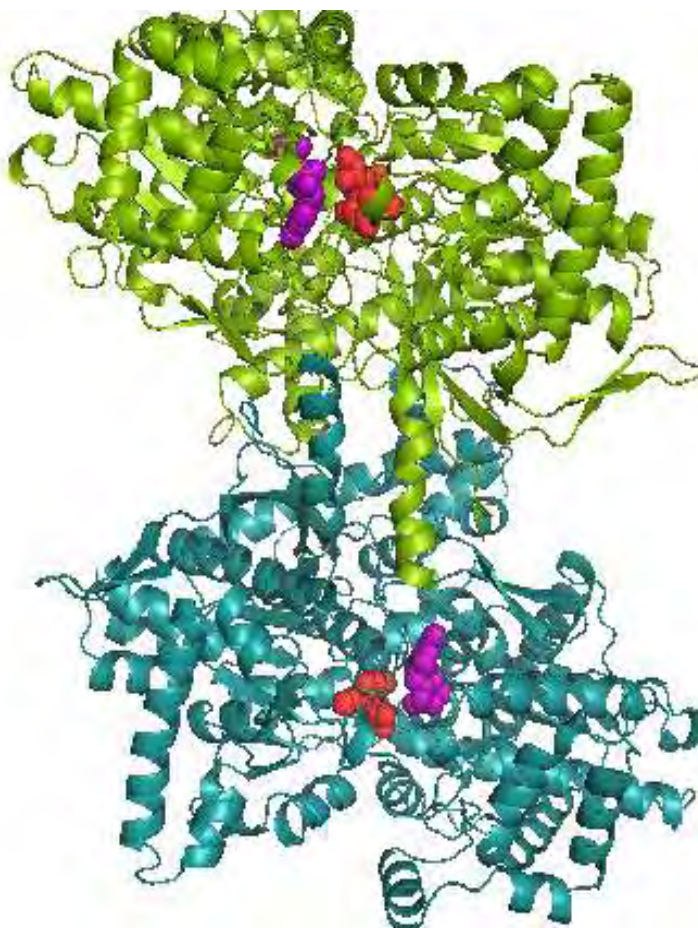




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ
ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ**



ΚΑΝΤΣΑΔΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Κοντού Μαρία**

Λέκτορας Κλινικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Κομιώτης Δημήτριος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών μορίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Απρίλιος 2010-Φεβρουάριος 2011, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος, Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του. Οι συμβουλές, η υπομονή, η ενθάρρυνση, η καθοδήγηση και η βοήθεια του καθ' όλη την διάρκεια υπήρξαν πολύτιμες.

Αδιαμφισβήτητα οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Δρ. Κοντού Μαρία για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και για την αμέριστη εμπιστοσύνη της στο πρόσωπο μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Δρ. Κομιώτη Δημήτρη για την συνεργασία και την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην μεταδιδακτορική συνεργάτιδα του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Σκαμνάκη Βασιλική, η οποία ανεξάρτητα από τις επαγγελματικές της υποχρεώσεις, μου προσέφερε την πολύτιμη βοήθεια της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς και όλους όσους συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	3
Εισαγωγή.....	6
1. Σακχαρώδης διαβήτης.....	6
1.2 Φυσιολογικός ρόλος ινσουλίνης.....	8
1.3 Υποϊνσουλινισμός.....	9
1.3.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I.....	10
1.3.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II.....	10
2. Βασικές γνώσεις.....	12
2.1 Γλυκόζη.....	12
2.2 Γλυκογόνο.....	13
2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	11
2.2.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης.....	15
2.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	17
2.3.1 Γενικά.....	17
2.3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	19
2.3.3 Κρυσταλλική δομή της GP.....	25
2.3.4 Κέντρα σύνδεσης της GP.....	27
3. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	30
4. Αρχές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών.....	31
4.1 Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης.....	32
4.2 Στάδια κρυστάλλωσης.....	33
4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών.....	36
4.4 Διαλύτης συγκρυστάλλωσης.....	38
4.5 Κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης.....	39
4.5.1 Γενικά.....	39
4.5.2 Βασικές αρχές.....	40
4.5.3 Ακτίνες X (Röntgen).....	43
4.5.4 Πηγές ακτίνων X και ανιχνευτές.....	44
4.5.5 Θεωρία περίθλασης ακτίνων X από κρύσταλλο.....	49
4.5.6 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου.....	57
4.5.7 Έλεγχος του δομικού μοντέλου.....	58
Υλικά και μέθοδοι.....	60
1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού.....	60
2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου b.....	63
2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb.....	63
2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m).....	64
2.3 Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέα.....	65
2.3.1 Παρασκευή διαλύματος GPb- γλυκογόνου.....	66
2.3.2 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος.....	67
2.3.3 Εκτέλεση του πειράματος.....	67
2.4 Προσδιορισμός φωσφόρου.....	69
2.5 Παρασκευή τυφλών.....	70
2.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit.....	71
3. Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb.....	71
4. Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου- αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη.....	74
5. Έκθεση πρωτεϊνικού μονοκρυστάλλου σε ακτίνες X.....	75
6. Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	77

7. Κρυσταλλογραφική μελέτη της ένωσης DK12.....	66
Σκοπός της εργασίας.....	81
Αποτελέσματα –Συζήτηση.....	83
1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου.....	83
2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων.....	84
2.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	84
2.2 Κινητική μελέτη ενώσεων DK12.....	85
3. Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης.....	93
Περίληψη.....	102
Abstract.....	103
Βιβλιογραφία.....	105

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Σακχαρώδης διαβήτης

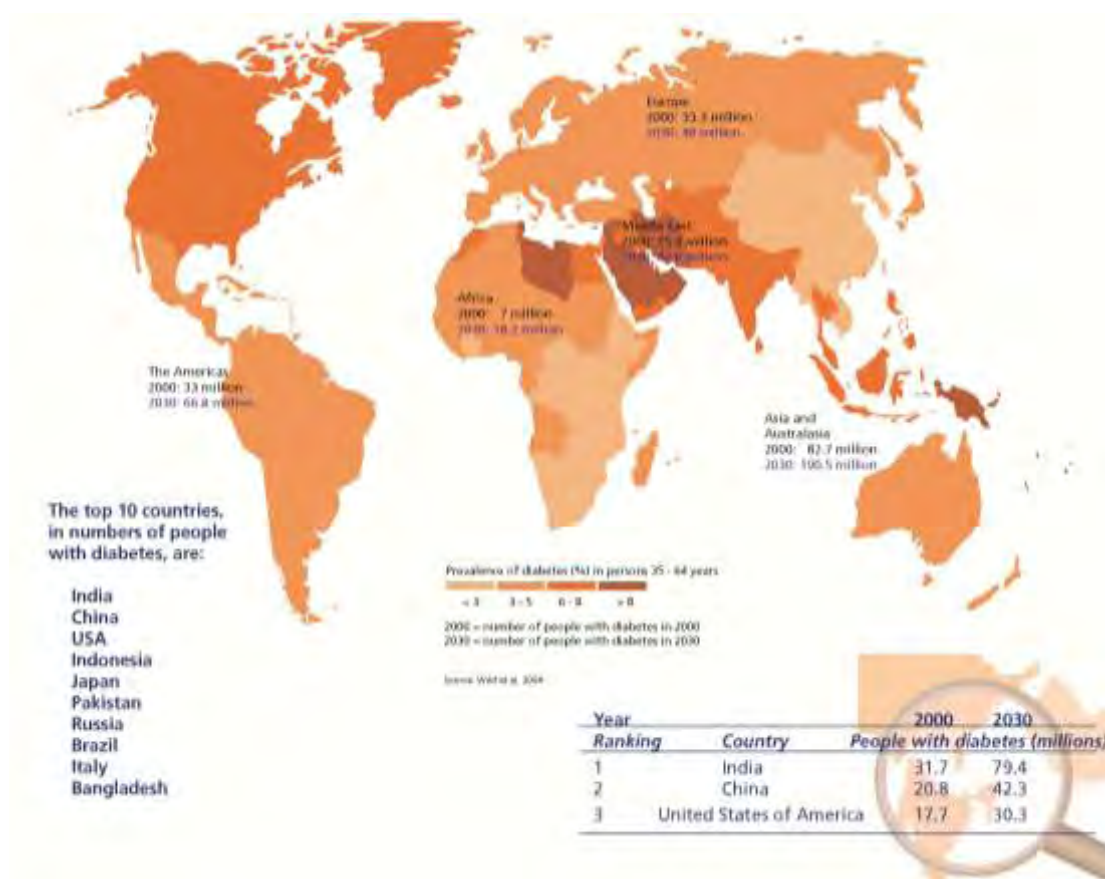
Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές, εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δεν διατηρούνται σταθερά. Τα επίπεδα γλυκόζης, στα υγιή άτομα, ρυθμίζονται από τη δράση της ινσουλίνης. Στο ΣΔ, το πάγκρεας παράγει ελάχιστη ή καθόλου ινσουλίνη (διαβήτης τύπου 1), είτε η ινσουλίνη που παράγεται δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό (διαβήτης τύπου 2) οδηγώντας έτσι σε υπεργλυκαιμία. Ο διαβήτης τύπου 1 ή νεανικός διαβήτης πλήττει κυρίως άτομα νεαρής ηλικίας και οφείλεται στην καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που εκκρίνουν ινσουλίνη. Ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται και ως διαβήτης των ενηλίκων και κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως πάντως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 χρονών και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών.

