



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΓΚΕΦΑΛΟΥ

ENZYMATIC AND KINETIC STUDIES OF HUMAN
BRAIN GLYCOGEN PHOSPHORYLASE

Γιώργος Μάντικας, Ιωάννης

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	5
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Γλυκογόνο.....	7
1.2 Η δομή του γλυκογόνου.....	7
1.3 Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	8
1.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	10
1.5 Η σημασία της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP).....	12
1.6 Η κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	13
1.7 Οι ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	14
1.7.1 Το καταλυτικό κέντρο.....	15
1.7.2 Το κέντρο αναστολής.....	16
1.7.3 Το κέντρο σύνδεσης της κερσετίνης.....	16
1.7.4 Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου.....	17
1.7.5 Το αλλοστερικό κέντρο.....	18
1.7.6 Το νέο αλλοστερικό κέντρο.....	19
1.8 Η διεπαφή των υπομονάδων της GP.....	19
1.8.1 Το λειτουργικό διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του εγκεφάλου.....	20
1.8.2 Το διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του εγκεφάλου.....	21
1.9 Ο εντοπισμός του γλυκογόνου στον εγκέφαλο.....	21
1.10 Ο ρόλος του γλυκογόνου στα αστροκύτταρα.....	22
1.11 Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου στον εγκέφαλο.....	22
1.12 Οι επιπτώσεις της διαταραχής του μεταβολισμού της γλυκόζης στον εγκέφαλο.....	24
1.13 Η προσδευτική μυοκλονική επιληψία <i>MELF</i> (ασθένεια <i>Lafora</i>).....	24
2. Σκοπός.....	26
3. Πειραματικό μέρος.....	27
3.1 Υλικά.....	27
3.1.1 Αντιδραστήρια.....	27
3.1.2 Όργανα.....	28
3.1.3 Βακτηριακά στελέχη.....	29
3.1.4 Στήλες χρωματογραφίας.....	29
3.2 Θρεπτικά μέσα.....	29
3.3 Μέθοδοι.....	30
3.3.1 Δημιουργία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. Coli</i>	30

3.3.1.1 Δημιουργία επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> OverExpress C41 (DE3) με την χημική μέθοδο	31
3.3.2.1 Δημιουργία επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> OverExpress C41 (DE3) με ηλεκτροδιάτρηση.	31
3.3.2.2 Μετασηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> OverExpress C41 (DE3) με ηλεκτροδιάτρηση	32
3.3.3 Χρωματογραφία.....	32
3.3.3.1 Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (FPLC).....	32
3.3.3.2 Αρχή της μεθόδου	33
3.3.3.3 Χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography)	34
3.3.3.4 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Size Exclusion Chromatography).....	35
3.3.4 Απομόνωση και καθαρισμός φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (HbGP)	35
3.3.5 Φωσφορυλίωση HbGP	38
3.3.6 Υπολογισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)	39
3.3.7 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας.....	40
3.3.8 Μέθοδος ασκορβικού οξέος	40
3.3.9 Προσδιορισμός K_i	40
3.3.10 Ανάλυση κινητικών δεδομένων	41
4. Αποτελέσματα	43
4.1 Απομόνωση HbGP	43
4.2 Κινητικές μελέτες	48
4.2.1 Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (HbGP)	48
4.2.2 Προσδιορισμός K_i του αναστολέα γλυκόζη έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (HbGP).....	48
5. Συζήτηση.....	49
6. Βιβλιογραφία.....	51

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο χρονικό διάστημα Μαρτίου 2022 με Ιουνίου 2022 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημήτριου Λεωνίδα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την δυνατότητα που μου έδωσε να είναι ο επιβλέπων καθηγητής μου και να μου παρέχει πλήθος γνώσεων και την ικανότητα εξέλιξης την κριτικής μου σκέψης.

Πέραν από τον κ. Λεωνίδα θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής που μου παρείχαν την βοήθεια καθώς και τις συμβουλές τους σε κάθε απορία ή πρόβλημα που αντιμετώπισα.

Επίσης, δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και ειδικότερα τον Δρ. Γεώργιο Στραβοδήμο που καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας μου παρείχε τις απίστευτες γνώσεις του και την στήριξή του. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα τη Δρ. Δράκου Χριστίνα και τους υποψήφιους διδάκτορες Κούλα Συμεών και Τσαγκαράκου Αναστασία για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το πω στην οικογένεια μου που όλα αυτά τα χρόνια με στηρίζουν και είναι πάντα δίπλα μου και με όλη την αγάπη που μου δείχνουν πιστεύω ότι μπορώ να εκπληρώσω ότι στόχους βάλω στη ζωή μου.

Περίληψη

Το γλυκογόνο είναι η κύρια αποθήκη γλυκόζης στα κύτταρα των θηλαστικών, η οποία παρέχει ενέργεια σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια του οργανισμού. Στον άνθρωπο το γλυκογόνο έχει ποικίλες δράσεις και λειτουργίες οι οποίες καθορίζονται από το σε ποιον ιστό βρίσκεται. Στο ήπαρ, μεταβολίζεται σε γλυκόζη για τη ρύθμιση της γλυκαιμίας. Στους μυς, παρέχει ενέργεια για τη σύσπαση τους. Στον εγκέφαλο, μέχρι προτίστως θεωρούνταν ότι έχει προστατευτικό ρόλο. Πλέον είναι γνωστό ότι το αστροκυττικό γλυκογόνο έχει νευρολογική δραστηριότητα και είναι απαραίτητο συστατικό της φυσιολογίας του εγκεφάλου. Επίσης, εμπλέκεται σε διάφορες γνωστικές διεργασίες όπως η μάθηση και η απομνημόνευση. Επιπλέον, ο μεταβολισμός του γλυκογόνου στους νευρώνες αυξάνει την αντοχή τους σε καταστάσεις υποξικού στρες. Το ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP EC 2.4.1.1*) η οποία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμησή του. Η παρούσα πτυχιακή εργασία ασχολείται με την κινητική μελέτη του ενζύμου ώστε να μελετηθεί η δραστηριότητά του.

Abstract

Glycogen is the main glucose store in mammalian cells, which provides energy for various metabolic pathways in the body. In humans, glycogen has a variety of actions and functions that are determined by the tissue in which it is found. In the liver, it is metabolized to glucose to regulate blood sugar. In muscles, it provides energy for their contraction. In the brain, it was previously thought to have a protective role. It is now known that astrocytic glycogen has neurological activity and is an essential component of brain physiology. It is also involved in various cognitive processes such as learning and memorization. In addition, glycogen metabolism in neurons increases their resistance to hypoxic stress conditions. The key enzyme in glycogen metabolism is glycogen phosphorylase (GP EC 2.4.1.1) which is responsible for glycogen degradation. The current thesis presents a kinetic study of the enzymatic activity of brain GP.

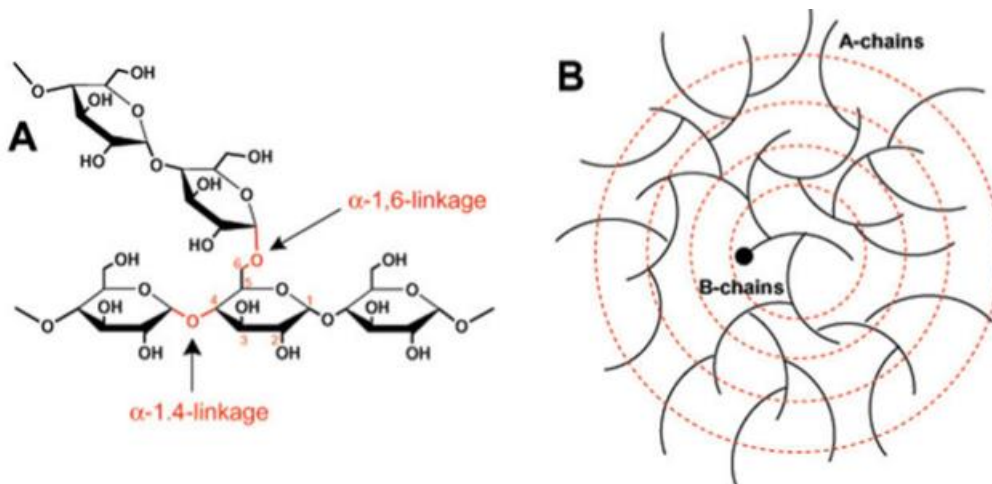
1. Εισαγωγή

1.1 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένα ωσμωτικά ουδέτερο διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης το οποίο χρησιμεύει ως αποθήκη γλυκόζης όταν υπάρχει διατροφική ευημερία ώστε η ενέργεια του να χρησιμοποιηθεί σε καταστάσεις ανάγκης [1]. Είναι παρόν σε όλους τους οργανισμούς από τα βακτήρια και τα αρχαία μέχρι τον άνθρωπο. Τα φυτά συνθέτουν παρόμοια πολυμερή γλυκόζης με το γλυκογόνο τα οποία βρίσκονται με τη μορφή αμύλου. Για τους παραπάνω λόγους ο πολυμερισμός της γλυκόζης θεωρείται ως παγκόσμιος μηχανισμός αποθήκευσης ενέργειας. [2,3,4]

1.2 Η δομή του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο, όπως και όλοι οι πολυσακχαρίτες, είναι ένα μεγάλο πολυμερές αποτελούμενο από συνδεδεμένους μονοσακχαρίτες μέσω γλυκοζιτικών δεσμών. Πιο συγκεκριμένα, στο γλυκογόνο υπάρχουν δύο τύποι δεσμών. Ο πρώτος είναι ο α-1,4-γλυκοζιτικός δεσμός, όπου δύο διαδοχικά κατάλοιπα γλυκόζης συνδέονται γραμμικά μεταξύ τους, ενώ ο δεύτερος είναι ο α-1,6-γλυκοζιτικός δεσμός όπου συνδέονται μεταξύ τους τα διακλαδισμένα μόρια και οι διακλαδώσεις συναντώνται ανά 10 μόρια γλυκόζης περίπου. Κάθε μόριο γλυκογόνου αποτελείται από περίπου 55.000 κατάλοιπα γλυκόζης με διάμετρο 44 nm και μοριακό βάρος 10^7 kDa. Στην οργάνωση των καταλοίπων της γλυκόζης στη δομή του γλυκογόνου παρατηρούνται δύο τύποι αλυσίδων: οι εσωτερικές Β-αλυσίδες, που συνήθως φέρουν δύο σημεία διακλάδωσης και οι εξωτερικές Α-αλυσίδες, που είναι ελεύθερες διακλαδώσεων. [5-8]

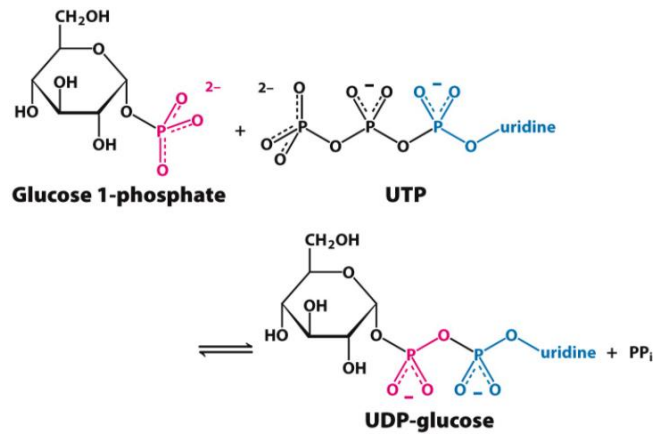


Εικόνα 1.2.α: A: Απεικόνιση δεσμών ανάμεσα στα μόρια της γλυκόζης στο γλυκογόνο. B: Η οργάνωση των αλυσίδων γλυκόζης [4]

1.3 Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου

Στα θηλαστικά οι κύριες αποθήκες γλυκόζης βρίσκονται στους σκελετικούς μυς και στο ήπαρ καθώς και σε πολλούς άλλους ιστούς όπως το συκώτι, η καρδιά και ο εγκέφαλος οι οποίοι μπορούν και συνθέτουν γλυκογόνο. Το βασικό βιομόριο για την σύνθεση του γλυκογόνου είναι η γλυκόζη η οποία προκύπτει από πρόσληψη υδατανθράκων (κύριο μονοπάτι). Υπάρχει και μια άλλη διαδικασία γνωστή ως γλυκονεογένεση η οποία χρησιμοποιεί άλλα πρόδρομα μόρια όπως η αλανίνη και το γαλακτικό. [9]

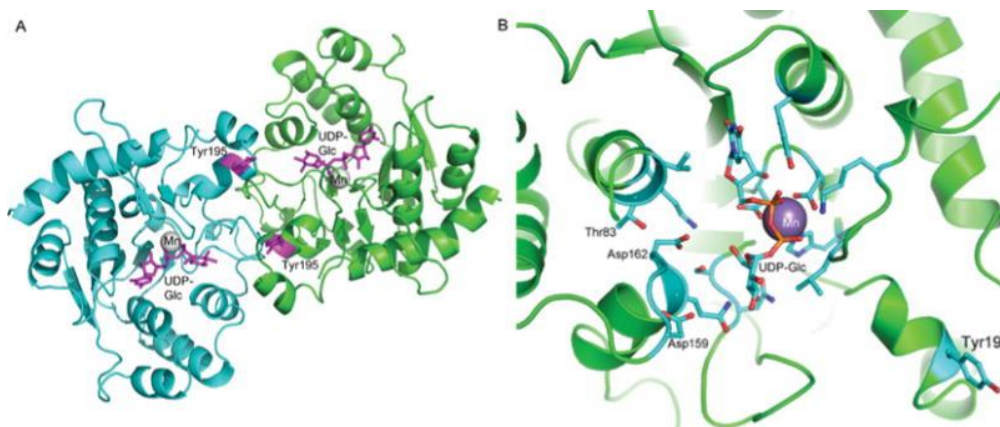
Στο κύριο μονοπάτι έχουμε μεταφορά της γλυκόζης μέσα στα κύτταρα μέσω ειδικών μεταφορέων των GLUTs (glucose transporters). Ο GLUT1 είναι ο κύριος και βασικότερος μεταφορέας, ο GLUT4 βρίσκεται κυρίως σε ιστούς ευαίσθητους στην ινσουλίνη (σκελετικοί μύες) και ρυθμίζεται από αυτήν και τέλος ο GLUT2 βρίσκεται κυρίως στο ήπαρ καθώς και στα β -κύτταρα του παγκρέατος ρυθμίζοντας την είσοδο την γλυκόζης με βάση την βαθμίδωση της συγκέντρωσης μεταξύ αίματος και ιστού. [10]



Πορεία σχηματισμού *UDP*-γλυκόζης [5]

Κατά την βιοσύνθεση του γλυκογόνου ο δότης γλυκόζης είναι η ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (*UDP*-γλυκόζη), η οποία προκύπτει από την αντίδραση *glucose 1-phosphate* + *UTP* που καταλύεται από το ένζυμο πυροφωσφορυλάση της *UDP*-γλυκόζης (*UGP*). [7]

Η γλυκογενίνη είναι ένα ιδιαίτερο είδος γλυκοσυλοτρανσφεράσης που μπορεί και μεταφέρει γλυκόζη από την *UDP*-γλυκόζη σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης της ίδιας και στη συνέχεια συνδέει και άλλα μόρια γλυκόζης πάνω στο αρχικό μέσω 1,4-γλυκοζιτικών δεσμών δημιουργώντας μια μικρή αλυσίδα 8-12 καταλοίπων. Στη συνέχεια ένα άλλο μόριο, η συνθάση του γλυκογόνου, αλληλοεπιδρά άμεσα με την γλυκογενίνη για τον περαιτέρω πολυμερισμό την αλυσίδας. [6]



