of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl groups. The cyclohexaamylose-beta-amylase system*. FEBS Lett, 1974. **47**(1): p. 86-9.
201. Cummins, P.M., K.D. Rochfort, and B.F. O'Connor, *Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application*. Methods Mol Biol, 2017. **1485**: p. 209-223.
202. *Handbook - Size Exclusion Chromatography. Principles and Methods*. GE Healthcare Bio-Sciences AB.
203. Arnau, J., et al., *Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins*. Protein Expression and Purification, 2006. **48**(1): p. 1-13.
204. Waugh, D.S., *An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags*. Protein Expr Purif, 2011. **80**(2): p. 283-93.
205. Michaelis, L., et al., *The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper*. Biochemistry, 2011. **50**(39): p. 8264-9.
206. Cornish-Bowden, A., *One hundred years of Michaelis–Menten kinetics*. Perspectives in Science, 2015. **4**: p. 3-9.
207. Gunawardena, J., *Some lessons about models from Michaelis and Menten*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(4): p. 517-9.
208. Γεωργιάτσος, Ι.Γ., ; Γιουψάνης, Τ.Α.,; Κυριακίδης, Δ.Α., , *Ενζυμολογία*. 2001: Ζήτη.
209. Lineweaver H., B., D., *The Determination of Enzyme Dissociation Constants*, . J.Amer.Chem, 1934.
210. Price, N.C. and L. Stevens, *Fundamentals of enzymology : the cell and molecular biology of catalytic proteins*. 3rd ed. 1999, Oxford ; New York: Oxford University Press. xviii, 478 p., 7 col. plates.
211. Dixon, M., *The determination of enzyme inhibitor constants*. Biochem J, 1953. **55**(1): p. 170-1.
212. Segel, I.H., *Enzyme kinetics : behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems*. 1975, New York: Wiley. xxii, 957 p.
213. Jaskolski, M., Z. Dauter, and A. Wlodawer, *A brief history of macromolecular crystallography, illustrated by a family tree and its Nobel fruits*. FEBS J, 2014. **281**(18): p. 3985-4009.
214. Sumner, J.B., *THE ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF THE ENZYME UREASE: PRELIMINARY PAPER*. J. Biol. Chem, 1926: p. 435-441.
215. Stallforth, P. and J. Clardy, *X-ray crystallography: One size fits most*. Nature, 2013. **495**(7442): p. 456-7.
216. Rhodes, G., *Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models*. 3rd ed. Complementary science series. 2006, Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press. xxv, 306 p.

217. Γλυκός, N.M., *Μία μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών*. 2015: ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ.
218. Haas, D.J., *The early history of cryo-cooling for macromolecular crystallography*. IUCrJ, 2020: p. 148-157.
219. Powell, H.R., *X-ray data processing*. Biosci Rep, 2017. **37**(5).
220. Wlodawer, A., et al., *Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures*. FEBS J, 2008. **275**(1): p. 1-21.
221. Karplus, P.A. and K. Diederichs, *Linking crystallographic model and data quality*. Science, 2012. **336**(6084): p. 1030-3.
222. French, S. and K.S. Wilson, *On the treatment of the negative intensity observations*. Acta Crystallogr., 1978. **A34**: p. 517 - 525.
223. Joosten, R.P., et al., *PDB_REDO: constructive validation, more than just looking for errors*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2012. **68**(Pt 4): p. 484-96.
224. Joosten, R.P., et al., *The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization*. IUCrJ, 2014. **1**(Pt 4): p. 213-20.
225. Joosten, R.P., et al., *PDB_REDO: automated re-refinement of X-ray structure models in the PDB*. J Appl Crystallogr, 2009. **42**(Pt 3): p. 376-384.
226. Skrzypek, M.S., et al., *The Candida Genome Database (CGD): incorporation of Assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D592-D596.
227. Yoshida, N. and M. Sato, *Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies*. Appl Microbiol Biotechnol, 2009. **83**(5): p. 791-8.