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το διαβήτη (IDF) 194 εκ. άνθρωποι υποφέρουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως και αυτός ο αριθμός προβλέπεται να αυξηθεί σε 333 εκ. το 2025, κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού, τις αλλαγές στον τρόπο ζωής και της καθιστικής ζωής. Στην Ευρώπη σύμφωνα με τα στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, το 2000 υπήρχαν 33.3 εκ άτομα με διαβήτη ενώ προβλέπεται ότι το 2030 ο αριθμός αυτός θα φτάσει τα 48 εκ.

Στην Ελλάδα το ποσοστό του πληθυσμού που φαίνεται να πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη είναι περίπου 10%. Το 80% των ασθενών με διαβήτη τύπου 2 είναι παχύσαρκοι και σύμφωνα με την επιδημιολογική μελέτη της Ελληνικής Εταιρίας Παχυσαρκίας, το 41% των ανδρών και το 30% των γυναικών είναι υπέρβαροι γεγονός που κατατάσσει τη χώρα μας στις πρώτες θέσεις στην ΕΕ κατανάλωσης φαρμάκων έναντι του σακχαρώδη διαβήτη. [Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας <http://www.ifet.gr/diabetes2005IFET.pdf>].

Ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί σε άτομα με γενετική προδιάθεση ωστόσο δεν θεωρείται ούτε κληρονομικός, ούτε μεταδοτικός αν και στις περισσότερες περιπτώσεις το γενετικό υπόβαθρο μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο. Άλλοι παράγοντες προδιάθεσης είναι το γήρας, η παχυσαρκία, η έλλειψη άσκησης καθώς και οι σύγχρονες διατροφικές συνήθειες και ο αγχώδης τρόπος ζωής.

Οι πρώτες δέκα χώρες σε αριθμό ασθενών με διαβήτη είναι οι εξής: Ινδία, Κίνα, ΗΠΑ, Ινδονησία, Ιαπωνία, Πακιστάν, Ρωσία, Βραζιλία, Ιταλία και Μπαγκλαντές. Στις χώρες αυτές ένας στους τέσσερις θανάτους σε άτομα ηλικίας 35 με 64 χρόνων, οφείλεται στο σακχαρώδη διαβήτη (World Health Organization-WHO, http://www.who.int/diabetes/BOOKLET_HTML/en/print.html) (Εικόνα 1).



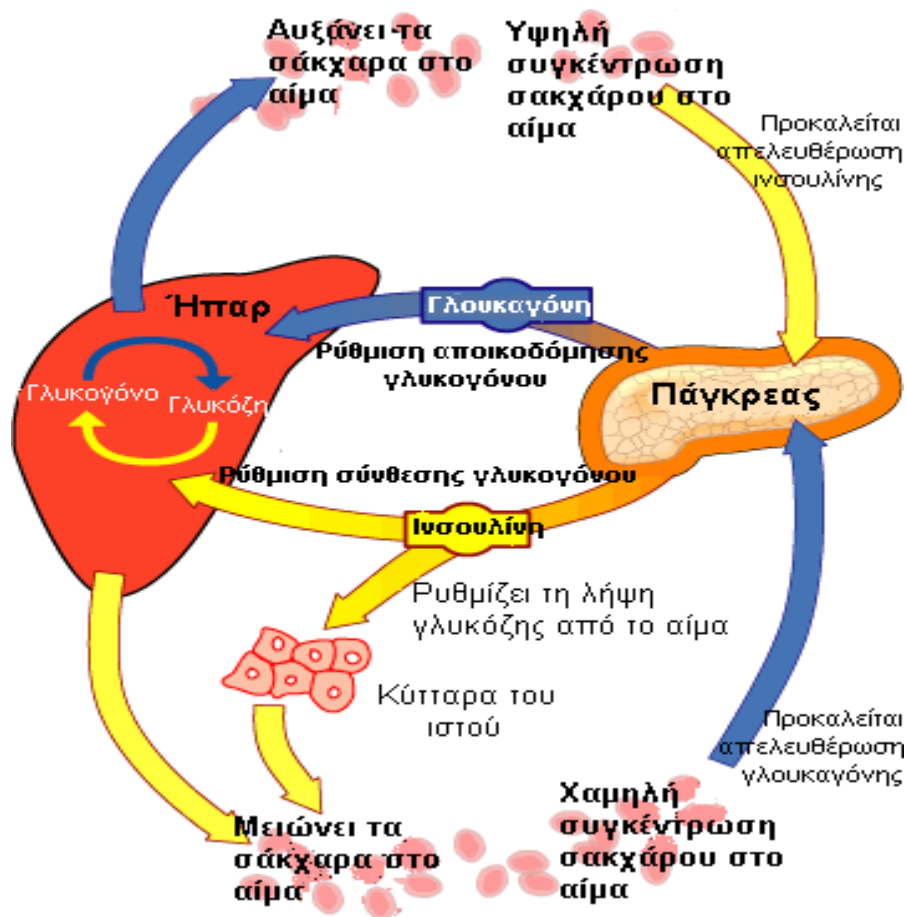
Εικόνα 1: Η επιδημία του διαβήτη παγκοσμίως. [WHO, .Diabetes Action Now booklet]

1.2 Φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο, το οποίο παράγεται από τα β-κύτταρα της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος και διαδραματίζει έναν πολύπλευρο ρόλο στον μεταβολισμό.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα γίνεται με την δράση της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη, δύο πρωτεϊνικής φύσεως ορμόνες με αντίθετη δράση, εκκρίνονται για να διατηρήσουν τη συγκέντρωση της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα. Η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα οδηγεί σε έκκριση ινσουλίνης. Η ινσουλίνη λαμβάνεται από το ήπαρ και το πάγκρεας και προκαλεί την έναρξη σύνθεσης πολυμερών γλυκόζης στο ήπαρ. Τα μόρια γλυκόζης αποθηκεύονται με τη μορφή του πολυμερούς, που ονομάζεται γλυκογόνο. Μια δεύτερη δράση της ινσουλίνης, είναι η ρύθμιση της πρόσληψης γλυκόζης από τα κύτταρα του ιστού. Αντίθετα, η γλυκαγόνη απελευθερώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι χαμηλά, με σκοπό την κινητοποίηση των μηχανισμών που θα ελευθερώσουν γλυκόζη στο αίμα.

Η ινσουλίνη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού γλυκογονογένεσης και μείωση των ρυθμών της γλυκονεογένεσης και γλυκογονόλυσης. Επίσης επιδρά άμεσα στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, καθώς αυξάνει τη δίοδο των περισσότερων αμινοξέων από την κυτταρική μεμβράνη και τη σύνθεση RNA, ενώ η έμμεση επίδραση της έγκειται στο γεγονός ότι αυξάνει τη χρησιμοποίηση γλυκόζης από τα κύτταρα για την παραγωγή ενέργειας, κι έτσι εξοικονομούνται πρωτεΐνες. Ακόμα η ινσουλίνη επηρεάζει και τον μεταβολισμό των λιπιδίων, καθώς αυξάνει την αποθήκευση λίπους και παρεμποδίζει την κινητοποίηση και την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Γενικά τα όργανα ή οι ιστοί που θεωρούνται «στόχοι» της ινσουλίνης είναι το ήπαρ, οι μύες, ο λιπώδης ιστός, ο μαστός, το ενδοθήλιο των αγγείων, τα περιφερικά νεύρα κ.α (Σμοκοβίτης 2004) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Όταν η συγκέντρωση γλυκόζης είναι αυξημένη στο αίμα, απελευθερώνεται από το πάγκρεας ινσουλίνη που κατευθύνεται στο ήπαρ. Η ινσουλίνη προκαλεί σύνθεση γλυκογόνου στο ήπαρ με επακόλουθο, τη μείωση της συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα (πορεία με κίτρινα βέλη). Η χαμηλή συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλουκαγόνης που λαμβάνεται από το πάγκρεας και το ήπαρ. Στο ήπαρ η γλουκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης (πορεία με μπλε βέλη). Η γλυκόζη μεταφέρεται στο αίμα και αυξάνει την συγκέντρωση του σακχάρου.