Η γλυκογενίνη και το ενεργό της κέντρο[3]

Ο κύκλος της γλυκόλυσης είναι απαραίτητος για τους ιστούς για την παραγωγή ενέργειας. Το βασικό μόριο του κύκλου είναι η 6-φωσφορική γλυκόζη (*G6P*) που

προκύπτει από τον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Οι διαφορετικοί ιστοί έχουν διαφορετικές απαιτήσεις σε γλυκογόνο άρα και διαφορετική συγκέντρωση. Στο ήπαρ έχουμε συγκέντρωση περίπου 100-500 $\mu\text{mol/g}$ καθώς διατηρεί την ομοιόσταση της γλυκόζης, στους μύες έχουμε 30-100 $\mu\text{mol/g}$ όπου προσφέρει ενέργεια κατά την άσκηση και στον εγκέφαλο έχουμε 0,5-1,5 $\mu\text{mol/g}$ όπου φαίνεται να έχει κυρίως προστατευτικό ρόλο σε κρίσιμες καταστάσεις. Πέραν του προστατευτικού ρόλο στον εγκέφαλο, φαίνεται να εμπλέκεται και σε διεργασίες διανοητικού επιπέδου όπως η μάθηση και ο σχηματισμός μνήμης. [8]

Η γλυκογονόλυση είναι η διαδικασία διάσπασης του γλυκογόνου και καταλύεται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) και το ένζυμο αποδιακλάδωσης (GDE). Προϊόν αυτής την αντίδρασης είναι η 1-φωσφορική γλυκόζη (G1P) η οποία ισομεριώνεται από την φωσφογλυκομουτάση (PGM) προς 6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), όπου η τελευταία μεταφέρεται και υδρολύεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. [9]

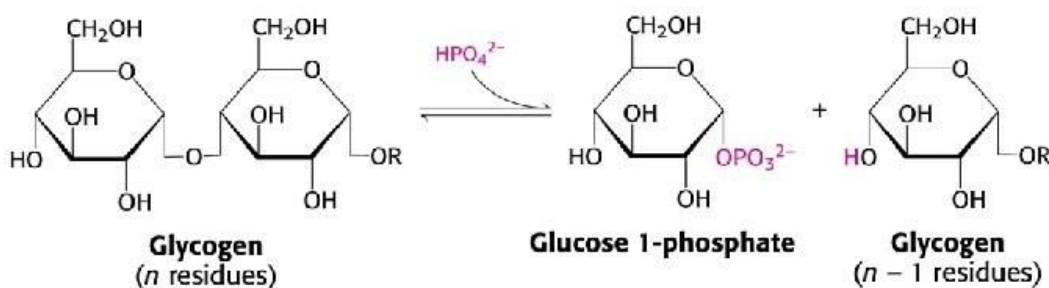
1.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*Glycogen Phosphorylase*) (GP, EC 2.4.1.1) είναι το καταλυτικό ένζυμο αποδόμησης του γλυκογόνου. Στον άνθρωπο εντοπίζουμε 3 ισομορφές: ηπατική GP (IGP), μυϊκή GP (mGP) και εγκεφαλική GP (bGP) που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *PYGL*, *PYGM* και *PYGB* αντίστοιχα. Οι 3 ισομορφές παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντήρησης, καταλύουν την ίδια αντίδραση και ρυθμίζονται από αλλοστερικούς τελεστές (π.χ. AMP) και φωσφορυλίωση στην Ser14. Παρουσιάζουν όμως και αρκετές διαφορές μεταξύ τους, ιδιαίτερα στη ρύθμιση της δραστηρότητας τους. Από τη μία η IGP ρυθμίζεται κυρίως μέσω φωσφορυλίωσης ως απόκριση σε υπο- και υπεργλυκαιμικές ορμόνες και από την άλλη οι mGP και bGP ρυθμίζονται κυρίως μέσω αλλοστερικών τελεστών ως απόκριση στις τοπικές ενεργειακές ανάγκες. Επίσης, η mGP ανταποκρίνεται άμεσα στην ενεργοποίηση από AMP ενώ η bGP όχι. [10]

Η GP μέσω μιας αντίδρασης φωσφορόλυσης διασπά το γλυκογόνο, παρουσία ορθοφωσφορικού ιόντος (*Pi*), και απελευθερώνεται ένα μόριο G1P. Ειδικότερα η GP

απομακρύνει διαδοχικά κατάλοιπα γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του γλυκογόνου (άκρα με ελεύθερη υδροξυλομάδα στον C4 άνθρακα). Παρατηρείται διάσπαση του α-1,4-γλυκοζιτικού δεσμού από το ορθοφωσφορικό ιόν και προκύπτει ένα μόριο φωσφορυλιωμένης γλυκόζης (G1P). Η GP συνεχίζει να δρα μέχρι να συναντήσει το τέταρτο κατάλοιπο γλυκόζης από μία διακλάδωση και για να συνεχίσει χρειάζεται να συνδράμουν δύο άλλα ένζυμα μία α-1,6-γλυκοζιτάση και μία μεταφοράση. Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί επιτελούν αυτές τις διεργασίες με ένα ένζυμο, το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου (*GDE*). Το ένζυμο αυτό δρα ως μεταφοράση μεταφέροντας τρία διαδοχικά κατάλοιπα γλυκόζης ενωμένα μεταξύ τους από μία εξωτερική διακλάδωση σε μία άλλη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να περισσεύει το κατάλοιπο γλυκόζης το οποίο είναι συνδεδεμένο με α-1,6-γλυκοζιτικό δεσμό, το οποίο απελευθερώνεται ως γλυκόζη από το *GDE*. [11]

Η αντίδραση της GP είναι μια αντιστρεπτή αντίδραση. Σε pH 6.8, ο λόγος ισορροπίας $[Pi]/[G1P]$ είναι 3.6, όμως *in vivo* ο λόγος ισορροπίας ξεπερνάει το εκατό ευνοώντας τη φωσφορόλυση. [13]



Διάσπαση γλυκογόνου από την GP (επεξεργασμένη [5]).

Η GP όντας ένα αλλοστερικό ένζυμο συναντάται σε δύο διαμορφώσεις, την *R* (*relaxed*) και την *T* (*tense*). Στην *T* διαμόρφωση η GP παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια για τα υποστρώματα σε αντίθεση με την *R* όπου παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για αυτά. Οι διαμορφώσεις αυτές βρίσκονται πάντα σε ισορροπία μεταξύ τους. [14]

Η ενεργοποίηση ή αναστολή της GP μπορεί να γίνει από κάποια εξωτερικά ερεθίσματα. Η ενεργοποίηση γίνεται μέσω της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*PhK*). Η *PhK* φωσφορυλιώνει την Ser14 της GP μετατρέποντας από την ανενεργή μορφή GP(b) στην ενεργή GP(a). [13-15] Στην ενεργή της μορφή η GP έχει

πολύ μεγάλη συγγένεια για το AMP και μικρότερη για τις ATP, ADP, G6P.[16,17] Όταν υπάρχει περίσσεια γλυκόζης, η γλυκόζη συνδέεται στην GP(a) αλλάζοντας την στερεοδιαμόρφωσή της ώστε να είναι προσβάσιμη σε ένα άλλο ένζυμο την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) η οποία την αποφωσφορυλιώνει και την απενεργοποιεί. [14-16, 19]

1.5 Η σημασία της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP)

Κατά την φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου, η οποία έχει ενεργειακό πλεονέκτημα, απελευθερώνεται ένα φωσφορυλιωμένο σάκχαρο (G1P). Αν απελευθερωνόταν ένα μη φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο γλυκόζης τότε θα έπρεπε να φωσφορυλιωθεί για να εισέλθει στον γλυκολυτικό κύκλο, κάτι που θα απαιτούσε κατανάλωση ATP. Όμως, με την απελευθέρωση ενός φωσφορυλιωμένου καταλοίπου γλυκόζης αποφεύγεται η σπατάλη ενέργειας. Για να μπορέσει να επιτελέσει αυτή τη διαδικασία η GP χρειάζεται να αποκλείσει ένα μόριο ύδατος από το ενεργό της κέντρο. Παρατηρούμε ότι το υπόστρωμα της GP καθώς και το κατάλοιπο G1P που απελευθερώνεται έχουν διαμόρφωση α στον C1 άνθρακα. Επίσης, λόγω της παρουσίας της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP-παράγωγο της πυριδοξίνης-βιταμίνη B₆), μπορούμε να καταλάβουμε ότι χρειάζεται ζυγός αριθμός βημάτων (συνήθως δύο) κατά την φωσφορόλυση με σχηματισμό ενός ενδιάμεσου καρβοκατιόντος. Η πλευρική αλυσίδα της λυσίνης-680 (Lys₆₈₀) της GP και της αλδεϋδικής ομάδας του συνενζύμου αυτού σχηματίζουν μια βάση Schiff. Δομικές μελέτες της GP έχουν δείξει ότι μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου μεσολαβεί η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα. Η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP σε συνδυασμό με την ορθοφωσφορική ομάδα λειτουργούν ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένα γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό ιόν προσφέρει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο της αποχωρούσας αλυσίδας του γλυκογόνου ενώ συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ορθοφωσφορικό ανιόν προσβάλλει το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που προκύπτει οδηγώντας στον σχηματισμό της α-1-φωσφορικής γλυκόζης. Το γεγονός ότι απαιτείται ο αποκλεισμός μορίων ύδατος από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης. [11]

1.6 Η κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Παρά τις όποιες διαφορές τους, οι τρεις ισομορφές της GP παρουσιάζουν παρόμοια τεταρτοταγή δομή και συνήθως απαντώνται σε διμερή και τετραμερή. Τα διμερή βρίσκονται στην ανενεργή τους T διαμόρφωση απουσία AMP ή φωσφορυλίωσης ενώ ύστερα από ενεργοποίηση μετατρέπονται στην ενεργή τους R διαμόρφωση. [20]

Γενικά κάθε μονομερές της GP αποτελείται από δύο επικράτειες:

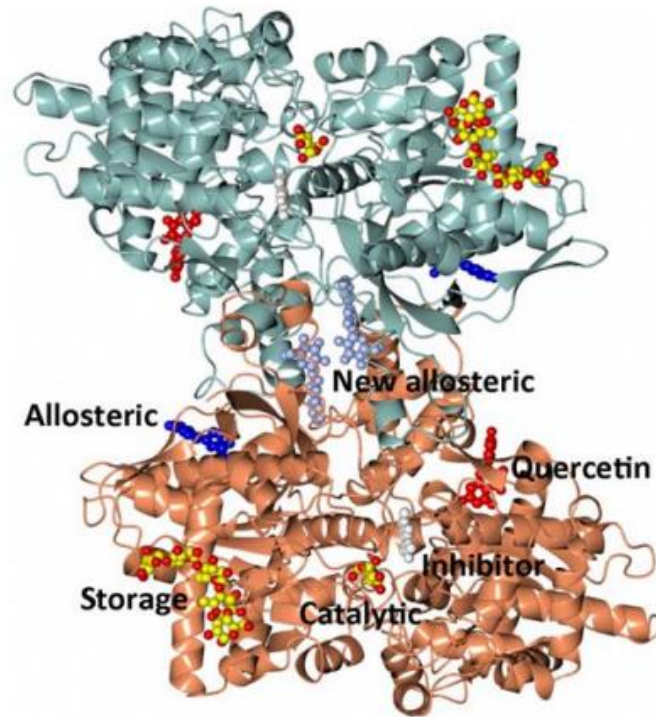
- την N-τελική επικράτεια, η οποία αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 22 έως 484. Περιλαμβάνει τις περιοχές αλληλεπίδρασης των υπομονάδων του διμερούς, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, το κέντρο της Ser₁₄ και το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης της ATP.
- την C-τελική επικράτεια, η οποία αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 485 έως 822. Στην επικράτεια αυτή βρίσκεται η θέση σύνδεσης του συνενζύμου PLP καθώς και ένα τμήμα του ενεργού κέντρου. [20]

Υπάρχουν επίσης κάποια μέρη της GP που δεν βρίσκονται στις επικράτειες αυτές και είναι:

- Βρόχος πύλης εισόδου: Αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 285 έως 286
- Βρόχος αδενίνης: Αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 319 έως 324 [20]

Τέλος, στην GP έχουν αναγνωριστεί τα εξής έξι διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης:

- Αλλοστερικό κέντρο (δέσμευση ATP) [21]
- Καταλυτικό κέντρο (δέσμευση γλυκόζης και G1P) [22]
- Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου [23]
- Κέντρο αναστολής (δέσμευση πουρινών και καφεΐνης) [24]
- Νέο αλλοστερικό κέντρο [25]
- Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης [26]



Τρισδιάστατης δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου-*b* (GP*b*) [26]

1.7 Οι ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Μελέτες του μεταβολισμού του γλυκογόνου και της σχέσης της GP την έχουν αναδείξει ως στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων. [27-30] Επομένως, η δομική μελέτη της φωσφορυλάσης είναι σημαντική για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών. Η καλύτερα μελετημένη ισομορφή της GP είναι η rmGP μέσω της οποίας έχουν γίνει γνωστά νέα αλλοστερικά κέντρα [30].

Τη δεδομένη χρονική στιγμή η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί φαρμακευτικό στόχο μόνο για τον διαβήτη τύπου II [27,28]. Έχει γίνει γνωστό ότι όταν αναστέλλεται η ηπατική φωσφορυλάση IGP, μειώνεται η απελευθέρωση της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος και τα επίπεδά της στο αίμα παραμένουν σταθερά.

Εντούτοις, σήμερα έχει αρχίσει να αναδεικνύεται ο ρόλος της GP και σε άλλες ασθένειες. Ένα παράδειγμα αποτελεί η συμβολή του ενζύμου στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και πως η αναστολή του θα μπορούσε να οδηγήσει στην καταστροφή του. Γνωρίζουμε ότι τα καρκινικά κύτταρα με την αποικοδόμηση του

γλυκογόνου αποκομίζουν κάποιους μεταβολίτες που τους επιτρέπουν να επιτελούν τις διαδικασίες του πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης. Επομένως, η αναστολή του μεταβολισμού του γλυκογόνου σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους αντιμετώπισης καρκινικών όγκων μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την καταπολέμηση του καρκίνου [30]. Επίσης, όταν ο μεταβολισμός του γλυκογόνου μέσα στα κύτταρα δεν λειτουργεί φυσιολογικά τότε συμβαίνει υπέρμετρη αποθήκευση του γλυκογόνου που οδηγεί σε σοβαρές ασθένειες αποθήκευσης του γλυκογόνου [31]. Όσον αφορά τον εγκέφαλο η συσσώρευση του γλυκογόνου στα νευρικά κύτταρα αποδεδειγμένα προκαλεί εκφυλισμό του νευρικού ιστού οδηγώντας σε απώλειά του, και ανάπτυξη προοδευτικής μυοκλονικής επιληψίας [32]. Επίσης, η συσσώρευση μη σωστά διακλαδισμένων πολυσακχαριτών μεταξύ των οποίων και το γλυκογόνο στον εγκέφαλο είναι πολύ πιθανό να εμπλέκεται και σε άλλες ασθένειες όπως η νόσος *Alzheimer*, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (*ALS*) και ο διαβήτης. Για αυτό το λόγο το περιττό γλυκογόνο καθώς και οι μη σωστά διακλαδισμένοι πολυσακχαρίτες στον εγκέφαλο χρειάζεται να αποικοδομηθούν και άρα η GP μπορεί να αποτελέσει έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο για ασθένειες του εγκεφάλου [33].