228. Potter, H., *Transfection by electroporation*. Curr Protoc Mol Biol, 2003. **Chapter 9**: p. Unit 9 3.
229. Fischer, E.H., Krebs, E. G., *Muscle Phosphorylase-B*. Methods in Enzymology, 1962. **5**: p. 369-73.
230. Li, Z., et al., *Delayed supplementation of glycine enhances extracellular secretion of the recombinant alpha-cyclodextrin glycosyltransferase in Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. **85**(3): p. 553-61.
231. Στραβοδήμος, Γ.Α., *Βιοχημικές μελέτες ενζύμων του μεταβολισμού του γλυκογόνου*, in *Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*. 2018, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας: Λάρισα.
232. Saheki, S., A. Takeda, and T. Shimazu, *Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity*. Anal Biochem, 1985. **148**(2): p. 277-81.
233. Leatherbarrow, R.J., *GraFit version 4.06*. Erithacus Software Ltd Staines, 1998.
234. Tabata, S. and S. Hizukuri, *Properties of yeast debranching enzyme and its specificity toward branched cyclodextrins*. Eur J Biochem, 1992. **206**(2): p. 345-8.
235. Hucho, F. and K. Wallenfels, *The enzymatically catalyzed mutarotation. The mechanism of action of mutarotase (aldose 1-epimerase) from Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1971. **23**(3): p. 489-96.
236. Barham, D. and P. Trinder, *An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system*. Analyst, 1972. **97**(151): p. 142-5.

237. Agilent Technologies UK Ltd, *CrysAlisPro Software system*. 2011: Oxford, U.K.
238. COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N., *The CCP4 suite: programs for protein crystallography*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1994. **50**(Pt 5): p. 760-3.
239. Evans, P.R. and G.N. Murshudov, *How good are my data and what is the resolution?* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2013. **69**(Pt 7): p. 1204-14.
240. Long, F., et al., *AceDRG: a stereochemical description generator for ligands*. Acta Crystallogr D Struct Biol, 2017. **73**(Pt 2): p. 112-122.
241. Lebedev, A.A., et al., *JLigand: a graphical tool for the CCP4 template-restraint library*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2012. **68**(Pt 4): p. 431-40.
242. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
243. Emsley, P., et al., *Features and development of Coot*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 4): p. 486-501.
244. Chen, V.B., et al., *MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 1): p. 12-21.
245. Battye, T.G., et al., *iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2011. **67**(Pt 4): p. 271-81.
246. McPherson, A. and B. Cudney, *Searching for silver bullets: an alternative strategy for crystallizing macromolecules*. J Struct Biol, 2006. **156**(3): p. 387-406.
247. Gregoriou, M., et al., *The structure of a glycogen phosphorylase glucopyranose spirohydantoin complex at 1.8 Å resolution and 100 K: The role of the water structure and its contribution to the binding*. Protein Science, 1998. **7**: p. 915-927.
248. Nagy, V., et al., *Glucose-based spiro-heterocycles as potent inhibitors of glycogen phosphorylase*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009. **17**(15): p. 5696-5707.
249. Benlifa, M., et al., *Glucose-based spiro-isoxazolines: a new family of potent glycogen phosphorylase inhibitors*. Bioorg. Med. Chem., 2009. **17**(20): p. 7368-80.
250. Bichard, C.J.F., et al., *Potent Inhibition of Glycogen Phosphorylase by a Spirohydantoin of Glucopyranose: First Pyranose Analogues of Hydantocidin*. Tetrahedron Letters, 1995. **36**: p. 2145-2148.
251. Ósz, E., et al., *Efficient inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by a new glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 1999. **9**: p. 1385-1390.
252. Krülle, T.M., et al., *Stereospecific Synthesis of Spirohydantoins of β -Glucopyranose: Inhibitors of Glycogen Phosphorylase*. Synlett, 1997: p. 211-213.