1.3 Υποϊνσουλινισμός

Η μείωση της διαθέσιμης ινσουλίνης στον οργανισμό μπορεί να οφείλεται σε καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, σε μειωμένη ανταπόκριση των β-κυττάρων, σε αντισώματα κατά της ινσουλίνης, σε αυξημένη αποδόμηση της στο ήπαρ αλλά και σε δομικές ανωμαλίες στο μόριο της ινσουλίνης.

Επίσης μπορεί να είναι μειωμένη η ανταπόκριση στην ινσουλίνη των κυττάρων «στόχου», που μπορεί να οφείλεται σε μείωση του διαθέσιμου αριθμού υποδοχέων ινσουλίνης, σε μειωμένη χημική συγγένεια μεταξύ ινσουλίνης και υποδοχέων ή σε κάποια ενδοκυτταρική ανωμαλία. (Φυσιολογία Σμοκοβίτη 2004)

Η κλινική εικόνα από την ανεπάρκεια ινσουλίνης είναι γνωστή ως **σακχαρώδης διαβήτης**.

1.3.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I ή ινσουλινοεξαρτώμενος

Προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη και συνήθως εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 20 ετών γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ως «νεανικός διαβήτης». Ο όρος ινσουλινοεξαρτώμενος σημαίνει ότι το πάσχον άτομο χρειάζεται ινσουλίνη για να ζήσει.

Στον διαβήτη τύπου I απουσιάζει η ινσουλίνη με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της γλυκαγόνης να βρίσκεται σε υψηλότερο επίπεδο από το φυσιολογικό. Επειδή υπάρχει ανεπάρκεια ινσουλίνης, παρεμποδίζεται η είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα. Το ήπαρ παραμένει σε κατάσταση γλυκονεογένεσης και κετογένεσης ενώ αναστέλλεται η γλυκόλυση.

Ο υψηλός λόγος γλυκαγόνης/ινσουλίνης στον διαβήτη προάγει επίσης τη διάσπαση του γλυκογόνου. Έτσι παράγεται περίσσεια γλυκόζης από το ήπαρ η οποία απελευθερώνεται στο αίμα. Η γλυκόζη απεκκρίνεται με τα ούρα (γλυκοζουρία) όταν η συγκέντρωσή της είναι μεγαλύτερη από εκείνη που μπορεί να επαναρροφηθεί από τα νεφρικά σωληνάκια. Η απεκκρινόμενη γλυκόζη συνοδεύεται από νερό, οπότε ο διαβητικός που δεν λαμβάνει κάποια αγωγή πεινά και διψά. (πολυφαγία, πολυδιψία).

1.3.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, γνωστότερος και ως «γεροντικός διαβήτης», πλήττει κυρίως ενήλικες. Είναι ο πιο κοινός τύπος διαβήτη αντιστοιχώντας σε περισσότερο από το 90% των πασχόντων. Ο χαρακτηρισμός του ως διαβήτης των ενηλίκων, οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνισή της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια εμφανίζεται έξαρση της πάθησης σε άτομα νεαρής ηλικίας. Λαμβάνοντας υπόψη τον ρυθμό με τον οποίο αυξάνονται οι περιπτώσεις εμφάνισης της συγκεκριμένης μεταβολικής διαταραχής υπολογίζεται ότι σε μερικές δεκαετίες, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, θα είναι ένα

από τα συνηθέστερα και μεγαλύτερα προβλήματα της παγκόσμιας υγείας. (Diamond, 2003). Ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί σε άτομα με γενετική προδιάθεση ωστόσο δεν θεωρείται ούτε κληρονομικός, ούτε μεταδοτικός. Άλλοι παράγοντες προδιάθεσης είναι το γήρας, η παχυσαρκία, η έλλειψη άσκησης καθώς και οι σύγχρονες διατροφικές συνήθειες και ο αγχώδης τρόπος ζωής. Η παχυσαρκία αποτελεί σαφή παράγοντα προδιάθεσης, αφού σε ποσοστό 80% περίπου, τα άτομα με διαβήτη τύπου II είναι παχύσαρκα.

Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου I, στον οποίο η ινσουλίνη απουσιάζει παντελώς, ο διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινσουλίνης. Σε αυτή τη μορφή διαβήτη έχουν παρατηρηθεί ακόμα και υψηλά επίπεδα ινσουλίνης. Στο διαβήτη τύπου II, η ινσουλίνη η οποία παράγεται από το πάγκρεας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται το σάκχαρο σαν κύρια πηγή ενέργειας. Συνεπώς, η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται –σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου I - από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου II ονομάζεται και **"μη ινσουλινοεξαρτώμενος"** (NIDDM: Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα των ιστών να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη και τα επαγόμενα αποτελέσματα της δράσης της. Σε μερικούς ασθενείς παρουσιάζεται μειωμένος αριθμός ή συγγένεια των υποδοχέων ινσουλίνης (υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης), ενώ σε άλλους, παρόλο που η σύνδεση της ινσουλίνης είναι κανονική, παρατηρείται ανώμαλη μεταγωγή σήματος εντός του κυττάρου.

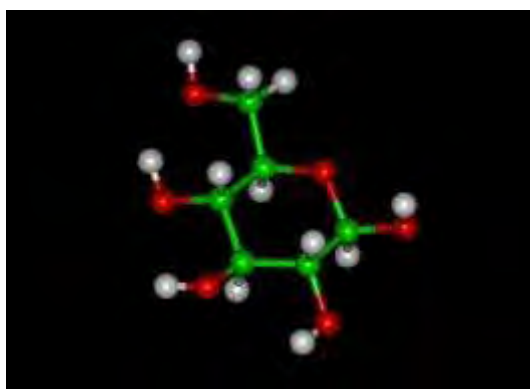
Ο Διαβήτης Τύπου 2 συνήθως εξελίσσεται αργά, με τα συμπτώματα και τις επιπλοκές να αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου. Συχνά δεν υπάρχουν συμπτώματα όταν γίνεται η διάγνωση του Διαβήτη Τύπου 2. Η δυσκολία πρόγνωσης της ασθένειας σε συνδυασμό με την απουσία θεραπείας έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων θεραπευτικών αγωγών για τον έλεγχο και τη σταθεροποίηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Η αγωγή για τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II περιλαμβάνει κυρίως κατάλληλη διατροφή, άσκηση και χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου II περιλαμβάνουν ινσουλίνη, σουλφονουλουρίες, διγουανιδίνες (μετμορφίνη), αναστολείς της α-γλυκοζιτάσης, θειαζολιδινεδιόνες, τα οποία έχουν διαφορετικό τρόπο και στόχο δράσης. (Oikonomakos 2001).

Ωστόσο οι θεραπείες αυτές έχουν αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών αποδεικνύονται και ανεπαρκείς. Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην διερεύνηση άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως για παράδειγμα ανταγωνιστές των υποδοχέων γλυκογόνου, αναστολείς της ηπατικής παραγωγής ινσουλίνης καθώς και συνδυαστικές θεραπείες (Morral 2003). Υπάρχει λοιπόν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών μέσων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου [Oikonomakos *et al.*, 2001].

2 Βασικές γνώσεις

2.2 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο (Εικόνα 3). Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη. [Stryer,1997].



Εικόνα 3: Τρισδιάστατη απεικόνιση ενός μορίου γλυκόζης

Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων [McArdle *et al.*, 2000]. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό

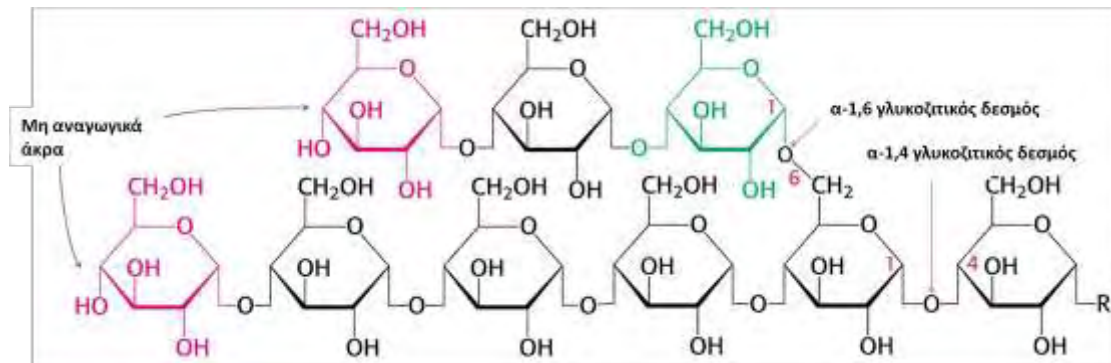
του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι, το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Έτσι ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό, ενώ τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν ως καύσιμο μόνο τη γλυκόζη. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης [McArdle *et al.*, 2000]. Η συγκέντρωση της στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη [Stryer, 1997].

Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης (McArdle *et al.*, 2000).

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη (Martin *et al.*, 1998). Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και την διαιτητική κατάσταση του οργανισμού (McArdle *et al.*, 2000).

2.3 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές το οποίο αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης και αποτελεί την κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης (Stryer, 1997).



Εικόνα 4: Η δομή του γλυκογόνου

Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμοι μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό τι στους μύς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο. (Stryer 1997).

2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

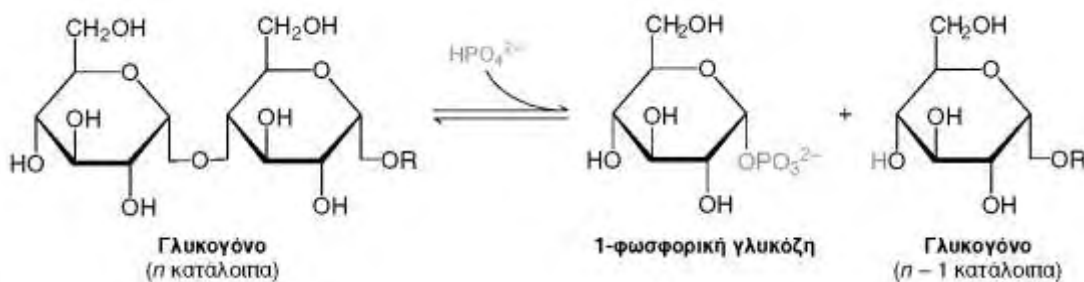
Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936. Το ζεύγος Cori απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης [Cori & Cori, 1936].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1- φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση. (Εικόνα 5)

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η

γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται [Stryer, 1997].

Γλυκογόνο (n κατάλοιπα) + Pi → 1-φωσφορική-γλυκόζη + γλυκογόνο (n - 1 κατάλοιπα)



Εικόνα 5: Αποικοδόμηση γλυκογόνου (Stryer 1997)

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

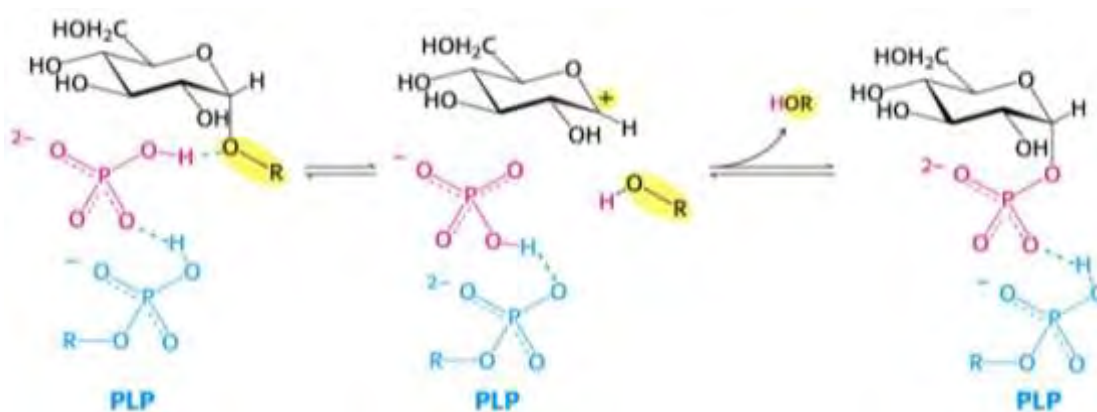
Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη [Stryer, 1997].

2.2.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο. (Stryer 1997)

Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη [Stryer, 1997]. (Εικόνα 6).

Ενδιάμεσο καρβοκατιόντος



Εικόνα 6: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η ένδειξη PLP αφορά τη φωσφορική πυριδοξάλη συνδεδεμένη με μία βάση του Schiff στην ϵ -NH₂ της λυσίνης 680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α -D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο [Stryer, 1997].

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου (Εικόνα 7). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή

ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης (Stryer, 1997).



Εικόνα 7: Δεσμός βάσης Schiff της PLP.

Η PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης

2.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

2.3.1 Γενικά

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην

αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης (Stryer 1997).

Δομικά η GP είναι μια ομοδιμερή πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ότι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B₆. Με βάση διάφορα πειράματα που έγιναν στο παρελθόν αποδείχτηκε το γεγονός ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστικότητα του ενζύμου (Οϊκονομακος *et al.*, 1992). Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μία κοιλότητα που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινο-τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H₂O. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε-αμινομάδα της λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση (McLaughlin 1984).

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπομενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση. (Stryer 1997)

Φυσιολογικά η δραστηριότητά της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G₁(PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP). (Rath et al.2000)

2.3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

Ο συντονισμός των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες γίνεται με την βοήθεια ρυθμιστικών ενζύμων, η λειτουργική δομή των οποίων τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την καταλυτική τους δράση ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Σύμφωνα με τους Monod, Changeux και Wyman, ως αλλοστερικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τουλάχιστον δυο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο ευθύνεται για την βιολογική δράση της πρωτεΐνης, συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ στο αλλοστερικό συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση ένας άλλος μεταβολίτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αλλοστερικός τροποποιητής προκαλεί μια διακριτή, αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται **αλλοστερική μετάπτωση**. Αυτή τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή [Monod *et al.*, 1963].

Γενικά, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από τη συγκεκριμένη δομή του ίδιου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωσή του που επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή [Monod *et al.*, 1963].

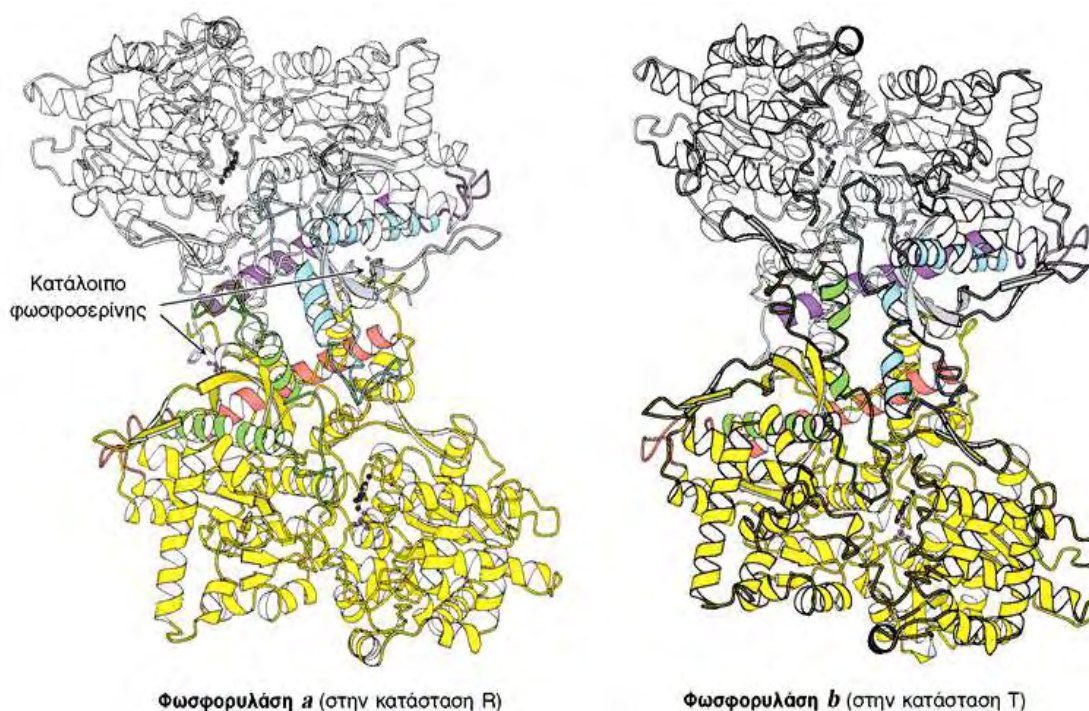
Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται σε ομοτροπικές, μεταξύ ταυτόσημων ενώσεων και ετεροτροπικές, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Δηλαδή, το μόριο να έχει έναν τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δυο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την T μορφή και τη R μορφή, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά L. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από τη μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγένειά τους με συγκεκριμένους υποκαταστάτες μεταβάλλεται. Η σύνδεση του υποστρώματος σε οποιοδήποτε μονομερές δεν επηρεάζει κατά κανένα τρόπο την σύνδεσή του στα υπόλοιπα μονομερή (δηλαδή οι μικροσκοπικές σταθερές διάστασης στα σύμπλοκα μεταξύ μονομερών T ή R διαμόρφωσης και υποστρώματος είναι αντίστοιχα ίδιες [Monod *et al.*, 1965]).