1.7.1 Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο της GP βρίσκεται στο κέντρο κάθε υπομονάδας ενός διμερούς. Ο βρόγχος 280s συνδέει το καταλυτικό κέντρο με την περιοχή αλληλεπίδρασης των δύο υπομονάδων [33] φράσσοντας μια στενή δίοδο που οδηγεί από την επιφάνεια του μορίου στο καταλυτικό κέντρο [35].

Η ανενεργή T διαμόρφωση που σταθεροποιείται με την σύνδεση αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο, προάγει την υιοθέτηση μιας διαμόρφωσης του βρόχου 280s που εμποδίζει την είσοδο του υποστρώματος [35].

Η σύνδεση της γλυκόζης στον καταλυτικό κέντρο πραγματοποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων αυτής και των καταλοίπων:

- *Gly*_{135, 675}

- *Leu*₁₃₆
- *Asn*_{284, 484}
- *His*₃₇₇
- *Val*₄₅₅
- *Glu*₆₇₂
- *Ala*₆₇₃
- *Ser*₆₇₄

Εκτός από τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις, πραγματοποιούνται αλληλεπιδράσεις με μόρια νερού που γεφυρώνουν αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα άτομα της γλυκόζης και άτομα γειτονικών αμινοξέων [36].

1.7.2 Το κέντρο αναστολής

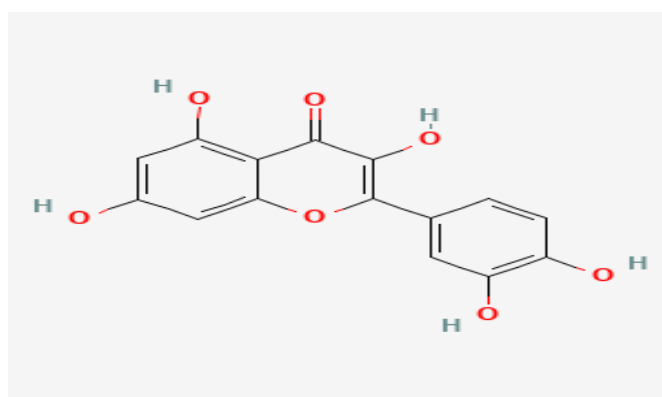
Το κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου και συγκεκριμένα στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου [23,36]. Το κέντρο αναστολής συγκροτείται από μια υδρόφοβη περιοχή που οριοθετείται από τα κατάλοιπα *Phe*₂₈₅, *Tyr*₆₁₃ [34]. Οι προσδέτες αγκυροβολούν στο κέντρο αυτό κυρίως μέσω υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τις πλευρικές αλυσίδες αυτών των αμινοξέων [21]. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης και αναστέλλεται η δραστηριότητά του ενζύμου [34].

1.7.3 Το κέντρο σύνδεσης της κερσετίνης

Η κερσετίνη ανήκει σε μία κατηγορία ενώσεων που ονομάζονται φλαβονοειδή και εντοπίζεται σε διάφορα τρόφιμα (εσπεριδοειδή, κεράσια) και έχει πιθανώς αντιοξειδωτική και κυτταροπροστατευτική δράση [39]. Άλλα γνωστά φλαβονοειδή συνδέονται στο κέντρο αναστολής, κάτι που δε συμβαίνει με την κερσετίνη η οποία έχει ένα δικό της κέντρο πρόσδεσης στην επιφάνεια του ενζύμου. Το κέντρο

πρόδεσής της κερσετίνης συγκροτείται από τα παρακάτω αμινοξικά κατάλοιπα[26]:

- *Lys*_{544,655}, *Arg*₅₅₁, *Tyr*₅₄₈ (C- τελικής επικράτειας)
- *Glu*_{120,123} (N- τελικής επικράτειας)



Εικόνα 1.7.3.α: Η χημική δομή του μορίου της κερσετίνης [40]

Οι υδροξυλομάδες των δακτυλίων A και B της κερσετίνης και τα αμινοξέα του κέντρου σύνδεσης αλληλεπιδρούν, πραγματοποιώντας τη σύνδεση του μορίου με την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη σύνδεση η κερσετίνη σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου με άτομα της πλευρικής αλυσίδα της *Arg*₅₅₁ και το κύριο καρβονυλικό άτομο οξυγόνου της *Lys*₅₄₄. Τα άτομα οξυγόνου 24 και 30 της κερσετίνης σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις γεφυρών ύδατος με τα καρβονυλικά οξυγόνα της κύριας αλυσίδας των αμινοξέων *Glu*₁₂₁ και *Lys*₆₅₅ ενώ το άτομο 29 εμπλέκεται σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων γεφυρών ύδατος με τα άτομα οξυγόνου της: *Leu*₄₉₄, *Cys*₄₉₅ και *Glu*₆₅₄ [26]. Δομική συγκριτική ανάλυση του συμπλόκου GRb-κερσετίνης παρατηρήθηκε ότι αυτή δεν έχει κάποια ιδιαίτερη επίδραση στην T διαμόρφωση αλλά όταν συνδέεται στην R διαμόρφωση προκαλεί σημαντικές δομικές μεταβολές στο βρόχο 548-556 που συμμετέχει στο σχηματισμό μίας από τις δύο πλευρές του κέντρου σύνδεσης. Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η κερσετίνη σταθεροποιεί την λιγότερο δραστική διαμόρφωση του ενζύμου [26, 41].

1.7.4 Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου

Για την ταυτοποίηση του κέντρου αποθήκευσης του γλυκογόνου μελετήθηκε η πρόσδεση ολιγοσακχαριτών στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και συγκεκριμένα της μαλτοπενταόζης και της μαλτοεπταόζης που λειτουργούν ως υποστρώματα του καταλυτικού κέντρου [42]. Ο ρόλο του κέντρου αποθήκευσης του γλυκογόνου δεν έχει γίνει απόλυτα κατανοητός, όμως πιστεύεται ότι είναι απαραίτητο για την σύνδεση του γλυκογόνου με τέτοιον τρόπο ώστε να αυξηθούν τα διαθέσιμα μη αναγωγικά άκρα και να ξεκινήσει η διαδικασία της κατάλυσης [42]. Το κέντρο βρίσκεται στην επικράτεια 1 του ενζύμου και οργανώνεται σε δύο υποπεριοχές στις οποίες προσδένονται τα κατάλοιπα γλυκόζης S3-S7 και S8-S9 των ολιγοσακχαριτών. Η πρώτη υποπεριοχή (S3-S4-S5-S6-S7) αποτελείται από:

1. α_{12} και α_{13} έλικες (κατάλοιπα 369-418 και 420-429 αντίστοιχα)
2. βρόχο που συνδέει δύο αντιπαράλληλα β -κλώνους τους β_{15} (κατάλοιπα 430-432) και β_{16} (κατάλοιπα 411-437)
3. Η δεύτερη υποπεριοχή (S8-S9) αποτελείται από:
4. Έναν βρόχο στην κορυφή της α_{12} έλικας που συνδέει τα αντιπαράλληλα β -φύλλα β_8 - β_9 (κατάλοιπα 198-209 και 212-223 αντίστοιχα) με την Val_{354} από την έλικα α_9 [42].

1.7.5 Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σχηματίζεται μέσω της αλληλεπίδρασης κάθε υπομονάδας ενός λειτουργικού διμερούς του ενζύμου [43]. Εκεί συνδέονται κυρίως φωσφορυλιωμένες ενώσεις όπως οι ενεργοποιητές AMP, IMP και οι αναστολείς ATP, G6P, UDP- γλυκόζη. Η συγκρότηση του αλλοστερικού κέντρου οφείλεται σε δύο αλληλεπιδράσεις. Η πρώτη αφορά τη διεπαφή μιας περιοχής επικαλύμματος με την α_2 έλικα (cap/α_2) και περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην περιοχή του επικαλύμματος της μίας υπομονάδας (κατάλοιπα 37-47) με τον β_7 κλώνο και την α_2 έλικα της άλλης (κατάλοιπα 47-78). Η δεύτερη αφορά την διεπαφή του πύργου που περιλαμβάνει την αντιπαράλληλη διάταξη δύο συμμετρικών α_8 ελίκων (κατάλοιπα 289-314). Το αλλοστερικό κέντρο είναι επενδυμένο από δύο α -έλικες, την α_7 και α_8 καθώς και από έναν μικρό β -κλώνο, τον β_7 ενώ τελικά καλύπτεται από το επικάλυμμα [43].

1.7.6 Το νέο αλλοστερικό κέντρο

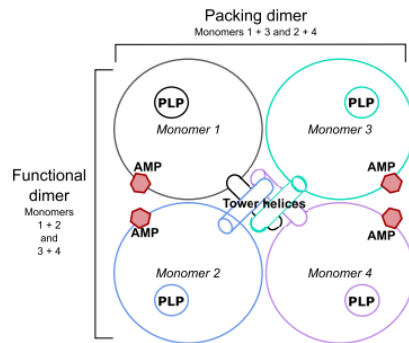
Ένα νέο κέντρο σύνδεσης ταυτοποιήθηκε ύστερα από κρυσταλλογραφικές μελέτες για την ανασταλτική δράση της ένωσης CP320626, το οποίο βρίσκεται στην κεντρική κοιλότητα ανάμεσα στις δύο υπομονάδες της φωσφορυλάσης [25, 44]. Αυτό το νέο κέντρο ονομάστηκε νέο αλλοστερικό κέντρο και βρίσκεται $\sim 15 \text{ \AA}$ από το αλλοστερικό κέντρο, $\sim 33 \text{ \AA}$ από το καταλυτικό και $\sim 37 \text{ \AA}$ από το κέντρο αναστολής [44]. Η κεντρική κοιλότητα έχει μήκος $\sim 30 \text{ \AA}$ με ακτίνα που κυμαίνεται από 4-8 \AA περικλείοντας έναν όγκο $\sim 1300 \text{ \AA}^3$. Τέλος, γνωρίζουμε ότι τα 18 κατάλοιπα αμινοξέων που συγκροτούν αυτή την περιοχή είναι συντηρημένα σε όλες τις ισομορφές του ενζύμου [35].

1.8 Η διεπαφή των υπομονάδων της GP

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι GPs συναντώνται κυρίως σε διμερή και τετραμερή τα οποία βρίσκονται στην ανενεργή τους κατάσταση απουσία AMP ή φωσφορυλίωσης. Όταν ενεργοποιούνται οι GPs έχουμε αναδιοργάνωση των υπομονάδων μέσω αλλαγών στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις μετατρέποντάς τις στην ενεργή R διαμόρφωση. Η mGP όταν ενεργοποιείται σχηματίζει τετραμερή ενώ η IGP διμερή. Η bGP βρίσκεται σε ισορροπία ανάμεσα σε μονομερή και διμερή και η ενεργοποίηση της ευνοεί τα διμερή. Μελέτες κρυστάλλων της bGP έχουν δείξει ότι είναι ένα τετραμερές όπου κάθε μονομερές αλληλεπιδρά με τα άλλα τρία και για αυτό έχουν οριστεί τρεις μονάδες διεπαφής [20].

Οι τρεις μονάδες διεπαφής είναι:

1. Το λειτουργικό διμερές, που αποκρίνεται στο ενεργό διμερές (απαρτίζεται από τα μονομερή 1-2, 3-4 κατά τον οριζόντιο άξονα)
2. Το διμερές (απαρτίζεται από τα μονομερή 1-3, 2-4 κατά τον κάθετο άξονα)
3. Ο πυρήνας των ελίκων-πύργων[32].



Εικόνα 1.8.α: Σχηματική απεικόνιση των μονάδων διεπαφής ενός λειτουργικού τετραμερούς GP (επεξεργασμένη) [20].

1.8.1 Το λειτουργικό διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του εγκεφάλου

Η αλληλεπίδραση δύο μονομερών φωσφορυλάσης σε ένα λειτουργικό διμερές περιλαμβάνει:

- Την έλικα α_2 (κατάλοιπα: 49-77)
- Το β_4 - β_5 βρόχο (κατάλοιπα 180-198)
- Το βρόχο του επικαλύμματος (κατάλοιπα 41-48)
- Τις έλικες-πύργους (κατάλοιπα 259-278)

Η διεπαφή των τριών πρώτων στοιχείων περιλαμβάνει το αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του εγκεφάλου. Παρουσία AMP το κέντρο ανακατατάσσεται πιο κοντά στην AMP και με αυτό τον τρόπο αλληλεπιδρούν οι δύο υπομονάδες φέρνοντας το βρόχο του επικαλύμματος πιο κοντά στην έλικα α_2 και το β_4 - β_5 βρόχο, σταθεροποιώντας τον ένζυμο στην ενεργή του διαμόρφωση.

Οι έλικες πύργοι συνδέονται με το βρόχο της πύλης (κατάλοιπα 279-289) [21]. Η σταθεροποίησή τους πραγματοποιείται μέσω μη πολικών αλληλεπιδράσεων των αμινοξικών καταλοίπων *Val*₂₆₆, *Leu*₂₉₇, *Asn*₂₇₀ καθώς και των αντίστοιχών τους στην άλλη υπομονάδα και στις τρεις ισομορφές του ενζύμου. Η μόνη διαφορά που εντοπίζεται είναι ότι στην εγκεφαλική ισομορφή, σχηματίζουν δύο επιπλέον δεσμούς υδρογόνου σε σχέση με την ηπατική και την μυϊκή [20].

1.8.2 Το διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του εγκεφάλου

Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε δύο λειτουργικά μονομερή της *bGP* βασίζονται σε αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν:

- Τις έλικες-πύργους
- Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου (κατάλοιπα 426-434)
- Την δέσμη α_{26} - α_{29} ελίκων (κατάλοιπα 721-769) [45]

Η διαμόρφωση του διμερούς της *bGP* σταθεροποιείται μέσω των αλληλεπιδράσεων των πύργων έλικας [46]. Στο *N*-τελικό άκρο των ελίκων πύργων τα αμινοξικά κατάλοιπα *Val*₂₅₉, *Tyr*₂₆₂, *Ile*₂₆₃ αλληλεπιδρούν με τα συμμετρικά τους μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η πύλη της κάθε υπομονάδας σταθεροποιείται στην ανοικτή της διαμόρφωση μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα κατάλοιπα *Phe*₂₈₆, *Asn*₂₈₁ με τα αντίστοιχα συμμετρικά τους. Παρόλα αυτά ο αριθμός των αλληλεπιδράσεων φαίνεται να μειώνεται με την παρουσία κάποιου αλλοστερικού ρυθμιστή, επηρεάζοντας κυρίως το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου [20].

1.9 Ο εντοπισμός του γλυκογόνου στον εγκέφαλο

Το γλυκογόνο στον εγκέφαλο εντοπίζεται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, λόγω των πολλών διαδικασιών που συμμετέχει, σε αντίθεση με τους μύες και το ήπαρ όπου εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα [47].

Ο εντοπισμός του γλυκογόνου εξαρτάται από το ηλικιακό στάδιο του οργανισμού [47]. Πιο συγκεκριμένα, στα νεογνά το γλυκογόνο παρατηρείται στα αστροκύτταρα και τους νευρώνες (πιθανώς λόγω της αυξημένης μεταβολικής τους δραστηριότητας) ενώ στους ενήλικες παρατηρείται μόνο στα αστροκύτταρα [48]. Μετά το πέρας της ενηλικίωσης και καθώς μεγαλώνει ο οργανισμός, το γλυκογόνο εντοπίζεται επίσης και σε μικρό αριθμό νευρώνων όπως τα επενδυματικά κύτταρα και τα κύτταρα του χοροειδούς πλέγματος [49].