253. Szabo, K.E., et al., *Glucopyranosylidene-spiro-imidazolinones, a New Ring System: Synthesis and Evaluation as Glycogen Phosphorylase Inhibitors by Enzyme Kinetics and X-ray Crystallography*. J Med Chem, 2019. **62**(13): p. 6116-6136.
254. Rosauer, K.G., et al., *Novel 3,4-dihydroquinolin-2(1H)-one inhibitors of human glycogen phosphorylase α* . Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2003. **13**(24): p. 4385-4388.
255. Oikonomakos, N.G., et al., *The 1.76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase B complexed with glucose, and CP320626, a potential antidiabetic drug*. Bioorg Med Chem, 2002. **10**(5): p. 1313-9.

256. Kun, S., et al., *Synthesis of New C- and N-beta-d-Glucopyranosyl Derivatives of Imidazole, 1,2,3-Triazole and Tetrazole, and Their Evaluation as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase*. *Molecules*, 2018. **23**(3).
257. Bokor, É., et al., *Synthesis of 1-(D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazoles and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010. **18**: p. 1171-1180.
258. Chrysina, E.D., et al., *Amide-1,2,3-triazole bioisosterism: the glycogen phosphorylase case*. *Tetrahedron Asymmetry*, 2009. **20**: p. 733-740.
259. Barr, D., et al., *Identification of C-beta-d-Glucopyranosyl Azole-Type Inhibitors of Glycogen Phosphorylase That Reduce Glycogenolysis in Hepatocytes: In Silico Design, Synthesis, in Vitro Kinetics, and ex Vivo Studies*. *ACS Chem Biol*, 2019. **14**(7): p. 1460-1470.
260. Bozorov, K., J. Zhao, and H.A. Aisa, *1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview*. *Bioorg Med Chem*, 2019. **27**(16): p. 3511-3531.
261. Mirza, A., R. Desai, and J. Reynisson, *Known drug space as a metric in exploring the boundaries of drug-like chemical space*. *Eur J Med Chem*, 2009. **44**(12): p. 5006-11.
262. Kun, S., et al., *New synthesis of 3-(β-D-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazoles, nanomolar inhibitors of glycogen phosphorylase*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014. **76**: p. 567-579.
263. Cer, R.Z., et al., *IC₅₀-to-K_i: a web-based tool for converting IC₅₀ to K_i values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding*. *Nucleic Acids Research*, 2009. **37**: p. W441-W445.
264. Koebel, M.R., et al., *S...O and S...N sulfur bonding interactions in protein-ligand complexes: empirical considerations and scoring function*. *J Chem Inf Model*, 2016. **56**(12): p. 2298-2309.
265. Barlow, D.J. and J.M. Thornton, *Ion-pairs in proteins*. *J Mol Biol*, 1983. **168**(4): p. 867-85.
266. Fisher, B.M., J.H. Ha, and R.T. Raines, *Coulombic forces in protein-RNA interactions: binding and cleavage by ribonuclease A and variants at Lys7, Arg10, and Lys66*. *Biochemistry*, 1998. **37**(35): p. 12121-32.
267. Fisher, B.M., L.W. Schultz, and R.T. Raines, *Coulombic effects of remote subsites on the active site of ribonuclease A*. *Biochemistry*, 1998. **37**(50): p. 17386-401.
268. Leonidas, D.D., et al., *High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors*. *Protein Sci*, 2003. **12**(11): p. 2559-74.
269. Watson, K.A., et al., *Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: from Crystallographic Analysis to Drug Prediction using GRID Force-Field and GOLPE Variable Selection*. *Acta Crystallographica*, 1995. **D51**: p. 458-472.
270. Oikonomakos, N.G., et al., *N-Acetyl-b-D-glucopyranosylamine: A potent T-state inhibitor of glycogen phosphorylase. A comparison with α-D-glucose*. *Protein Science*, 1995. **4**: p. 2469-2477.
271. Oikonomakos, N.G., et al., *Kinetic and crystallographic studies of glucopyranosylidene spirothiohydantoin binding to glycogen phosphorylase B*. *Bioorg Med Chem*, 2002. **10**(2): p. 261-268.