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα [Monod *et al.*, 1965].

Συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η αύξηση ή αντίστοιχα η μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, σε περισσότερο ή λιγότερο σιγμοειδή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται ανάλογα με το αν η αλλοστερική μετάπτωση προκαλείται από αναστολέα ή ενεργοποιητή του ενζύμου. Σημειώνεται ότι η σιγμοειδής συμπεριφορά αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλοστερικών πρωτεϊνών [Monod *et al.*, 1965, Oikonomakos *et al.*, 1977].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T (Εικόνα 8). Η μετάβαση από την κατάσταση T

(αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση a) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α -έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη. (Stryer 1997).

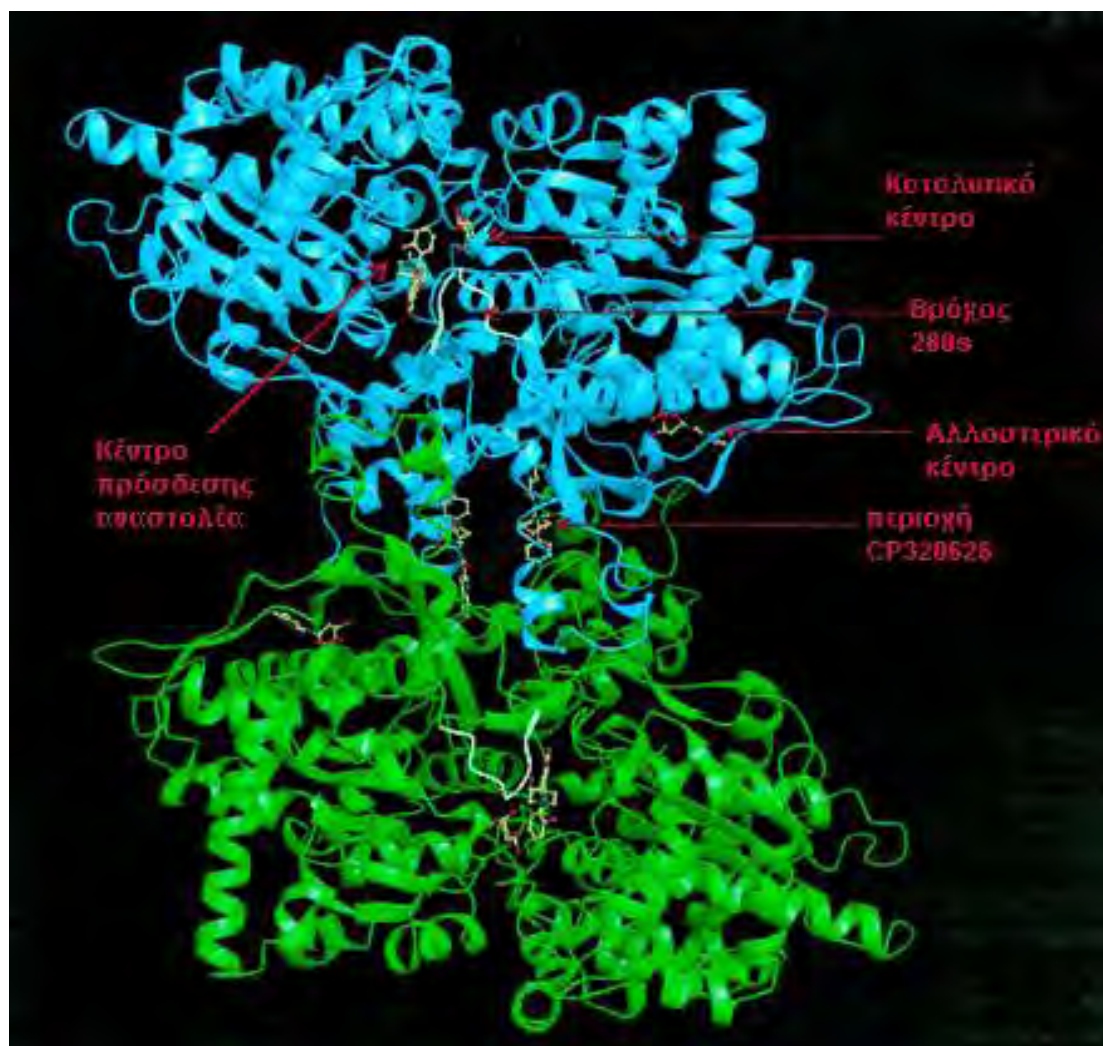


Εικόνα 8: Οι δομές της φωσφορυλάσης a και b. Η φωσφορυλάση a είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή R διαμόρφωση. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρυθμισμό φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση b δεν είναι φωσφορυλιωμένη και απαντάται κυρίως στην T διαμόρφωση.

Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. (Stryer 1997). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα η φωσφορυλάση a

είναι είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μυς εξασφαλίζει την παραμονή της 6- φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια.

Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο (Εικόνα 9). Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την T διαμόρφωση. Τέλος στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την T κατάσταση, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την R κατάσταση και το ATP που απλά ανταγωνίζεται το AMP (Oikonomakos 2001).

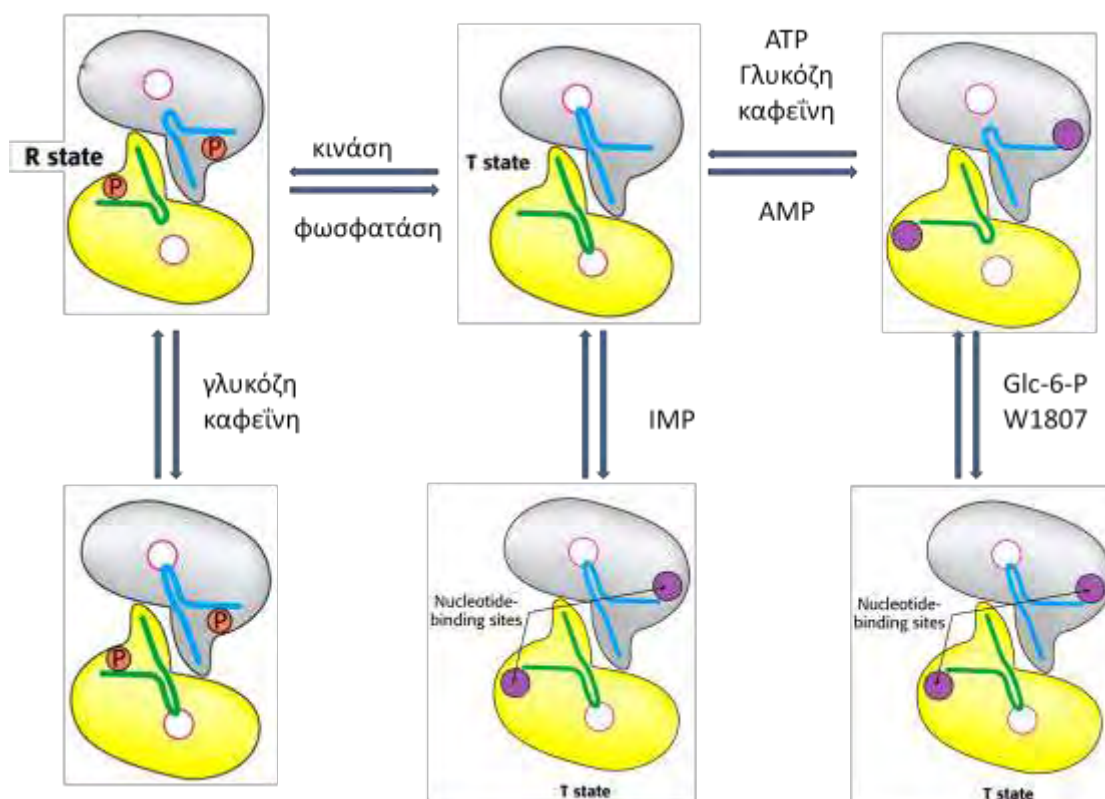


Εικόνα 9: Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Οι αναστολείς είναι προσδεμένοι στα κέντρα του ενζύμου, ενώ υποδεικνύεται και η θέση του βρόχου 280s.