Στον εγκέφαλο το γλυκογόνο εντοπίζεται και την λευκή και στην φαιά ουσία χωρίς κάποια ομοιόμορφη κατανομή. Ύστερα από μελέτες ηλεκτρονιακής μακροσκοπίας

σε κοκκία γλυκογόνου γνωρίζουμε ότι η συγκέντρωσή του στον νευρικό ιστό είναι ανάλογη με τον αριθμό των συνάψεων που σχηματίζονται [47].

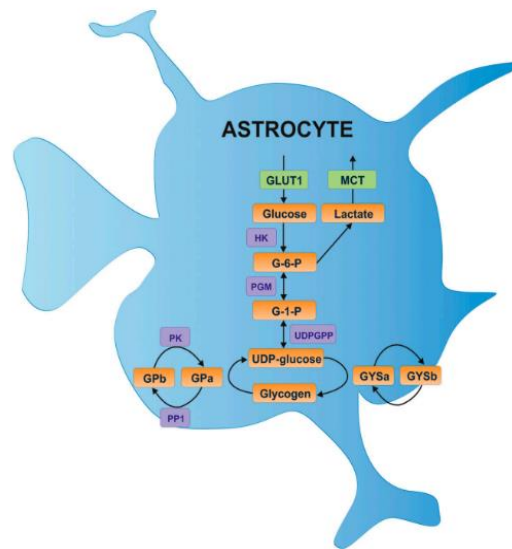
1.10 Ο ρόλος του γλυκογόνου στα αστροκύτταρα

Η ποσότητα του γλυκογόνου στα αστροκύτταρα του εγκεφάλου είναι πάρα πολύ μικρή σε σχέση με τα μυϊκά και ηπατικά κύτταρα και για αυτό το λόγο η μελέτη του δεν προσέλκυσε ιδιαίτερο ενδιαφέρον [47]. Στο ήπαρ, τα αποθέματα του γλυκογόνου μπορούν και διατηρούν τα επιθυμητά επίπεδα γλυκόζης σταθερά για περίπου 24 ώρες χωρίς να υπάρχει εξωγενής πρόσληψη γλυκόζης, ενώ στον εγκέφαλο παρέχουν προστασία για μικρό χρονικό διάστημα. Ο νευρικός ιστός απαιτεί περίπου $100\mu\text{mol } O_2$ για κάθε γραμμάριο νευρικού ιστού σε μία ώρα, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι πλήρης αερόβιος μεταβολισμός θα απαιτούσε $600\mu\text{mol}$ γλυκόζης σε μια ώρα και εφόσον η συγκέντρωση του γλυκογόνου στον νευρικό ιστό ανέρχεται περίπου σε $0.5-1.5\mu\text{mol/g}$, τα αποθέματα αυτά είναι ικανά να τροφοδοτούν τον νευρικό ιστό με ενέργεια για λίγα μόνο λεπτά. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί δύο κύριοι ρόλοι του γλυκογόνου στον εγκέφαλο:

- Παροχή ενέργειας σε υπογλυκαιμικές καταστάσεις
- Παροχή ενέργειας σε περιπτώσεις που ο νευρικός ιστός του εγκεφάλου έχει αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις [47]

1.11 Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου στον εγκέφαλο

Η είσοδος της γλυκόζης στα αστροκύτταρα γίνεται μέσω των μεταφορέων γλυκόζης *GLUT1* και πιθανόν του *GLUT4* (ευαίσθητου στην ινσουλίνη). Η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται από την εξοκίνηση προς 6-φωσφορική-γλυκόζη (*G6P*) και έπειτα ισομεριώνεται σε 1-φωσφορική-γλυκόζη (*G1P*) από την φωσφογλυκομουτάση, στη συνέχεια μετατρέπεται σε *UDP*-γλυκόζη από την πυροφωσφατάση της *UDP*-γλυκόζης. Τελικά η γλυκόζη του μορίου αυτού μέσω της δράσης της *GYS* θα συνδεθεί στο πολυμερές του γλυκογόνου, όταν ωστόσο οι συνθήκες το απαιτήσουν, η *GP* να ενεργοποιηθεί προκειμένου να τροφοδοτηθεί η γλυκολυτική πορεία με σκοπό την παραγωγή ενέργειας [47].



Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου στο εσωτερικό των αστροκυττάρων [50]

Οι νευρώνες έχουν υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις και για αυτό υπήρχε η άποψη ότι παράγουν ενέργεια μέσω του οξειδωτικού μεταβολισμού της γλυκόζης χρησιμοποιώντας την ως κύριο καύσιμο [53]. Νέα στοιχεία μας δείχνουν ότι το γαλακτικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τους νευρώνες και ότι προτιμάται έναντι της γλυκόζης όταν βρίσκονται σε παρόμοιες ποσότητες [53]. Τα αστροκύτταρα μέσω του μεταβολισμού της γλυκόζης παράγουν πυροσταφυλικό οξύτο οποίο αφού μετατραπεί σε γαλακτικό οξύ από την γαλακτική αφυδρογονάση (*LDH5*) θα εξέλθει από τα αστροκύτταρα μέσω μεταφορέων μονοκαρβοξυλικών οξέων (*MCT*), και από αντίστοιχους μεταφορείς στους νευρώνες θα εισέλθει σε αυτούς. Μέσα στους νευρώνες το γαλακτικό, θα μετατραπεί σε πυροσταφυλικό οξύ από την γαλακτική αφυδρογονάση (*LDH1*) και θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ενέργειας τροφοδοτώντας τον κύκλο του *Krebs*. [54]

Πειράματα σε εγκεφάλους ποντικών έδειξαν την ύπαρξη σύνδεσης του μεταβολισμού της γλυκόζης στα αστροκύτταρα και τους νευρώνες κατά την διαδικασία σχηματισμού μνήμης. Στα πειράματα αυτά, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας 1,4-διεοξυ-1,4-ιμινο-*D*-αραβινιτόλη (*DAB*) για να ανασταλεί η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η

γλυκογονόλυση στον εγκέφαλο είναι απαραίτητη για την μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση (*Long Term Potentiation-LTP*), μια διαδικασία η οποία φαίνεται να διαταράσσεται σε διάφορες παθολογίες του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένου και νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος *Alzheimer* [55].

1.12 Οι επιπτώσεις της διαταραχής του μεταβολισμού της γλυκόζης στον εγκέφαλο

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα συναντώνται κοκκία 1- και β- γλυκανών (*corpora amyloacea*) σε υγιείς ηλικιωμένους ανθρώπους και θηλαστικά [56]. Τα κοκκία αυτά, φαίνεται να αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με το γήρας και το κυτταρικό στρες [57]. Πλέον η παρουσία αυτών των κοκκίων θεωρείται ότι είναι ένα καθολικό γεγονός με την πάροδο του χρόνου που είναι αποτέλεσμα κάποιων επίκτητων μεταβολών που οδηγούν στο λανθασμένο μεταβολισμό της γλυκόζης [56].

Η συσσώρευση αυτών των κοκκίων φαίνεται συσχετίζεται με πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του *Alzheimer* καθώς και η προοδευτική μυοκλονική επιληψία *MELF* (ασθένεια *Lafora*) [55].

1.13 Η προοδευτική μυοκλονική επιληψία *MELF* (ασθένεια *Lafora*)

Η προοδευτική μυοκλονική επιληψία *MELF* ή αλλιώς ασθένεια *Lafora* είναι μια σπάνια κληρονομική ασθένεια που κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο [58, 59]. Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται κατά την εφηβεία και τυπικά οδηγούν σε θάνατο μέσα στα πρώτα 10 χρόνια από την εμφάνισή τους [60]. Η ασθένεια δεν μπορεί να διαγνωσθεί εύκολα γιατί τα πρώτα συμπτώματα είναι επιληψίες οι οποίες αντιμετωπίζονται με αντιεπιληπτική αγωγή [61, 62]. Τα επόμενα συμπτώματα που εμφανίζονται είναι η αλλαγή στην συμπεριφορά, η κατάθλιψη, η αταξία και η δυσαρθρία. Όσο περνάνε τα χρόνια οι επιληπτικές κρίσεις γίνονται συχνότερες και τέλος ο ασθενής πέφτει σε κώμα και καταλήγει [63].

Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονίδια που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση αυτής της ασθένειας. Το πρώτο είναι το *EMP2A*, που κωδικοποιεί την

λαφορίνη, μία φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης και το δεύτερο είναι το *EMP2B* που κωδικοποιεί τη μαλίνη, μία E3 λιγάση της ουβικουΐτινης. Η δράση τους αφορά την ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στα νευρικά κύτταρα [63]. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά έχουν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μη σωστά διακλαδισμένου γλυκογόνου (σωμάτια *Lafora*) που κατακρημνίζεται οδηγώντας σε απόπτωση των νευρικών κυττάρων και τελικά σε νευροεκφυλισμό [63,64].

2. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η βιοχημική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ανθρώπινου εγκεφάλου καθώς και η κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία του φυσιολογικού αναστολέα γλυκόζη ώστε να γίνει κατανοητή η λειτουργία του. Αυτή η μελέτη μας δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ανθρώπινου εγκεφάλου με άλλες ισομορφές της σε άλλα όργανα του ίδιου οργανισμού ή και είδη (hIGP, hmGP).

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Πίνακας 3.1.1: Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας	
Αντιδραστήριο	Εταιρεία
<i>β-Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate (β-G1P)</i>	SIGMA
<i>β-Mercaptoethanol</i>	SIGMA
<i>Acetic Acid</i>	Fluka, Panreac
<i>Acrylamide</i>	SERVA
<i>Adenosine 5'-monophosphate monohydrate (AMP)</i>	SIGMA
<i>Agarose</i>	SIGMA
<i>Ammonium molybdate</i>	SIGMA
<i>Ammonium Persulfate (APS)</i>	SIGMA
<i>Bis-Acrylamide</i>	SERVA
<i>Bradford protein assay 5X</i>	Bio-Rad
<i>Bromophenol Blue</i>	Research organics
<i>Calcium Chloride dehydrate</i>	MERCK
<i>Chloramphenicol</i>	AppliChem
<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	Fluka
<i>D-(+)- Glucose</i>	SIGMA
<i>Dimethylsulfoxide (DMSO)</i>	Panreac AppliChem
<i>Dithiothreitol (DTT)</i>	SERVA
<i>DNA Ladder RTU (1Kb) - Ready to use</i>	Nippon Genetics
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)</i>	Panreac
<i>Ethanol Absolute</i>	SIGMA
<i>Glycerol</i>	Panreac
<i>Glycine</i>	SERVA
<i>Glycogen from oyster type II</i>	SIGMA
<i>Hepes</i>	SERVA
<i>Hydrochloric Acid (HCl)</i>	MERCK
<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)</i>	SERVA

<i>Imidazole Bio Ultra</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Kanamycin monosulphate</i>	<i>AppliChem</i>
<i>L-Arabinose</i>	<i>AppliChem</i>
<i>L-Ascorbic Acid</i>	<i>SIGMA</i>
<i>LB Agar, Powder</i>	<i>SERVA</i>
<i>LB Medium-powder according to Miller</i>	<i>Panreac-AppliChem</i>
<i>Magnesium chloride, anhydrous, 99%</i>	<i>Alfa-Aesar</i>
<i>Mark12™ Unstained Standard</i>	<i>Invitrogene</i>
<i>MTG (3-Mercapto-1,2-propanediol)</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Page Ruler™ Prestained Protein Ladder</i>	<i>Thermo Scientific</i>
<i>PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)</i>	<i>AppliChem</i>
<i>Potassium Chloride (KCl)</i>	<i>MERCK</i>
<i>SDS (Sodium dodecyl Sulfate- SDS)</i>	<i>SERVA</i>
<i>Sodium Chloride (NaCl)</i>	<i>CHEM-LAB</i>
<i>Sodium Hydroxide (NaOH)</i>	<i>MERCK</i>
<i>TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)</i>	<i>MERCK</i>
<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>	<i>SERVA</i>
<i>Triton X-100</i>	<i>MERCK</i>
<i>Tryptone</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Yeast extract</i>	<i>SERVA</i>

3.1.2 Όργανα

Όργανο	Εταιρεία
Αναλυτικός ζυγός	<i>Kern & Sohn GmbH</i>
Αυτόματες πιπέτες	<i>Gilson, Nichiryo</i>
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης	<i>Bio-Rad</i>
Κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης	<i>Bio-Rad</i>
Μετρητής pH	<i>Metrohm</i>
Υδατόλουτρο	<i>Wisebath</i>
Φυγόκεντροι	<i>Eppendorf Centrifuge 5810R, Hitachi</i>
<i>ÅKTA purifier (FPLC system)</i>	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>
<i>Dry Block heat bath</i>	<i>Thermoleader</i>
<i>Ultrasonic processor UP400S (400 W, 24kHz)</i>	
<i>Vortex</i>	<i>Kisker</i>

3.1.3 Βακτηριακά στελέχη

Στη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά γενετικά τροποποιημένα στελέχη του βακτηρίου *E. coli*. Τα βακτηριακά στελέχη επιλέχθηκαν με σκοπό την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης σε υψηλά επίπεδα σε διαλυτή μορφή.

Πίνακας 3.1.3: Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν	
Βακτηριακά στελέχη <i>E.coli</i>	Εταιρεία
<i>BL21-Gold (DE3)</i>	<i>Agilent-Techologies</i>
<i>OverExpress C41 (DE3)</i>	<i>Lucigen</i>

3.1.4 Στήλες χρωματογραφίας

Πίνακας 3.1.4: Οι στήλες χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν	
Στήλη χρωματογραφίας	Εταιρεία
<i>HiTrap TALON Crude (5 mL)</i>	<i>GE Healthcare</i>
<i>Gel-filtration Superdex S200</i>	<i>GE Healthcare</i>

3.2 Θρεπτικά μέσα

LB-Agar: Η τελική σύσταση του στερεού θρεπτικού μέσου LB-Agar είναι $35 \frac{gr}{L}$.

LB-Broth: Η τελική σύσταση του υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth να είναι $25 \frac{gr}{L}$.

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Δημιουργία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων E. Coli

Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν γενετικό υλικό μέσω τριών διαδικασιών: της σύζευξης, της επαγωγής και του μετασχηματισμού [71]. Κατά τη σύζευξη γίνεται οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού από ένα βακτήριο σε ένα άλλο, ενώ κατά την επαγωγή το γενετικό υλικό μεταφέρεται με τη βοήθεια ενός βακτηριοφάγου. Στον μετασχηματισμό το ελεύθερο DNA περνά στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες [72]. Ο μετασχηματισμός μπορεί να γίνει είτε φυσικά είτε τεχνητά. Ο φυσικός μετασχηματισμός είναι σπάνιος και τον πραγματοποιούν τα βακτήρια ώστε να προσλάβουν γενετικό υλικό από το περιβάλλον. Ο τεχνητός μετασχηματισμός μπορεί να επιτευχθεί κάτω από ορισμένες εργαστηριακές συνθήκες. Οι δύο κύριοι μέθοδοι τεχνητού μετασχηματισμού περιλαμβάνουν:

- Την επώαση των βακτηριακών κυττάρων σε διάλυμα $CaCl_2$ η οποία ακολουθείται από σύντομο θερμικό σοκ (χημική μέθοδος).
- Την ηλεκτροδιάτρηση [73,74].