272. Chrysina, E.D., et al., *Crystallographic studies on α - and β -D-glucopyranosyl formamide analogues, inhibitors of glycogen phosphorylase*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2003. **21**(4-5): p. 233-242.
273. Ferreira de Freitas, R. and M. Schapira, *A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB*. *Medchemcomm*, 2017. **8**(10): p. 1970-1981.
274. Nittinger, E., et al., *Large-Scale Analysis of Hydrogen Bond Interaction Patterns in Protein-Ligand Interfaces*. *J Med Chem*, 2017. **60**(10): p. 4245-4257.
275. Kyriakis, E., et al., *The architecture of hydrogen and sulfur sigma-hole interactions explain differences in the inhibitory potency of C-beta-d-glucopyranosyl thiazoles, imidazoles and an N-beta-d glucopyranosyl tetrazole for human liver glycogen phosphorylase and offer new insights to structure-based design*. *Bioorg Med Chem*, 2020. **28**(1): p. 115196.
276. Goyard, D., et al., *Synthesis of 1,2,3-triazoles from xylosyl and 5-thioxylosyl azides: evaluation of the xylose scaffold for the design of potential glycogen phosphorylase inhibitors*. *Carbohydrate Research*, 2012. **364**: p. 28-40.
277. Somsák, L., et al., *Preparation of imidazolyl and triazolyl glycosides as glycogen phosphorylase inhibitors and antitumor agents*, PCT, Editor. 2013: PCT.
278. Somsák, L., et al., *Synthesis of C-Xylopyranosyl- and Xylopyranosylidene-Spiro-Heterocycles for Inhibition of Glycogen Phosphorylase*. *Carbohydrate Research*, 2014. **399**: p. 38-48.
279. Tsirkone, V.G., et al., *1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies*. *Bioorg Med Chem*, 2010. **18**(10): p. 3413-25.
280. Manta, S., et al., *3'-Axial CH₂OH Substitution on Glucopyranose does not Increase Glycogen Phosphorylase Inhibitory Potency. QM/MM-PBSA Calculations Suggest Why*. *Chemical Biology & Drug Design*, 2012. **79**(5): p. 663-673.
281. Bokor, É., et al., *C-(2-Deoxy-D-arabino-hex-1-enopyranosyl)-oxadiazoles: synthesis of possible isomers and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors*. *Carbohydrate Research*, 2015. **412**: p. 71-79.
282. Bokor, É., et al., *C-Glucopyranosyl-1,2,4-triazoles as new potent inhibitors of glycogen phosphorylase*. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2013. **4**: p. 612-615.
283. Emsley, J., *Very strong hydrogen-bonding*. *Chemical Society Reviews*, 1980. **9**(1): p. 91-124.
284. Kyriakis, E., et al., *Probing the b-pocket of the active site of human liver glycogen phosphorylase with 3-(C-b-D-glucopyranosyl)-5-(4-substituted-phenyl)-1, 2, 4-triazole inhibitors*. *Bioorganic Chemistry*, 2018. **77**: p. 485-493.
285. Nagy, V., et al., *N-(4-Substituted-benzoyl)-N'-(beta-D-glucopyranosyl)ureas as inhibitors of glycogen phosphorylase: Synthesis and evaluation by kinetic, crystallographic, and molecular modelling methods*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012. **20**(5): p. 1801-1816.
286. Irwin, J.J., et al., *ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology*. *J Chem Inf Model*, 2012.
287. Segel, I.H., *Enzyme Kinetics*. 1993, New York: Wiley Interscience. 958.
288. Cavallo, G., et al., *The Halogen Bond*. *Chem Rev*, 2016. **116**(4): p. 2478-601.

289. Gasteiger, E., et al., *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, in *The Proteomics Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 2005, Humana Press. p. 571-607.
290. Gasteiger, E., et al., *ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(13): p. 3784-8.
291. *SnapGene software (from GSL Biotech; available at snapgene.com).*



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»