Η ανενεργός μορφή της φωσφορυλάσης b μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν *in vitro* να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} [Oikonomakos *et al.*, 1992].

Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια

για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P (Johnson *et al.*, 1989) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης (Stryer 1997)

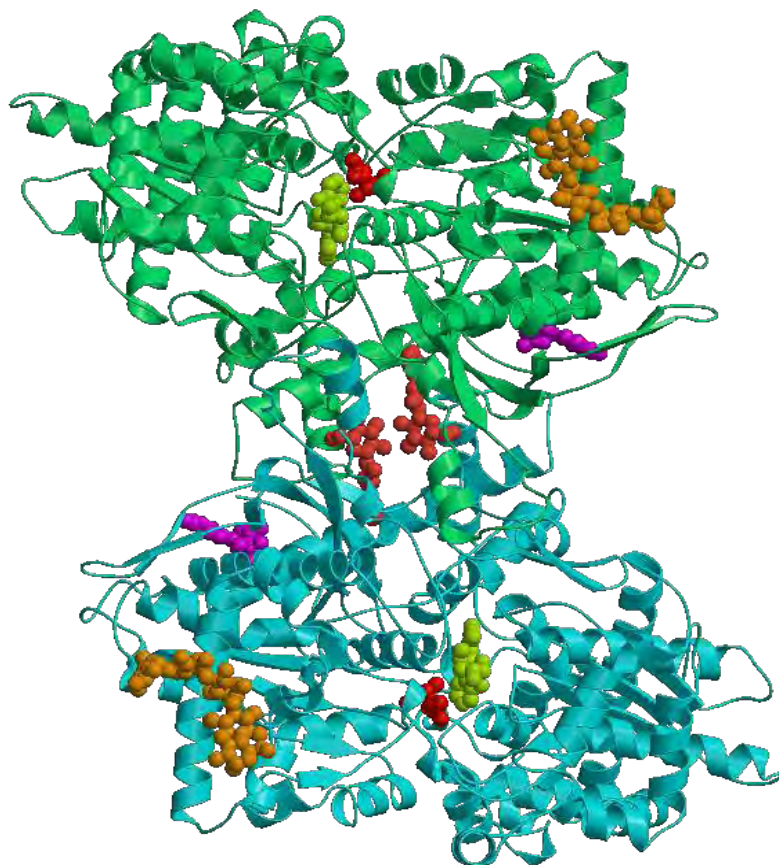
Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοίωση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α, αλλά όχι η β παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. (Stryer 1997).

2.3.3 Κρυσταλλική δομή της GP

Οι κρυσταλλικές δομές της GP_a και της GP_b (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 (Barford & Johnson, 1989). Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά ύδατος (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Κι αυτό συμβαίνει γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους [Barford & Johnson, 1989]. Βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν επίσης την ύπαρξη έξι κέντρων σύνδεσης:

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- Αλλοστερικό κέντρο (N)
- Καταλυτικό κέντρο (C)
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων)

Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60x60x55 Å (Εικόνα 11). Η GP είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 3_{10} μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια π έλικα μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (cap) και πύργος (tower) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόχος 280 (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18) (Oikonomakos *et al.*, 1992).



Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της GP. Οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που αντιστοιχούν στην $\alpha 1$ έλικα, στην περιοχή επικαλύμματος, στην αρχή της $\alpha 2$ έλικας και στην έλικα της περιοχής πύργος, ο βρόχος 280s και η αρχή της $\alpha 8$ έλικας μαζί με τον βρόχο που συνδέει τις διαμορφώσεις $\beta 7$ και $\beta 8$ είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Το απαραίτητο συνένζυμο PLP είναι εγκλωβισμένο στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένο με τη Lys680 της $\alpha 21$ έλικας. Το καταλυτικό κέντρο, που φαίνεται στο σχήμα μαζί με την G1P, βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο περιβάλλον διαλύτης έχει πρόσβαση σ' αυτό μέσω ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å. Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με το AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, μεταξύ της $\alpha 2$ και της $\alpha 8$ έλικας. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, συνδέεται με την $\alpha 12$ έλικα και είναι στην επιφάνεια του ενζύμου μακριά από το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο του νουκλεοζιτικού αναστολέα βρίσκεται στην είσοδο του καναλιού του καταλυτικού κέντρου. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτίδια που συνδέονται σε αυτό το κέντρο δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της $\alpha 19$ έλικας. Η κατάληψη αυτού του κέντρου σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου.

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να χωριστεί σε δυο αυτοτελείς περιοχές, την 1 και την 2. Η περιοχή 1, που ονομάζεται και ρυθμιστική, αποτελείται από τα αμινοξέα 10-484. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο φωσφορύλιωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα καθώς και ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή 2,

που ονομάζεται και καταλυτική, αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων (Fletterick & Madsen, 1980).

2.3.4 Κέντρα σύνδεσης της GP

1. Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14

Το κέντρο φωσφορυλίωσης υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή a στη μορφή b είναι η σερίνη 14, η οποία έχει στρατηγική θέση στην διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η φωσφορυλίωση της σερίνης αυτής, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο. Στην GPb, τα αμινοξέα αυτά είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στην GPa έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των δύο υπομονάδων. (Stryer, 1997)

2. Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å περίπου από τη Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις δυο διαμορφώσεις, T και R, της GPa και της GPb. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από τρία υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

- Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
- Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων (ριβόζης)
- Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρίνης)

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, GIP, Pi, SO_4^{2-}), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP

όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων (Oikonomakos *et al.*, 1992).

3. Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (G1P, Pi) και αναλόγων τους (UDP-Glc). Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε απόσταση 15 Å από τη επιφάνεια περίπου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται κυρίως από τον βρόχο αμινοξικής ακολουθίας 282-285. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση T → R, ο βρόχος 282-285 εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από την βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 συμβάλλει στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας (Oikonomakos 2001).

4. Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε ένα αβαθές αυλάκι που σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας (Johnson *et al.*, 1989). Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης (Oikonomakos 2001).

5. Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής (ή νουκλεοζιτικό κέντρο) είναι ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Το κέντρο αναστολής περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (αμινοξέα 13-484) καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (αμινοξέα 485-842). Στην T διαμόρφωση του ενζύμου, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχτεί πως οι πουρίνες (όπως η αδενίνη και η καφεΐνη), τα νουκλεοσίδια (όπως η αδενοσίνη και η ινoσίνη), τα νουκλεοτίδια (όπως το AMP, το

IMP και το ATP), το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σώματα (όπως η ριβοφλαβίνη) δένονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GPα και GPβ, όχι όμως και στην ηπατική GPα, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα (Oikonomakos *et al.*, 2002).

Στην T διαμόρφωση της GP, η Phe285 του βρόχου 280s εντοπίζεται κοντά στην Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας (αμινοξέα 613-631) και μαζί, αυτά τα δυο υδροφοβικά μόρια, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η κατάληψη αυτού του κέντρου από ένα μόριο έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου καθώς επίσης και τη φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP (Oikonomakos *et al.*, 2002). Η σύνδεση των αναστολέων με την πρωτεΐνη δεν πραγματοποιείται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων (Sprang *et al.*, 1982).

6. Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPβ. Σε αυτό συνδέεται η ένωση P320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδια καθώς επίσης και η βενζούλο-N-β-D-γλυκοπυρανοζουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GPβ. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GPα (Oikonomakos *et al.*, 2002).

3 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την θεραπεία του διαβήτη τύπου II (Oikonomakos 2001). Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos, 2002].

Ωστόσο η ύπαρξη των τριών ισομορφών (ηπατικής, μυϊκής, του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Συγκεκριμένα για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο άλλες ισομορφές. (Somsak et al., 2008). Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ. (Oikonomakos et al., 2008)

Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιορισθεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη

συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων [Blundell et al., 2002].

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με $K_i \approx 1 \mu\text{M}$, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης [Witters & Avruch, 1978] στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο υπολογισμός υποθέτει πως το σύνολο του φαρμάκου φτάνει στο στόχο του. Αν όμως ληφθεί υπ' όψη η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου τότε απαιτείται αναστολέας με $K_i \approx 0.1 \mu\text{M}$.