Με αυτές της μεθόδους επιτυγχάνεται η προσωρινή διατάραξη του βακτηριακού τοιχώματος και της μεμβράνης με στόχο την εισαγωγή εξωγενούς γενετικού υλικού. Κατά την επώαση με διάλυμα $CaCl_2$ το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων αποκτά θετικό φορτίο με αποτέλεσμα το γενετικό υλικό που θέλουμε να εισάγουμε λόγω του αρνητικού του φορτίου να προσκολλάτε στην επιφάνειά του. Έπειτα λόγω του θερμικού σοκ θα προκληθεί χάλαση και τελικά εισαγωγή του επιθυμητού τμήματος DNA [75]. Κατά την ηλεκτροδιάτρηση από την άλλη, η σύντομη εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα βακτηριακά κύτταρα προκαλεί την παροδική δημιουργία πόρων, μέσω των οποίων το εξωγενές DNA εισέρχεται στο βακτηριακό κύτταρο [75].

3.3.1.1 Δημιουργία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* OverExpress C41 (DE3) με την χημική μέθοδο

Το εναιώρημα επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων τοποθετείται στον πάγο και αφού ξεπαγώσει προστίθενται 1-50 ng πλασμιδιακού φορέα που φέρει το επιθυμητό γονίδιο και ύστερα από ήπια ανάδευση, τοποθετείται για επώαση στον πάγο για 30 λεπτά. Με το πέρας των 30 λεπτών το βακτηριακό εναιώρημα τοποθετείται σε θερμοκρασία 42°C, για 45 δευτερόλεπτα, και τελικά μεταφέρεται ξανά σε πάγο για 2-3 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 0,9 mL αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού μέσου και τα μετασχηματισμένα βακτήρια επωάζονται σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) για μία ώρα. Μετά την επώαση 30-150 mL εναιωρήματος βακτηριακών κυττάρων επιστρώνονται με την χρήση πιπέτας Pasteur σε τρυβλία petri, σε στερεό θρεπτικό μέσο LB- Agar που περιέχει την κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού ανθεκτικότητας των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων. Τέλος, τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 16 ώρες.

3.3.2.1 Δημιουργία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* OverExpress C41 (DE3) με ηλεκτροδιάτρηση.

Σε 10 mL υγρού θρεπτικού μέσου, που φέρει την κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού ανθεκτικότητας του κάθε βακτηριακού στελέχους, τοποθετείται μία αποικία του τρυβλίου καλλιέργειας δεκτικών κυττάρων *E. Coli* και ακολουθεί επώαση 16 ωρών στους 37° C υπό ανάδευση (210 rpm). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μεταφορά ποσότητας της υγρής καλλιέργειας σε 200 mL υγρού θρεπτικού μέσου σε αναλογία 1:100 και η νέα υγρή καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων *E. coli* επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) μέχρι η τιμή της οπτικής πυκνότητας (*OD*) σε μήκος κύματος 600 nm να έχει τιμή 0,4 (σε αυτή την τιμή, θεωρείται πως τα βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους), τελικά η υγρή καλλιέργεια μεταφέρεται σε πάγο για 14 λεπτά προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων. Μετά την επώαση

γίνεται μεταφορά της υγρής καλλιέργειας σε τέσσερις σωλήνες τύπου *falcon* όγκου 50 mL και ακολουθεί φυγοκέντρηση της σε 4000 g, για 10 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο από τους δύο σωλήνες απορρίπτεται και τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται με ήπια ανάδευση σε 10 mL WFI (σε κάθε σωλήνα). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για άλλη μία φορά και προστίθεται διάλυμα αποστειρωμένης γλυκερόλης 10% v/v στο ίζημα με τελικό όγκο 4 mL. Ακολουθεί άλλη μία φυγοκέντρηση σε 4000 g, για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 250 µL γλυκερόλης 10% v/v. Τελικά τα βακτήρια χωρίζονται σε κλάσματα των 40 µL (σε σωλήνες τύπου *Eppendorf*), ψύχονται σε αιθανόλη που βρίσκεται στους -80°C και αποθηκεύονται στους -80°C. Οι παραπάνω διαδικασίες λαμβάνουν χώρα σε ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένα μέσα και υλικά.

3.3.2.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* OverExpress C41 (DE3) με ηλεκτροδιάτρηση

Το εναιώρημα επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων τοποθετείται στον πάγο και αφού ξεπαγώσει προσθέτουμε 1-50 ng πλασμιδιακού φορέα που φέρει το επιθυμητό γονίδιο και ακολουθεί ηλεκτροδιάτρηση σε ειδική κυψελίδα. Τα μετασχηματισμένα βακτήρια μεταφέρονται σε 0,96 mL αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού μέσου και επωάζονται σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) για μία ώρα. Εν τέλη πραγματοποιείται επίστρωση 30-150 µL εναιωρήματος βακτηριακών κυττάρων σε τρυβλία *petri*, με στερεό θρεπτικό μέσο *LB- Agar* που περιέχει την κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού ανθεκτικότητας των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων. Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 16 ώρες.

3.3.3 Χρωματογραφία

3.3.3.1 Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (FPLC)

Η ÄKTA FPLC (GE Healthcare) είναι το πιο διαδεδομένο σύστημα καθαρισμού πρωτεϊνών. Στο σύστημα αυτό μεταφέρονται υγρά διαλύματα μέσω αντλιών

θετικής μετατόπισης με την εφαρμογή υψηλής πίεσης. Το κάθε είδος χρωματογραφίας (ιοντοανταλλαγής, συγγένειας, μοριακής διήθησης) έχει τις δικές του ειδικά κατασκευασμένες στήλες και το υλικό πλήρωσής τους, είναι κάποιο πολυμερές (δεξτράνη, σεφαρόζη, αγαρόζη) και αποτελεί την στατική φάση, ενώ τα υγρά διαλύματα που διέρχονται από το σύστημα αυτό αποτελούν την κινητή φάση [76]. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα καθαρισμού πρωτεϊνών Äkta Purifier UPC-900 που είναι τοποθετημένο σε ψυκτικό θάλαμο με θερμοκρασία 4°C. Επίσης, στο σύστημα συμπεριλαμβάνονται μια συσκευή συλλογής κλασμάτων στην οποία τοποθετούνται δοκιμαστικοί σωλήνες των 5 mL και φωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) που μετρά την οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 280 nm, μέσω του οποίου ελέγχεται σε πραγματικό χρόνο η περιεκτικότητα των κλασμάτων σε πρωτεΐνες. Ο έλεγχος των παραμέτρων καθαρισμού (διάλυμα, ροή, πίεση, όγκος κλασμάτων) ρυθμίζεται από το πρόγραμμα UNICORN TM, ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας. Όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα που περνάνε μέσα από το σύστημα αυτό είναι υποχρεωτικά φιλτραρισμένα και απαερωμένα.

3.3.3.2 Αρχή της μεθόδου

Τα στάδια της χρωματογραφίας για τον καθαρισμό μια πρωτεΐνης είναι τα εξής:

Εξισορρόπηση (Equilibration): Σε αυτό το στάδιο μέσα από το σύστημα περνάει ένα συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα, το Buffer A. Η σύσταση αυτού του διαλύματος είναι συνήθως ίδια ή παρόμοια με το διάλυμα λύσης των κυττάρων μέσα στο οποίο εκφράζεται η πρωτεΐνη που θέλουμε να απομονώσουμε. Αφήνουμε να περάσουν από το σύστημα 5-10 όγκοι στήλης ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα που βρίσκεται αποθηκευμένο μέσα στη στήλη (συνήθως 20% v/v αιθανόλη) αλλά και να εξομαλυνθεί το περιβάλλον από το οποίο θα διέλθει το δείγμα, ώστε να επιτευχθεί η αντιστρεπτή ομοιοπολική σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου σε αυτή. Σε αυτό το στάδιο θεωρείται πως δεν είναι προσδεμένο κάτι επάνω στη στήλη παρά μόνο ο ακινητοποιημένος συνδέτης. Η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm, μπορεί να παρουσιάζει μικρές διακυμάνσεις, γεγονός που οφείλεται συνήθως στα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης.

Εισαγωγή δείγματος (injection): Σε αυτό το βήμα εισάγουμε το δείγμα μας στη στήλη έτσι ώστε να προσδεθεί η πρωτεΐνη στόχος στα ακινητοποιημένα σωματίδια της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος τα οποία δεν έχουν τη δυνατότητα πρόσδεσης απομακρύνονται από το σύστημα (Flow-Through), ενώ παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, λόγω των πρωτεϊνών που δε καταφέρνουν να συνδεθούν ισχυρά στο προσδέτη της στήλης.

Πλύση (Wash): Έπειτα πραγματοποιείται έκπλυση της στήλης με το διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer). Με την έκπλυση επιτυγχάνεται η απομάκρυνση πρωτεϊνών και άλλων μορίων που δεν εμφανίζουν συγγένεια με την στήλη και δεν μας ενδιαφέρουν. Η έκπλυση γίνεται συνήθως με 5-10 όγκους στήλης. Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm η οποία σταθεροποιείται, λόγω των ανεπιθύμητων πρωτεϊνών που διέρχονται από την συσκευή απορρόφησης του συστήματος.

Έκλουση (Elution): Το τελευταίο στάδιο είναι η έκλουση έτσι ώστε να απομονωθεί η πρωτεΐνη μας σε υψηλή καθαρότητα. Η έκλουση πραγματοποιείται είτε εφαρμόζοντας βαθμίδωση συγκέντρωσης (Gradient) είτε δίδοντας εντολή στο σύστημα να χρησιμοποιήσει εξ' ολοκλήρου το ένα ρυθμιστικό διάλυμα που ονομάζεται διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer). Η σύσταση του διαλύματος έκλουσης προτείνεται συνήθως από το εγχειρίδιο οδηγιών που συνοδεύει τη κάθε χρωματογραφική στήλη. Κατά την έκλουση λοιπόν, η προσδεμένη πρωτεΐνη στόχος απομακρύνεται από την στήλη και συλλέγεται σε κλάσματα υψηλής καθαρότητας. Το στάδιο αυτό έχει ως στόχο τη τελική απομόνωση της πρωτεΐνης στόχου στη μέγιστη δυνατή καθαρότητα [77].

3.3.3.3 Χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography)

Η πιο συχνή μέθοδος χρωματογραφίας είναι η χρωματογραφία συγγένειας. Αυτή η μέθοδος υπερισχύει διότι έχουμε ισχυρής, αντιστρεπτής και εξαιρετικά επιλεκτικής σύνδεσης ανάμεσα σε ορισμένες χημικές ομάδες. Παρατηρείται για παράδειγμα σύνδεση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος, ενζύμου-υποστρώματος και ορμόνης-υποδοχέα [78-80]. Μέσα στην στήλη ο συνδέτης είναι συνήθως ακινητοποιημένος

στην στατική φάση και οι πρωτεΐνες που θέλουμε να απομονώσουμε έχουν υποστεί ανασυνδυασμό ώστε είτε στο N- τελικό, είτε στο C- τελικό τους άκρο να φέρουν το άλλο μέρος (ετικέτα αγκιστείας). Η αποσύνδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στη συνέχεια πραγματοποιείται με την μεταβολή των πειραματικών συνθηκών (μεταβολή pH, ιοντικής ισχύος, προσθήκη ανταγωνιστικού προσδέτη) [80]. Στην παρούσα εργασία η επιθυμητή πρωτεΐνη HbGP, φέρει στο N- τελικό άκρο μία ετικέτα 6 ιστιδινών (6x-His tag) η οποία εμφανίζει συγγένεια με δισθενή ιόντα (Ni^{2+} , Co^{2+}), ο παράγοντας έκλυσης που χρησιμοποιείται είναι το ιμιδαζόλιο εξαιτίας της εξαιρετικής ομοιότητας που παρουσιάζει με το δακτύλιο της ιστιδίνης.

3.3.3.4 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Size Exclusion Chromatography)

Μια άλλη μέθοδος χρωματογραφίας είναι η χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Σε αυτή τη μέθοδο έχουμε διαχωρισμό των συστατικών ενός δείγματος με βάση το μοριακό τους μέγεθος. Το δείγμα μας διέρχεται από μια στήλη που περιέχει κόκκους από ένα αδιάλυτο πολυμερές που μπορεί να συγκρατήσει πολύ νερό (π.χ. δεξτράνη ή αγαρόζη). Συνήθως η διάμετρος των πόρων των πολυμερών ανέρχεται σε 0,1 mm. Μέσα στη στήλη οι πρωτεΐνες καθώς και τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος ακολουθούν μια συγκεκριμένη διαδρομή αναλόγως του μεγέθους τους. Συγκεκριμένα, τα μεγαλύτερα μόρια βρίσκονται διαλυμένα στην υδατική φάση εκτός του πλέγματος που σχηματίζει το αδιάλυτο πολυμερές της στήλης, ενώ αντίθετα τα μικρότερα μόρια διαλύονται τόσο εντός όσο και εκτός της υδατικής φάσης του πλέγματος. Επομένως, τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους εκκλύονται πρώτα, λόγω της μικρής διαδρομής που διασχίζουν ενώ το αντίθετο ισχύει για τα μικρότερα μόρια.

3.3.4 Απομόνωση και καθαρισμός φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (HbGP)

Για να υπερεκφράσουμε την HbGP χρησιμοποιήσαμε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* του στελέχους OverExpress C41 (DE3) προ-μετασηματισμένα με το πλασμίδιο pGro7 (που κωδικοποιεί τις μοριακές συνοδούς GroES-GroEL). Η ηλεκτροδιάτρηση

είναι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματιστούν τα βακτήρια με το πλασμιδιακό φορέα στον οποίο είναι εντεθειμένο το γονίδιο της HbGP (pET-28a). Τα βακτήρια έχουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη (λόγω του pET-28a) και χλωραμφαινικόλη (λόγω του pGro7).

Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε τρυβλία petri σε στερεό μέσο ανάπτυξης LB-Agar (με περιεκτικότητα σε καναμυκίνη 20 µg/mL και χλωραμφαινικόλη 34 µg/mL) και έγινε επιλογή μίας μοναδιαίας αποικίας. Την αποικία αυτή την ενοφθαλμίσαμε σε 100 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB-Broth (με περιεκτικότητα σε καναμυκίνη 20 µg/mL, χλωραμφαινικόλη 34 µg/mL και επαγωγέα pGro7 L- αραβινόζη: 0,15 mg/mL) και στη συνέχεια τα τοποθετήσαμε σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) για 16 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών πήραμε κάποια ποσότητα της υγρής καλλιέργειας και τη μεταφέραμε σε μία νέα υγρή καλλιέργεια LB-Broth 4L (4 κωνικές φιάλες των 2L με 1L υγρού θρεπτικού μέσου η κάθε μία) με αναλογία 1:100 (με περιεκτικότητα σε καναμυκίνη 20 µg/mL και χλωραμφαινικόλη 34 µg/mL). Πριν τοποθετήσουμε την αποικία στο νέο θρεπτικό μέσο, κρατήθηκε 1 mL ως μάρτυρας έτσι ώστε να ελέγχουμε την ανάπτυξη των βακτηρίων μετρώντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 600 nm. Οι υγρές καλλιέργειες βακτηρίων αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Μόλις παρατηρήσαμε ότι η οπτική πυκνότητα έφτασε στις τιμές 0,2-0,3 προσθέσαμε τον επαγωγέα των μοριακών συνοδών (L- αραβινόζη: 0,15 mg/mL) και όταν έφτασε στις τιμές 0,6-0,8 τοποθετήσαμε τις φιάλες σε πάγο για 20 λεπτά με σκοπό να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων και να γίνει επαγωγή της υπερέκφρασης της HbGP (τελική συγκέντρωση IPTG= 0,5 mM). Η επαγωγή πραγματοποιήθηκε μετά την προσθήκη του επαγωγέα σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 16°C υπό ανάδευση (210 rpm) O/N και μόλις ολοκληρώθηκε, συλλέξαμε τα κύτταρα κάνοντας διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε δοχεία όγκου 500 mL (corex) σε θερμοκρασία 4°C, 5000 rpm για 30 λεπτά. Από τις φυγοκεντρήσεις κρατάμε μόνο το ίζημα (το υπερκείμενο απομακρύνεται) και στη συνέχεια το επαναδιαλυτοποιούμε σε διάλυμα λύσης (PMSF) το οποίο αναστέλλει τις πρωτεάσες. Η διαλυτοποίηση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με ήπια ανάδευση (up-down), μέσα σε

πάγο και μόλις ολοκληρώθηκε, στο κυτταρόλυμα προσθέσαμε 1 μL από μία βενζονάση (νουκλεάση), παρουσία της οποίας το κυτταρόλυμα επώαζεται για 10 λεπτά. Μετά την επώαση διαλυτοποιήσαμε τα βακτήρια σε συσκευή υπερήχων σε 6 κύκλους διάρκειας 1 λεπτού (30 δευτερόλεπτα ON, 30 δευτερόλεπτα OFF) με ένταση (Amplitude): 70%. Το κυτταρόλυμα που προκύπτει το φυγοκεντρούμε περαιτέρω σε θερμοκρασία 4°C, 15000 rpm για 1 ώρα και 30 λεπτά και μόλις ολοκληρωθεί, φιλτράρουμε το υπερκείμενο με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm και το αφήνουμε σε πάγο. Για την απομόνωση της HbGP χρησιμοποιήθηκε το αυτοματοποιημένο σύστημα ÄKTA FPLC.

1ο Βήμα καθαρισμού: HiTrap TALON crude (ακίνητοποιημένα ιόντα Co^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης)

Για να εξισορροπήσουμε την στήλη χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα εξισορρόπησης (πίνακας 3.3.5.α) περάσαμε τουλάχιστον 10 όγκους από τη στήλη με ροή 0,5 mL/min. Μετά εισαγάγαμε το δείγμα στη στήλη με ροή 0,3 mL/min και συλλέξαμε κλάσματα των 5 mL. Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα έκπλυσης (πίνακας 3.3.5.β) για περίπου 10 όγκους στήλης μέχρι η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να προσεγγίσει το 0 με ροή 1 mL/min, ενώ συλλέξαμε κλάσματα όγκου 5 mL. Τέλος, πραγματοποιήσαμε έκπλυση και συλλέξαμε κλάσματα όγκου 1 mL. Όταν η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm φτάσει στο 0 ρυθμίσαμε στο σύστημα να διοχετεύει μόνο από την αντλία B (500 mM ιμιδαζολίου). Στη συνέχεια αναλύσαμε τα κλάσματα σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες προκειμένου να διαπιστώσουμε ποια κλάσματα περιέχουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε μεγαλύτερη καθαρότητα.

Διάλυμα Εξισορρόπησης pH= 8

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
Tris	50 mM
NaCl	0,3 mM
Triton X-100	0,1 %
Ιμιδαζόλιο	10 mM

Πίνακας 3.3.5.α: Σύσταση διαλύματος εξισορρόπησης

Διάλυμα έκπλυσης pH= 8

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
Tris	50 mM
NaCl	0,3 mM
Triton X-100	0,1 %
Ιμιδαζόλιο	10 mM

Πίνακας 3.3.5.β: Σύσταση διαλύματος έκπλυσης

Διάλυμα έκπλυσης pH= 8

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
Tris	50 mM
NaCl	0,3 mM
Triton X-100	0,1 %
Ιμιδαζόλιο	500 mM

Πίνακας 3.3.5.γ: Σύσταση διαλύματος έκπλυσης

Τα κλάσματα στα οποία εντοπίζεται η πρωτεΐνη σε επιθυμητή καθαρότητα ενώνονται και υποβάλλονται σε διαπίδυση με διάλυμα 50:50:1.

Διάλυμα 50:50:1 pH= 6,8

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
β-GP	50 mM
β-Μερκαπτοαιθανόλη	50 mM
EDTA	1 mM

Πίνακας 3.3.5.δ: Σύσταση διαλύματος 50:50:1

2ο Βήμα καθαρισμού: Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Superdex S200.

Για να εξισορροπήσουμε τη στήλη χρησιμοποιήσαμε το διάλυμα 50:50:1 για 1 όγκο στήλης (120 mL) και εισάγουμε το δείγμα στο σύστημα με ροή 0,5 mL/min. Τα κλάσματα που συλλέξαμε είχαν όγκο 1 mL έτσι ώστε να εντοπίσουμε την πρωτεΐνη ύστερα από ανάλυση σε πηκτή SDS- πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες και συμπύκνωση με κατώφλι φίλτρου 30 kDa.

3.3.5 Φωσφορυλίωση HbGP

Για να μπορέσουμε να αξιολογήσουμε την δραστικότητα της HbGPα χρειάζεται η HbGPb να φωσφορυλιωθεί. Αυτή η φωσφορυλίωση έγινε με βάση πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο και χρήση της gmPhkg [86]. Η φωσφορυλίωση

πραγματοποιήθηκε ύστερα από τον καθαρισμό της HbGPb και το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα ρυθμιστικό διάλυμα (πίνακας 3.3.5.α) παρουσία 2 mM ATP, 10 ng/mL *rmPhkg-trunc* και 0,5 mg/mL HbGP. Προσθέσαμε επίσης BSA 5 mg/mL έτσι ώστε να μην γίνει προσκόλληση του ενζύμου στα τοιχώματα του σωλήνα. Η αντίδραση ξεκινάει ύστερα από την προσθήκη του ATP και ακολουθεί επώαση 1 ώρα και 30 λεπτά σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C. Με το πέρας της αντίδρασης η διαδικασία διακόπτεται με την τοποθέτηση του πρωτεϊνικού διαλύματος σε πάγο.

Ρυθμιστικό διάλυμα (pH= 8,2)

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
<i>Tris-HCl</i>	50 mM
<i>Hepes</i>	50 mM
<i>CaCl₂</i>	0,5 M
<i>DTT</i>	2 mM
<i>(CH₃COO)₂Mg</i>	10 mM

Πίνακας 3.3.5.α: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορυλίωσης.

3.3.6 Υπολογισμός σταθεράς Michaelis-Menten (Km)

Η παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος πραγματοποιείται με την αραιώση του ενζυμικού εναιωρήματος σε διάλυμα 50:50:1. Η σύσταση του ενζυμικού διαλύματος είναι η εξής: 1,3 μg/mL HbGP, 1% (w/v) γλυκογόνο, 5% διάλυμα v/v 50:50:1. Παρασκευάζουμε επίσης τα υποστρώματα της G1P σε άλλους δοκιμαστικούς σωλήνες με συγκεντρώσεις 1, 2, 3, 4, 6, 10 mM προσθέτοντας 40 μL υποστρώματος G1P συγκέντρωσης 4,5-45 mM, 7,2 μL AMP 25 mM, 93,2 μL dH₂O.

Η έναρξη της διαδικασίας γίνεται με την επώαση του ενζυμικού διαλύματος σε υδατόλουτρο για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 30°C καθώς και των υποστρωμάτων για 3 λεπτά. Όταν ολοκληρωθεί η επώαση προσθέτουμε 36 μL από το ενζυμικό διάλυμα σε κάθε σωλήνα με διαφορετική συγκέντρωση υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Κάθε 5 λεπτά παίρνουμε 40 μL από κάθε σωλήνα και τα μεταφέρουμε σε άλλους σωλήνες που περιέχουν 10 μL SDS (1% w/v) ώστε να σταματήσει η αντίδραση.

Στη συνέχεια για να πάρουμε τα αποτελέσματα κάνουμε φωτομετρικό προσδιορισμό του φωσφόρου μετά την επώαση του δείγματος με ένα διάλυμα ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου/οξικού ψευδαργύρου. Να σημειωθεί ότι έχει γίνει παρασκευή τυφλών της G1P, του ενζυμικού διαλύματος, νερού και ορθοφωσφορικών ιόντων (Pi) πριν την φωτομέτρηση.

3.3.7 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας

Η ειδική δραστηριότητα ορίζεται ως τα μμολ υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε mg πρωτεΐνης. Για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε την ειδική δραστηριότητα μελετήσαμε την αντίστροφη αντίδραση που καταλύει το ένζυμο, δηλαδή όχι την φωσφορυλίωση αλλά την αντίδραση τη σύνθεση γλυκογόνου από G1P καθώς ταυτόχρονα απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (Pi). Επιλέξαμε αυτόν τον τρόπο λόγω της ικανότητας των φωσφορικών ιόντων να σχηματίζουν χρωμοφόρα σύμπλοκα τα οποία απορροφούν σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.

3.3.8 Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Σε ήπιο όξινο περιβάλλον, παρουσία οξικού ψευδαργύρου σχηματίζεται μία έγχρωμη ετεροπολυμεταλλική ένωση η οποία ανάγεται με ασκορβικό οξύ και απορροφά σε μήκος κύματος 850 nm. Αρχικά παρασκευάζουμε διάλυμα 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου και 100 mM οξικού ψευδαργύρου με pH 5 και διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v) με pH 5. Αναμιγνύουμε τα διαλύματα με αναλογία 4:1 (διάλυμα οξικού ψευδαργύρου/ μολυβδαινικού αμμωνίου: διάλυμα ασκορβικού) σε ένα σκούρο σωλήνα και αφήνουμε το μίγμα να επωαστεί για 15 λεπτά στο σκοτάδι ώστε να σχηματιστεί η έγχρωμη ένωση. Στη συνέχεια μεταφέρουμε 70 μL σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, αναδεύουμε σε vortex και αφήνουμε τα δείγματά μας να επωαστούν για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο. Τέλος, γίνεται φωτομέτρηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 850 nm.

3.3.9 Προσδιορισμός *K_i*

Ο αναστολέας στο μίγμα της αντίδρασης μειώνει την ταχύτητα σύνθεσης του γλυκογόνου και την ταχύτητα απελευθέρωσης των φωσφορικών ιόντων. Αυτή την μείωση της ταχύτητας μπορούμε να την εκφράσουμε ως αναστολή σύμφωνα με τα μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

	Διάλυμα παρουσία αναστολέα	Διάλυμα δίχως αναστολέα
G1P	40 μL	40 μL
A-D-γλυκόζη	3,6 μL	-
dH₂O	100,4 μL	104 μL
Τελικός όγκος (V_{TEΛ})	144 μL	144 μL

Πίνακας 3.3.10.α: Σύσταση διαλυμάτων για τον προσδιορισμό της *K_i*

3.3.10 Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Πραγματοποιήσαμε ανάλυση των κινητικών δεδομένων έτσι ώστε να δημιουργήσουμε τα απαραίτητα διαγράμματα καθώς και να υπολογίσουμε τις κινητικές παραμέτρους (K_m , V_{max}) και την ειδική δραστικότητα του ενζύμου με το υπολογιστικό πρόγραμμα GraFit.

Αρχικά, έπρεπε να προβούμε σε κανονικοποίηση των απορροφήσεων των δειγμάτων σε μήκος κύματος 850 nm ως προς την απορρόφηση της G1P και των φωσφορικών του διαλύματος, μετατρέποντάς τες σε μολι ορθοφωσφορικών ιόντων σύμφωνα με τη πρότυπη καμπύλη φωσφορικών ιόντων. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης φωτομετρήσαμε διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων με γνωστή συγκέντρωση. Σε ένα διάλυμα φωσφορικών ιόντων 1 mM και όγκου 40 μL υπάρχουν 0,04 μολι ορθοφωσφορικών. Έστω ότι το τυφλό διάλυμα παρουσιάζει απορρόφηση A, τότε η απορρόφηση αυτή δηλώνει την παρουσία 0,04 μολι ορθοφωσφορικών. Έτσι υπολογίζεται η ποσότητα τους σε μολι για κάθε δείγμα.

Η εξίσωση Michaelis-Menten χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σταθεράς K_m .

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

Όπου:

V: ταχύτητα αντίδρασης

V_{max} : Μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης

[S]: Συγκέντρωση προϊόντος

K_m : Σταθερά Michaelis- Menten.

Η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία αντιστοιχεί το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας υπολογίζεται από την καμπύλη με μορφή κορεσμού $V = f([S])$.

4. Αποτελέσματα

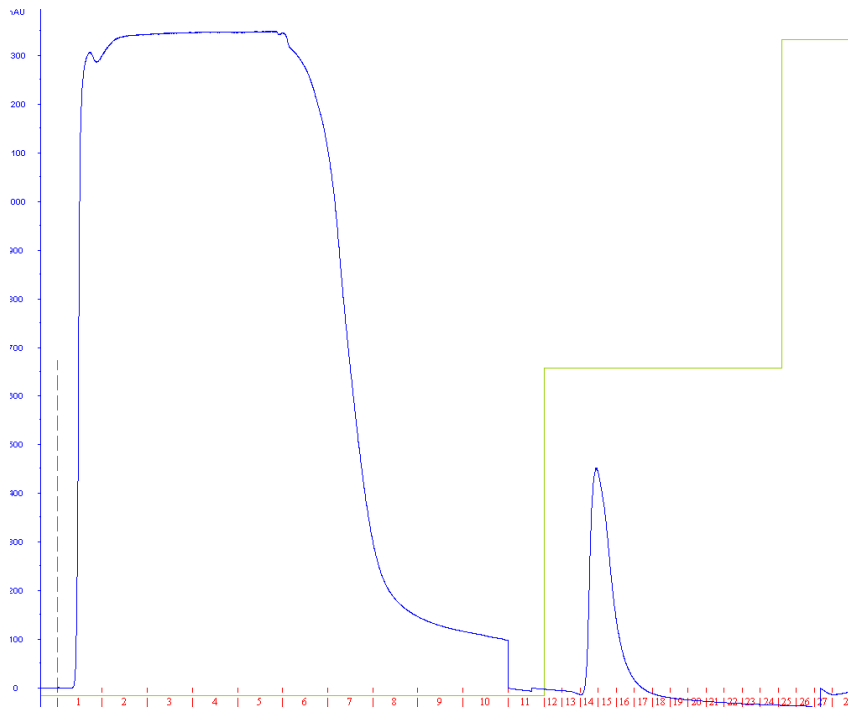
4.1 Απομόνωση HbGP

Η υπερέκφραση της HbGP πραγματοποιήθηκε στο στέλεχος *E. coli OverExpress C41 (DE3)* και η καθαρή πρωτεΐνη που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω κινητικές μελέτες.