4. Αρχές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών

Μετά τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της μυοσφαιρίνης από τον John Kendrew, της αιμοσφαιρίνης από τον Max Perutz τη δεκαετία του 1950 (σε ευκρίνεια 6.0 Å) και της λυσοζύμης από τον David Philips το 1965 (σε υψηλή ευκρίνεια), ο αριθμός των πρωτεϊνών που προσδιορίζονται με περίθλαση ακτίνων X αυξήθηκε κατά μεγάλο βαθμό με αποτέλεσμα μέχρι σήμερα να έχουν προσδιοριστεί περίπου 8,000 δομές πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων.

Σήμερα η περίθλαση ακτίνων X αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών αλλά και άλλων μακρομοριακών συστημάτων. Σε αντίθεση με τη μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR) που διεξάγεται σε διαλύματα και η οποία μπορεί να εφαρμοστεί μόνο όταν το μέγεθος του μορίου δεν είναι μεγαλύτερο από 30 kDa, η μέθοδος της περίθλασης ακτίνων X μπορεί να εφαρμοστεί σε κρυσταλλικά συστήματα με μοριακό βάρος μέχρι και 10^6 Da. Ωστόσο το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δυσκολία στην κρυστάλλωση των μακρομορίων.

4.1 Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης

Για να πραγματοποιηθεί μια αντίδραση δεν αρκεί μόνο να ευνοείται θερμοδυναμικά αλλά απαραίτητη προϋπόθεση είναι και να μπορεί να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα. Η ενέργεια που απαιτείται για να δημιουργηθεί αυτή η ενεργειακά αναβαθμισμένη μεταβατική κατάσταση, μέσω της οποίας οδηγούμαστε στα προϊόντα, καλείται ενέργεια ενεργοποίησης και είναι αυτή που καθορίζει την κινητική της χημικής αντίδρασης [Φιλιππόπουλος & Γρηγοροπούλου, 1998].

Για να επιτευχθεί κρυστάλλωση απαραίτητη προϋπόθεση είναι να δημιουργηθεί κατάσταση υπερκορεσμού. Η κατάσταση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ στερεάς και υγρής φάσης οπότε και οδηγούμαστε στη δημιουργία κρυσταλλικού ή άμορφου ιζήματος. Το χημικό δυναμικό κάθε συστατικού είναι ίδιο και για τις δυο φάσεις και δίνεται από την σχέση:

$$\mu_{ic} = \mu_{is} = \mu_{io} + RT \ln \gamma c_i$$

όπου, μ_{ic} , μ_{is} και μ_{io} είναι τα χημικά δυναμικά στον κρύσταλλο, στο διάλυμα και το πρότυπο δυναμικό αντίστοιχα, ενώ γ είναι η ενεργότητα και c η συγκέντρωση [Ρακιντζή, 1994].

Η κατάσταση υπερκορεσμού επιτυγχάνεται όταν το χημικό δυναμικό του συστατικού i στο διάλυμα γίνει μεγαλύτερο απ' ότι στον κρύσταλλο, και εκφράζεται με την παράμετρο β η οποία ονομάζεται βαθμός υπερκορεσμού και ορίζεται ως εξής:

$$\beta = c / c_s,$$

όπου c η συγκέντρωση και c_s η διαλυτότητα στο συγκεκριμένο διάλυμα. Στα πρωτεϊνικά διαλύματα, που προορίζονται για κρυστάλλωση, ο βαθμός υπερκορεσμού κυμαίνεται συνήθως από 2 έως 10, ενώ για την κρυστάλλωση μικρομορίων είναι τις περισσότερες φορές αρκετά μικρότερος [Mikol & Giege, 1992].

Η κατάσταση υπερκορεσμού μπορεί να διακριθεί σε δυο στάδια:

- **Μετασταθής κατάσταση:** όπου αναπτύσσονται οι ήδη υπάρχοντες κρύσταλλοι αλλά δεν δημιουργούνται νέοι πυρήνες κρυστάλλωσης.

- **Ασταθής κατάσταση:** όπου επιτυγχάνεται η αυθόρμητη δημιουργία πυρήνων και η ανάπτυξή τους.

Κατά την κρυστάλλωση υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να σχηματιστεί ένα άμορφο ίζημα, αντί μιας σαφώς διατεταγμένης κρυσταλλικής δομής. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κυρίως όταν η κατάσταση υπερκορεσμού προσεγγίζεται με μεγάλη ταχύτητα με αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά μόρια να μην έχουν τον απαιτούμενο χρόνο να αλληλεπιδράσουν με τα γειτονικά τους και να διευθετηθούν κατάλληλα [McPherson, 1999].

4.2 Στάδια κρυστάλλωσης

Το πιο σημαντικό ίσως σημείο στην κρυσταλλογραφία ακτίνων X είναι η ανάπτυξη κρυστάλλων άριστης ποιότητας. Για να είναι ένας κρύσταλλος «καλός» πρέπει να είναι απαλλαγμένος από προσμίξεις, να είναι απόλυτα συμμετρικός και να έχει τρισδιάστατη επαναλαμβανόμενη δομή. Τα σχήματα των κρυστάλλων μπορεί να ποικίλουν, από τέλειους κύβους μέχρι και μακριές λεπτές βελόνες. Ο χρόνος που απαιτείται για να προκύψει ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος μπορεί να είναι αρκετά μεγάλος (από μερικές εβδομάδες μέχρι και κάποιους μήνες) γι' αυτό απαιτείται συχνά αρκετή προσπάθεια και υπομονή από τον ερευνητή καθώς και συνεχής έλεγχος, εφόσον οι αλλαγές σε κάποιες παραμέτρους μπορούν να επιφέρουν οπτικά παρατηρήσιμες μεταβολές στους κρυστάλλους [Acharya & Rees, 1997].

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε τρία στάδια:

1. **Πυρήνωση.** Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να σχηματίσουν συσσωματώματα γύρω από συγκεκριμένα κέντρα σύνδεσης. Το μέγεθος του συσσωματώματος προσδιορίζει τη συνολική ελεύθερη ενέργεια, η οποία παρουσιάζει μέγιστο όταν σχηματιστεί ο πυρήνας, δηλαδή αποκτήσει κρίσιμο μέγεθος. Προκειμένου λοιπόν να επιτευχθεί η ανάπτυξη μιας νέας φάσης στο υπερκορεσμένο διάλυμα, πρέπει το σύστημα να υπερπηδήσει το ενεργειακό φράγμα το οποίο καλείται ελεύθερη ενέργεια πυρήνωσης και ορίζεται ως εξής:

$$\Delta G_g = \{-[KT(4r^3\pi)] / (V \ln\beta)\} + 4r^2\pi\gamma$$

Όπου K : η σταθερά Boltzman,

T : η απόλυτη θερμοκρασία,

r : η ακτίνα του πυρήνα του κρυστάλλου,

V : ο όγκος ενός μορίου στον κρύσταλλο,

β : ο βαθμός υπερκορεσμού και

γ : η διφασική ενέργεια διαλύματος- κρυστάλλου [Kam *et al.*, 1978].

Για να μπορέσει να ξεπεραστεί το ενεργειακό φράγμα και να αναπτυχθεί ο κρύσταλλος, πρέπει ο βαθμός υπερκορεσμού να είναι αρκετά υψηλός έτσι ώστε το εύρος των ενεργειακών διακυμάνσεων να είναι ικανοποιητικό [Mikol & Giege, 1992]. Από τη στιγμή που θα δημιουργηθεί ένας πυρήνας τότε ξεκινά αυθόρμητα η ανάπτυξή του, ενώ μικρότερα συσσωματώματα τείνουν να διαλυτοποιηθούν [Kam *et al.*, 1978]. Ανάλογα με την κρυσταλλική δομή ο πυρήνας αποτελείται από 10 έως 200 μόρια, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για να σχηματιστεί ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες [Blundell & Johnson, 1976].

Η πυρήνωση αποτελεί το πιο κατανοητό στάδιο της κρυστάλλωσης. Η ποιοτική και ποσοτική περιγραφή της μπορεί να γίνει μέσω θερμοδυναμικών εξισώσεων. Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα η πυρήνωση θεωρείται ως μια αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού συσσωματωμάτων. Δυο συναγωνιστικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα κατά το στάδιο της πυρήνωσης. Η μία οδηγεί στο σχηματισμό της κρυσταλλικής δομής και η άλλη στη δημιουργία άμορφου ιζήματος [Kam *et al.*, 1978].

2. **Ανάπτυξη πυρήνων.** Μετά το στάδιο της πυρήνωσης αρχίζει η διαδικασία ανάπτυξης κρυστάλλων με επικάθιση μορίων πρωτεΐνης στους πυρήνες, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και η πρωτεϊνική συγκέντρωση του διαλύματος. Μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης αυτής επιτυγχάνεται στην περιοχή κοντά στην επιφάνεια του κρυστάλλου με αποτέλεσμα νέα μόρια να διαχέονται προς αυτή και να υπάρχει μια διαρκής μεταφορά μάζας [Kam *et al.*, 1978].