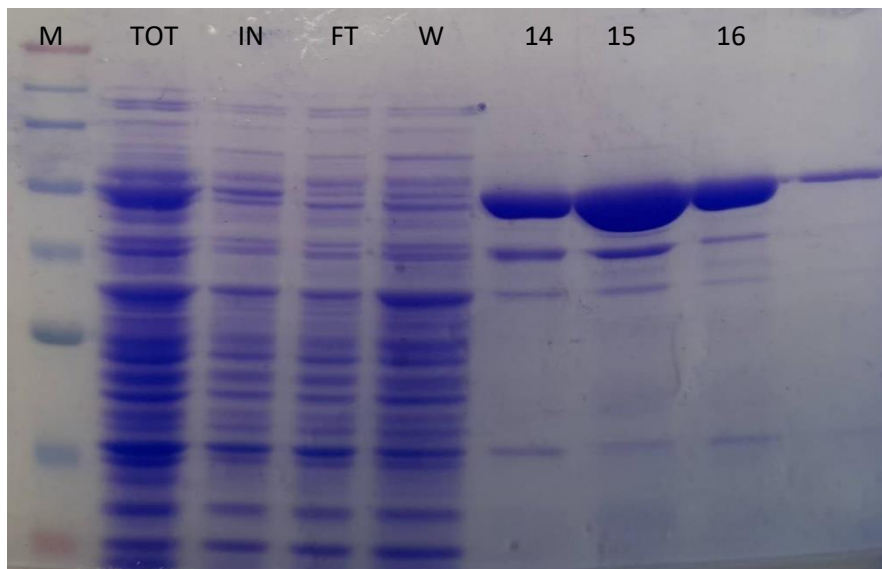
1^ο Βήμα καθαρισμού: *HiTrap TALON crude* (ακίνητοποιημένα ιόντα Co^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης)

Η στήλη μας έχει ακίνητοποιημένα ιόντα Co^{2+} πάνω στα οποία είναι ικανή να συνδεθεί η HbGP λόγω της συγγένειας που παρουσιάζει ετικέτα των 6 ιστιδινών (6x His Tag). Τα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε σε αυτό το βήμα περιείχαν χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου (10 mM) το οποίο παρουσιάζει και αυτό συγγένεια με τα ιόντα Co^{2+} . Ο λόγος που χρησιμοποιούμε χαμηλής συγκέντρωσης ιμιδαζόλιο στα διαλύματα εξισορρόπησης και έκπλυσης είναι γιατί ευνοεί τη σύνδεση της HbGP και ταυτόχρονα εμποδίζει τη σύνδεση άλλων πρωτεϊνών. Όμως, στο διάλυμα έκλουσης χρησιμοποιούμε μεγάλη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (500 mM) το οποίο οδηγεί την αποσύνδεση της πρωτεΐνης μας από τη στήλη.

Ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (10%) με σκοπό να ελεγχθεί η καθαρότητα των δειγμάτων. Το μοριακό βάρος της hbGPa είναι ~100 kDa.



Εικόνα4.1.α: Το 1^ο βήμα καθαρισμού της HbGP. Στα κλάσματα 1-10 περιέχονται οι πρωτεΐνες που δεν είχαν συγγένεια με τη στήλη και άρα δε συνδέθηκαν (flow-through). Στα κλάσματα 11-13 περιέχονται πρωτεΐνες που απομακρύνθηκαν από την έκπλυση της στήλης (wash). Στα κλάσματα 14-16 περιέχεται η HbGP (elution).

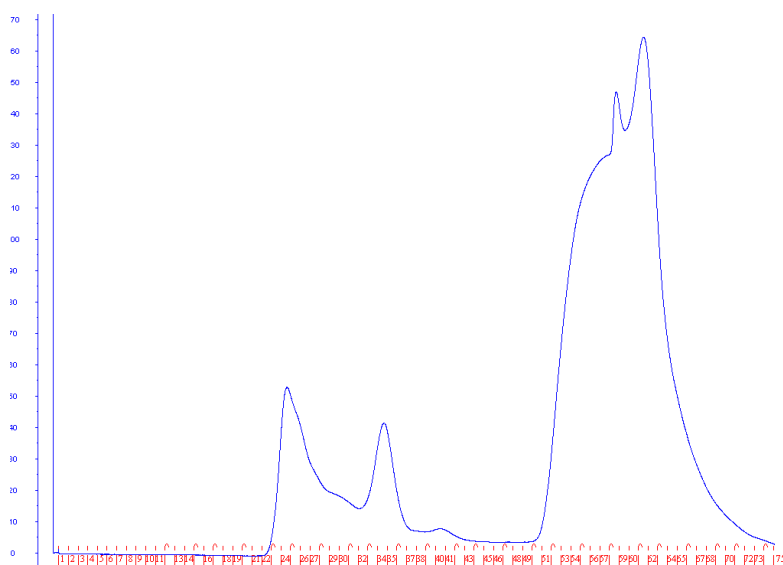


Εικόνα 4.1.β: Πρώτο βήμα καθαρισμού της hbGPb. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στην πρώτη διαδρομή (TOT) είναι δείγμα από το σύνολο των πρωτεϊνών μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Στη δεύτερη διαδρομή (IN) δείγμα από το σύνολο των πρωτεϊνών μετά από φυγοκέντρηση σε υψηλές στροφές (lysate). Στην τρίτη διαδρομή δείγμα από την ενοποίηση των κλασμάτων 1 και 2 (FT). Στη τέταρτη διαδρομή δείγμα από το κλάσμα 11-12 (W). Στις υπόλοιπες διαδρομές εμφανίζεται δείγματα από τα κλάσματα 14, 15 και 16.

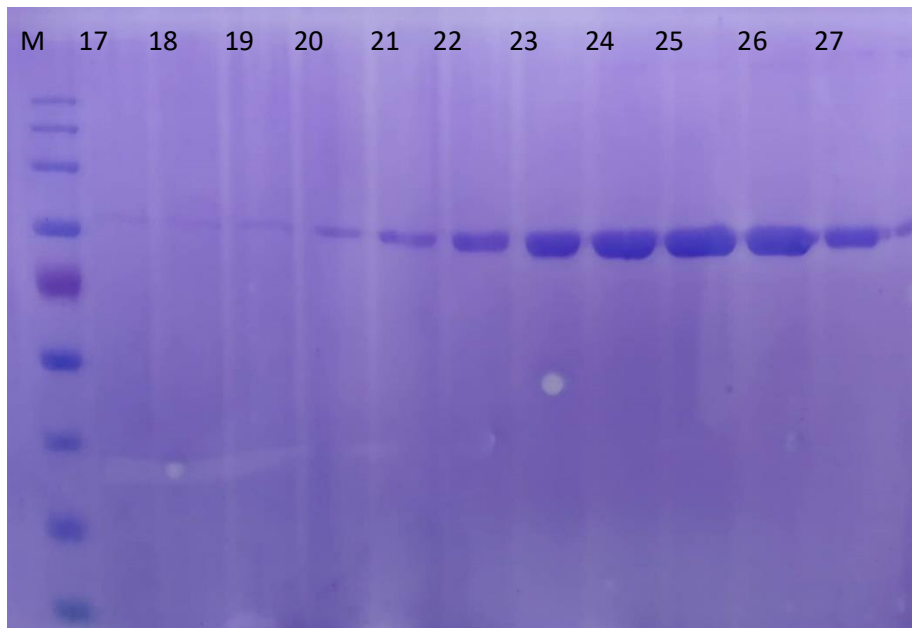
Τα κλάσματα 14-16 της έκλουσης τα ενώσαμε και πήραμε πρωτεϊνικό διάλυμα όγκου 6 mL. Στη συνέχεια το διάλυμα το υποβάλαμε σε διαπίδυση σε διάλυμα 50mM Tris-HCl, 0.2M NaCl, 0,1% (w/v) Triton-X, pH:8. Μετά το πέρας της διαπίδυσης προστέθηκε στο δείγμα μας Thrombine (0.5 u/mg) για διάστημα 4 ωρών. Αφού πέρασε το διάστημα των τεσσάρων ωρών και με σκοπό να σταματήσει η δράση της Thrombine πραγματοποιήθηκε διαπίδυση σε διάλυμα 100mM Tris-HCl, 50mM β-mercaptoethanol, 100mM NaCl pH:8. Τέλος, μετά το πέρας της διαπίδυσης το δείγμα συμπυκνώθηκε με φίλτρο που έχει ως κατώφλι τα 30 kDa.

2^ο Βήμα καθαρισμού: *Superdex S200*

Το συμπυκνωμένο δείγμα ησήχθη σε στήλη μοριακής διήθησης και το χρωματογράφημα παρουσιάζεται στη παρακάτω εικόνα. Μέσω αυτού του βήματος επιτυγχάνεται ταυτόχρονα και ο διαχωρισμός της hbGPb από τη Thrombine.



Εικόνα 4.1.γ: 2^ο βήμα καθαρισμού της HbGP. Η HbGP εντοπίζεται στα κλάσματα 23-28.

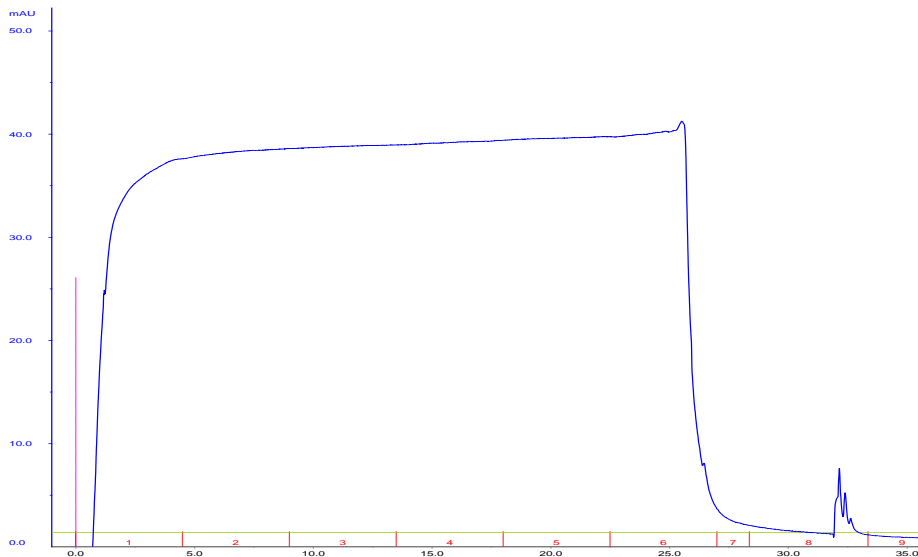


Εικόνα 4.1.δ: Δεύτερο βήμα καθαρισμού της hbGPb. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Οι διαδρομές 17-27 αντιστοιχούν στα αντίστοιχα κλάσματα του παραπάνω χρωματογραφήματος.

Τα κλάσματα 22-27 ενώθηκαν με αποτέλεσμα να προκύψει πρωτεϊνικό διάλυμα όγκου 6 mL. Το πρωτεϊνικό διάλυμα υφίσταται συμπύκνωση με φίλτρο που έχει ως κατώφλι τα 30 kDa.

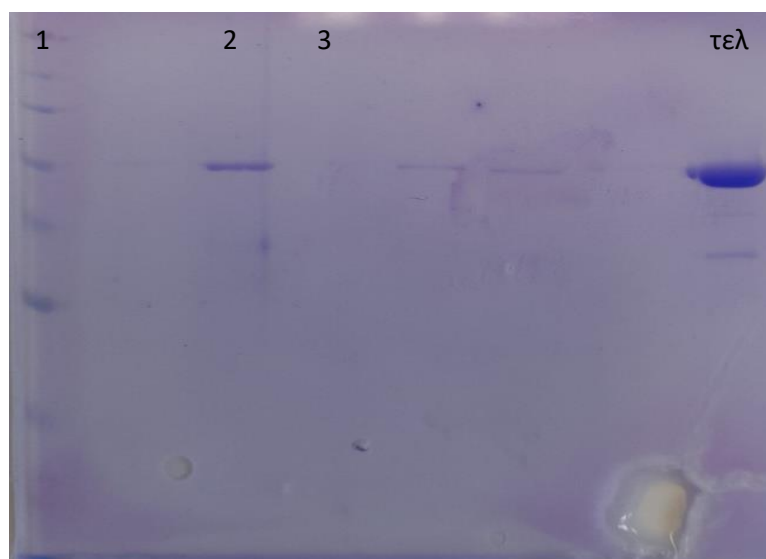
3^ο Βήμα καθαρισμού: HiTrap TALON crude (ακινητοποιημένα ιόντα Co^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης)

Το τρίτο στάδιο της απομόνωσης και καθαρισμού της hbGPb αφορούσε την απομάκρυνση της πρωτεΐνης η οποία δεν διέθετε ετικέτα ιστιδινών και δεν προσδέθηκε στη στήλη (Εικόνα 4.1.ε).



Εικόνα 4.1.ε: Τρίτο βήμα καθαρισμού της hbGPb μετά την αποκοπή της ετικέτας συγγενείας. Το κλάσμα 1-6 περιέχει πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (FlowThrough). Εκεί βρίσκεται και η τμημένη πρωτεΐνη. Τα κλάσματα 7 και 8 έχουν την έκπλυση της στήλης (Wash),

Παρατήρηση της πηκτής πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.



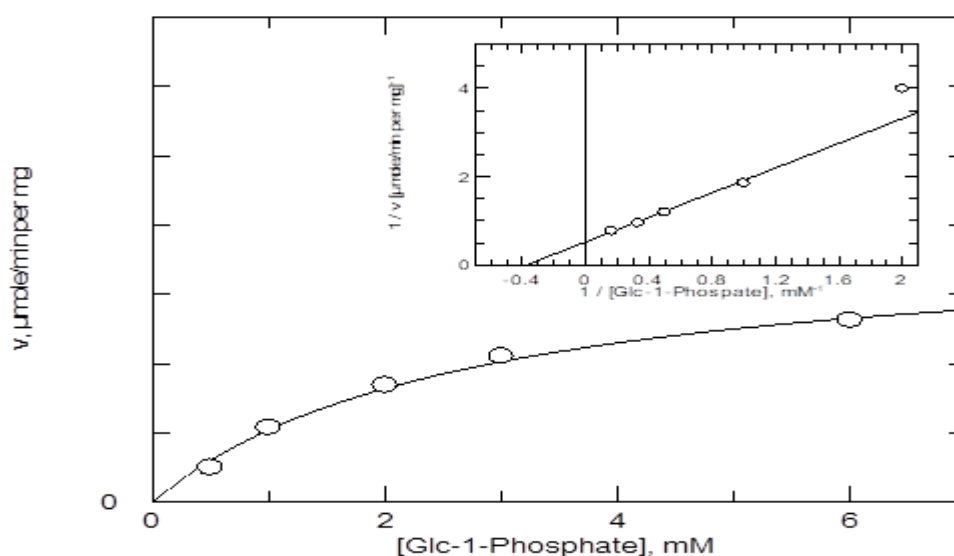
Εικόνα 4.1.στ: Τρίτο βήμα καθαρισμού της hbGPb. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Στη δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το flowthrough, όπου υπάρχει hbGPb, κλάσμα 1-6 του χρωματογραφήματος. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται η έκπλυση (Wash) της στήλης (κλάσματα 7 και 8 του χρωματογραφήματος). Στη τελευταία διαδρομή φαίνεται η καθαρή και συμπυκνωμένη πρωτεΐνη.

Η τελική απόδοση της απομόνωσης ήταν 0,7mg καθαρής πρωτεΐνης από 4L βακτηριακής καλλιέργειας.

4.2 Κινητικές μελέτες

4.2.1 Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (HbGP)

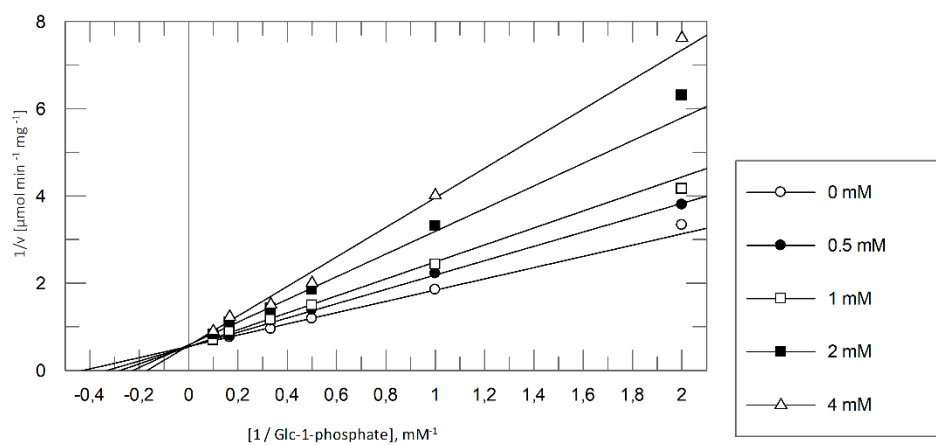
Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων (K_m , V_{max}) διεξήχθη στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα GraFit. Οι κινητικές παράμετροι της hbGPα προσδιορίστηκαν σε $K_m = 2.68 \pm 0.38$ mM και $V_{max} = 1.92 \pm 0.12$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Στην παρακάτω Εικόνα 4.2.1.α παρουσιάζεται το διάγραμμα.



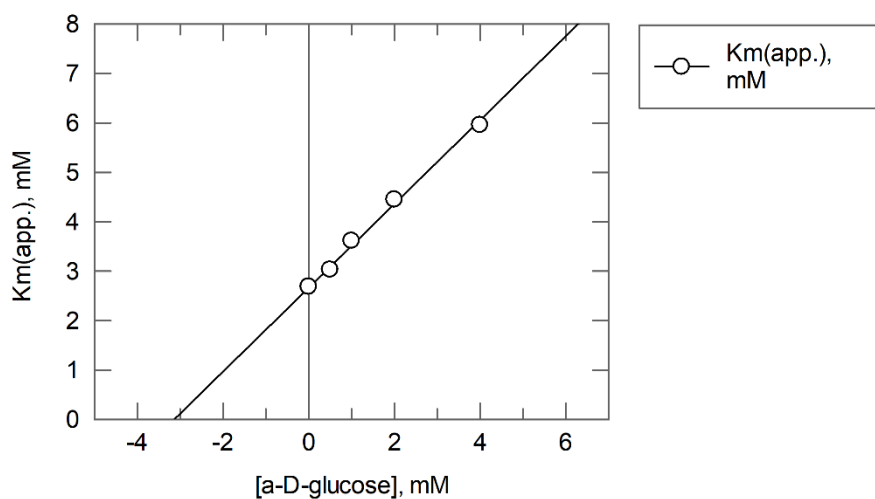
Εικόνα 4.2.1.α: Διάγραμμα Michaelis-Menten κινητικής μελέτης της hbGPα σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος Glc-1-P (0.5, 1, 2, 3, 6 mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση γλυκογόνου (0,2% w/v). Το διάγραμμα (σε σχήμα υπερβολής) παρουσιάζει τη ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση υποστρώματος. Στο ένθετο βρίσκεται το αντίστροφο διάγραμμα γνωστό και ως Lineweaver-Burk από όπου και προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max} .

4.2.2 Προσδιορισμός K_i του αναστολέα γλυκόζη έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (HbGP)

Μελέτες με καθαρή γλυκόζη έδειξαν πως η ένωση αυτή αποτελεί συναγωνιστικό αναστολέα έναντι της HbGPα με σταθερά αναστολής 3.14 ± 0.17 mM.



Εικόνα 4.2.2.α: Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της γλυκόζης έναντι της hBGPα προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογονού (0,2% w/v). Οι συγκεντρώσεις της α-D-γλυκόζης ήταν 0, 0.5, 1, 2 και 4 mM.



Εικόνα 4.2.2.β: Διάγραμμα K_{mapp} ως προς τη συγκέντρωση α-D-γλυκόζης, από το οποίο υπολογίζεται και η τιμή της K_i .

5. Συζήτηση

Στη παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε βιοχημικός χαρακτηρισμός της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (*HbGP*). Η πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 98,8 *KDa*, θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο (*pI*): 6.60 και ετικέτα αγγιστείας έξι ιστιδινών (*His-Tag*) στο *N*-τελικό της άκρο. Το γονίδιο της είναι το *PYGP*, το οποίο ενθέσαμε σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης *pet-28a*. Η υπερέκφραση πραγματοποιήθηκε σε μεγάλη κλίμακα από το στέλεχος *E. coli OverExpress C41 (DE3)*, *pGro7*. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της *HbGP* σε σύστημα ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών *AKTA-FPLC* με τη χρήση δύο στηλών χρωματογραφίας (στήλη συγγένειας, στήλη μοριακής διήθησης). Με την παραπάνω διαδικασία καταφέραμε να απομονώσουμε 0,7 mg *HbGP*. Η απομονωμένη πλέον πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή κινητικών πειραμάτων, ώστε να προσδιοριστούν οι K_m , V_{max} . Οι τιμές που προέκυψαν είναι οι εξής: $K_m = 2.68 \pm 0.38$ mM και $V_{max} = 1.92 \pm 0.12$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Η σταθερά αναστολής της α -D-γλυκόζης προσδιορίστηκε σε $K_i = 3.14 \pm 0.17$ mM.

Οι τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i) της α -D-γλυκόζης για την *gmGP* είναι 4,9 mM ενώ για την *hlGP* 4,28 . Συνεπώς φαίνεται πως η *HbGP* εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για την α -D-γλυκόζη από ότι τα άλλα δύο ένζυμα.

6. Βιβλιογραφία

1. Preiss J, Walsh DA. The comparative biochemistry of glycogen and starch. In: Ginsburg V, Robbins P, editors. *Biology of Carbohydrates*. John Wiley and Sons; New York: 1981. pp. 199–314.
2. Ball S, Guan HP, James M, Myers A, Keeling P, Mouille G, Buleon A, Colonna P, Preiss J. From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell*. 1996;86:349–352
3. Zeeman SC, Smith SM, Smith AM. The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem J*. 2007;401:13–28.
4. Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J*. 2012;441(3):763-87
5. Gunja-Smith Z, Marshall JJ, Mercier C, Smith EE, Whelan WJ. A revision of the Meyer–Bernfeld model of glycogen and amylopectin. *FEBS Lett*. 1970;12:101–104.
6. Melendez-Hevia E, Waddell TG, Shelton ED. Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem J*. 1993;295:477–483.
7. Meléndez R, Meléndez-Hevia E, Cascante M. How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. *J Mol Evol*. 1997;45:446–455.
8. Goldsmith E, Sprang S, Fletterick R. Structure of maltoheptaose by difference Fourier methods and a model for glycogen. *J Mol Biol*. 1982;156:411–427.
9. McGarry JD, Kuwajima M, Newgard CB, Foster DW, Katz J. From dietary glucose to liver glycogen: the full circle round. *Annu Rev Nutr*. 1987;7:51–73.
10. Jeremy M. Berg, J.L.T., Lubert Stryer, Βιοχημεία. 7 ed. 2014: ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ.
11. Youngren, J.F., Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci*, 2007. 64(7-8): p. 873-91.
12. Newgard, C.B., P.K. Hwang, and R.J. Fletterick, The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1989. 24(1): p. 69-99.
13. Cohen, P., The subunit structure of rabbit-skeletal-muscle phosphorylase kinase, and the molecular basis of its activation reactions. *Eur J Biochem*, 1973. 34(1): p. 1-14.
14. Cohen, P., Protein phosphorylation and the control of glycogen metabolism in skeletal muscle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1983. 302(1108): p. 13-25.

15. Cohen, P., Phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle. *Methods in enzymology*, 1983. 99: p. 243-250.
16. Fletterick, R.J. and N.B. Madsen, The structures and related functions of phosphorylase a. *Annu Rev Biochem*, 1980. 49: p. 31-61.
17. Dombradi, V., Structural aspects of the catalytic and regulatory function of glycogen phosphorylase. *Int J Biochem*, 1981. 13(2): p. 125-39.
18. Agius, L., Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Mol Aspects Med*, 2015. 46: p. 34-45.
19. Mathieu C, L.d.I.S.-G.I., Duval R, Xu X, Coccagn A, Leger T, Woffendin G, Camadro J-M, Etchebest C, Haouz A et al, Insights into brain glycogen metabolism: the structure of human brain glycogen phosphorylase. *Biol Chem J*, 2016. 291: p. 18072–18083.
20. Sprang, S.R., et al., Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase b by adenosine monophosphate. *Science*, 1991. 254(5036): p. 1367-71.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Gaboriaud-Kolar N, Skaltsounis AL. Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review (2008 - 2012). *Exp Opin Ther Pat*. 2013;23(8):1017-32
27. Donnier-Maréchal M, Vidal S. Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review (2013-2015). *Exp Opin Ther Pat*. 2016;26(2):199-212.
28. Zois CE, Harris AL. Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *J Mol Med*. 2016;94(2):137-54.
29. Weinstein, J.W.D., Glycogen storage diseases. *Rev Endocr Metab Disord*, 2003. 4: p. 95-102.
30. J.Duran, A.G., M. Garcia-Rocha, J.M. Garcia-Delgado, J.J. Guinovart, Glycogen accumulation underlies neurodegeneration and autophagy impairment in Lafora disease. *Hum Mol Genet*, 2014. 23: p. 3147-3156.
31. J.Duran, A.G., M. Garcia-Rocha, J.M. Garcia-Delgado, J.J. Guinovart, Glycogen accumulation underlies neurodegeneration and autophagy impairment in Lafora disease. *Hum Mol Genet*, 2014. 23: p. 3147-3156.
32. J-F Cloix, T.H., Glycogen as a putative target for diagnosis and therapy in brain pathologies. *ISRN Pathol*, 2011. 2011: p. 1-17.
33. Johnson, L.N., Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J*, 1992. 6(6): p. 2274-82.

34. Hayes JM, Kantsadi AL, Leonidas DD. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochem Rev*. 2014;13(2):471-98.
35. 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.
36. 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.
37. Anand David, A.V., R. Arulmoli, and S. Parasuraman, Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacogn Rev*, 2016. 10(20): p. 84-89.
38. Chemical Structure of Quercetin. 2004: PubChem.
39. 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 binding. *Protein Sci*, 1998. 7(4): p. 915-27.
40. 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.
41. Oikonomakos, N.G., Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr Protein Pept Sci*, 2002. 3(6): p. 561-86.
42. 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.
43. 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.
44. Barford, D. and L.N. Johnson, The molecular mechanism for the tetrameric association of glycogen phosphorylase promoted by protein phosphorylation. *Protein Sci*, 1992. 1(4): p. 472-93.
45. Brown, A.M. and B.R. Ransom, Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 2007. 55(12): p. 1263-71.
46. W. Bloom, D.W.F., A textbook of histology. 1968.
47. P.J. Magistretti, O.S., J.L. Martin, Regulation of glycogen metabolism in astrocytes: Physiological, pharmacological, and pathological aspects. *Astrocytes: pharmacology and function*. 1993: San Diego, Academic Press.
48. Falkowska, A., et al., Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(11): p. 25959-81.
49. Hertz, L., L. Peng, and G.A. Dienel, Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007. 27(2): p. 219-49.
50. Magistretti, P.J., et al., Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells. *Dev Neurosci*, 1993. 15(3-5): p. 306-12.
51. Hertz, L., L. Peng, and G.A. Dienel, Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007. 27(2): p. 219-49.

52. A. Suzuki, S.A.S., O. Bozdagi, G. W. Huntley, R. H. Walker, P. J. Magistretti, C. M. Alberini, Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 2011. 144: p. 810-823.
53. Cavanagh, J.B., Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res Brain Res Rev*, 1999. 29(2-3): p. 265-95.
54. Rohn, T.T., Corpora Amylacea in Neurodegenerative Diseases: Cause or Effect? *Int J Neurol Neurother*, 2015. 2(3).
55. Delgado-Escueta, A.V., S. Ganesh, and K. Yamakawa, Advances in the genetics of progressive myoclonus epilepsy. *Am J Med Genet*, 2001. 106(2): p. 129-38.
56. Girard, J.M., et al., Progressive myoclonus epilepsy. *Handb Clin Neurol*, 2013. 113: p. 1731-6.
57. G. R. Lafora, B.G., B. Beitrag zur Histopathologie der myoklonischen Epilepsie. *Neurol. Psychiatr*, 1911. 6: p. 1-14.
58. Shahwan, A., M. Farrell, and N. Delanty, Progressive myoclonic epilepsies: a review of genetic and therapeutic aspects. *Lancet Neurol*, 2005. 4(4): p. 239-48.
59. Madhavan, D. and R.I. Kuzniecky, Lafora disease. *Rev Neurol Dis*, 2006. 3(3): p. 131-5.
60. Nitschke, F., et al., Lafora disease - from pathogenesis to treatment strategies. *Nat Rev Neurol*, 2018. 14(10): p. 606-617.
61. Obel, L.F., et al., Brain glycogen-new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level. *Front Neuroenergetics*, 2012. 4: p. 3.
62. Bondi, M.W., E.C. Edmonds, and D.P. Salmon, Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J Int Neuropsychol Soc*, 2017. 23(9-10): p. 818-831.
63. F. Liyuan, M.C., H. Zinchao, Z. Shuo, Y. Zhihua, H. Zhengwei, S. Huifang, F. Yu, D. Yali, Y. Jing, S. Changhe, X. Yuming, New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front. Neurol.*, 2020. 10: p. 1-12.
64. Tanzi, R.E., The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(10).
65. Kumar, A., et al., Alzheimer Disease (Nursing), in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
66. D. Pirici, C.M., Corpora Amylacea in Aging Brain and Age-Related Brain Disorders *Journal of Aging and Gerontology*, 2014. 2: p. 33-57.
67. Panja, S., et al., Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *J Biotechnol*, 2006. 127(1): p. 14-20.
68. Divya Prakash, G., et al., Bacterial transformation using micro-shock waves. *Anal Biochem*, 2011. 419(2): p. 292-301.
69. Chung, C.T., S.L. Niemela, and R.H. Miller, One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(7): p. 2172-5.
70. Yoshida, N. and M. Sato, Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009. 83(5): p. 791-8.
71. B. M. Chassy, A.M., J. Flickinger, Transformation of bacteria by electroporation *TIBTECH*, 1988. 6: p. 303-309.
72. Healthcare, G., *Ion Exchange Chromatography Principles and Methods*.
73. HealthCare, G., *Affinity Chromatography - Principles and Methods*. 2007.
74. Hage, D.S., *Handbook of Affinity Chromatography*. 2 ed. 2006: CRC Press.
75. Turkova, J., Affinity chromatography of proteases of hydroxyalkyl methacrylate gels with covalently attached inhibitors. *J Chromatogr*, 1978. 148(1): p. 293-7.

76. Walters, R.R., Affinity chromatography. *Anal Chem*, 1985. 57(11): p. 1099A-1101A, 1102A-1106A passim.
77. Reichel, S., *Affinity Chromatography Methods in Molecular Biology*. 2015, New York: Springer.
78. Wilchek, M., *Affinity Chromatography Makromol. Chemie*, 1984. 123: p. 175-183.
79. Rodriguez, E.L., et al., Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020. 1157: p. 122332.