Ο ρυθμός εναπόθεσης πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια του κρυστάλλου ορίζεται από το νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας:

$$dM/ dt = D(dC/ dt)_o S$$

όπου $(dC/ dt)_o$ είναι η βαθμίδα συγκέντρωσης στην επιφάνεια του κρυστάλλου, S είναι η επιφάνεια της κρυσταλλικής περιοχής και D ο μέσος συντελεστής διάχυσης. Θεωρώντας ότι η ανάπτυξη προχωράει μέσω σύνδεσης μονομερών, η σταθερά του ρυθμού ανάπτυξης μπορεί να προσδιοριστεί από τη σχέση:

$$dM/ dt = K[C_i (0) - C_i] Sd$$

όπου $C_i (0)$ είναι η συγκέντρωση στην κατάσταση κορεσμού, C_i είναι η συγκέντρωση του διαλύματος και K ο συντελεστής ταχύτητας ανάπτυξης, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός της μορφολογίας του υπό ανάπτυξη κρυστάλλου [Φιλιππόπουλος & Γρηγοροπούλου, 1998]

Το στάδιο της ανάπτυξης των κρυστάλλων μπορεί να μελετηθεί με τη βοήθεια της φωτομικροσκοπίας υπεριώδους ακτινοβολίας [Kam *et al.*, 1978].

- 3. Αναστολή της ανάπτυξης.** Με βάση το νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας, αν ο μέσος συντελεστής διάχυσης D είναι μεγαλύτερος του συντελεστή ταχύτητας ανάπτυξης K , τότε η ταχύτητα ανάπτυξης καθορίζεται από τη μορφολογία του κρυστάλλου. Στην αντίθετη περίπτωση η ταχύτητα καθορίζεται από τη διάχυση των πρωτεϊνικών μορίων. Δεδομένου ότι τα συστήματα κρυστάλλωσης είναι συνήθως κλειστά, δηλαδή ότι δεν μπορεί να προστεθεί πρωτεΐνη από εξωτερικούς παράγοντες, η ταχύτητα ανάπτυξης ελαττώνεται με το χρόνο και τελικά μηδενίζεται. Με βάση διάφορα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει παρατηρηθεί ότι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα, η αναστολή της ανάπτυξης των κρυστάλλων δεν είναι αποτέλεσμα

της εξάντλησης της περιεχόμενης στο διάλυμα πρωτεΐνης. Η αναστολή της ανάπτυξης οφείλεται στη μεταβολή κάποιων ιδιοτήτων της επιφάνειας του κρυστάλλου [Kam et al., 1978]. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται δηλητηρίαση των επιφανειακών κέντρων σύνδεσης και προκαλείται είτε λόγω της εναπόθεσης προσμίξεων στα κέντρα αυτά, είτε λόγω της αδρανοποίησης της επιφάνειας των κρυστάλλων. Η ύπαρξη ξένων σωματιδίων, τα οποία λειτουργούν ως κέντρα σύνδεσης, επιταχύνουν τη διαδικασία της πυρήνωσης και γι' αυτό το λόγο η χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη είναι απαραίτητο να έχει όσο το δυνατόν υψηλότερο βαθμό καθαρότητας. Αποτέλεσμα της ύπαρξης προσμίξεων είναι να αναπτύσσονται γρηγορότερα οι κρύσταλλοι, οι οποίοι όμως είναι μικρότερου μεγέθους, κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό [Blundell & Johnson, 1976].

4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών

Φυσικοί παράγοντες	Χημικοί παράγοντες	Βιοχημικοί παράγοντες
Θερμοκρασία/διακυμάνσεις θερμοκρασίας	pH	Καθαρότητα
Μεθοδολογία/τρόπος προσέγγισης της ισορροπίας	Είδος παράγοντα καθίζησης	Επίδραση προσδέτη
Βαρύτητα	Συγκέντρωση παράγοντα καθίζησης	Στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων
Πίεση	Ιοντική ισχύς	Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις
Χρόνος	Ειδικά ιόντα	Πηγή
Δονήσεις / ήχος / μηχανική διαταραχή	Βαθμός υπερκορεσμού	Πρωτεόλυση /υδρόλυση
Ηλεκτρικό / μαγνητικό πεδίο	Αναγωγικό / οξειδωτικό περιβάλλον	Χημική τροποποίηση
Διηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου	Συγκέντρωση πρωτεΐνης	Γενετικές τροποποιήσεις
Ιξώδες (viscosity)	Μεταλλικά ιόντα	Συμμετρία
Κατάσταση ισορροπίας	Σταυροδεσμοί	Σταθερότητα
	Απορρυπαντικά/επιφανειο-	Ισοηλεκτρικό σημείο

Ομοιογένεια/ετερογένεια πυρήνων κρυστάλλωσης	δραστικές ουσίες/αμφολύτες Προσμίξεις	Ιστορικό δείγματος
---	--	--------------------

Πίνακας 1: Παρουσίαση φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών [McPherson, 1997].

Η ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων αποτελεί το σημαντικότερο αλλά και το δυσκολότερο στάδιο στην όλη κρυσταλλογραφική μελέτη, λόγω του μεγάλου αριθμού των παραγόντων που εμπλέκονται στην ανάπτυξή τους και στην περιορισμένη γνώση που έχουμε για την πορεία ανάπτυξης των κρυστάλλων.

Η μέθοδος που εφαρμόζεται συνήθως είναι αυτή της δοκιμής-σφάλματος (trial-error method), δοκιμάζοντας τις μέχρι τώρα γνωστές συνθήκες κρυστάλλωσης. Σήμερα έχουν επίσης αναπτυχθεί συστήματα ρομποτικής για τη γρηγορότερη ανάλυση, βελτιστοποίηση των συνθηκών αλλά και την ελαχιστοποίηση της ποσότητας της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται.

Θερμοκρασία. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αταξίας των διαλυμένων μορίων, με αποτέλεσμα να είναι επιτρεπτές μακρομοριακές διευθετήσεις υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας, εφόσον οι παράμετροι της εντροπίας τείνουν να επικρατήσουν αυτών της ενθαλπίας. Επιπλέον η διηλεκτρική σταθερά μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας [McMurry, 2001].

pH. Αλλαγές στο pH επηρεάζουν τόσο το διαλύτη, όσο και τη διαλυμένη ουσία. Το pH εκείνο στο οποίο η πρωτεΐνη δεν παρουσιάζει φορτίο ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο και η διαλυτότητάς της σ' αυτό είναι η ελάχιστη δυνατή. Παράλληλα σε αυτό το σημείο η πρωτεΐνη διογκώνεται και η ποσότητα του δεσμευμένου νερού ελαχιστοποιείται. Η ρύθμιση του pH γίνεται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων [McMurry, 2001].

Άλατα. Τα άλατα μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους κάποιοι από τους οποίους είναι οι εξής:

1. Είναι υπεύθυνα για την ιοντική ισχύ και επηρεάζουν τις μακρομοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η άπωση μεταξύ ηλεκτρολυτών του ίδιου φορτίου μειώνεται.

2. Μπορούν να σχηματίσουν απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις με φορτισμένα αμινοξέα (αργινίνη, λυσίνη, ασπαρτικό, γλουταμικό) στην επιφάνεια των πρωτεϊνών.
3. Δρουν με διπολικές – μονοπολικές αλληλεπιδράσεις με τις διπολικές ομάδες των μακρομορίων (πεπτιδικό δεσμοί, αμινο-, υδροξυ-, καρβοξυλικές ομάδες και αμίδια) και μπορούν να οδηγήσουν σε μερική αποδιάταξη της πρωτεΐνης.
4. Σχηματίζουν μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφοβων αμινοξέων εκτεθειμένων στο διαλύτη και των υδρόφοβων τμημάτων των οργανικών αλάτων (σουλφονικών, καρβοξυλικών, αμμωνιακών) [McMurry, 2001].

Ανταγωνιστές δεσμών υδρογόνου. Μόρια όπως η ουρία, το φορμαμίδιο και τα γουανιδινικά άλατα, σε υψηλές συγκεντρώσεις ($C \geq 4 M$) ανταγωνίζονται τους δεσμούς υδρογόνου των μορίων του νερού και τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου της πρωτεΐνης, δρώντας σαν αποδιατακτικοί παράγοντες, ενώ στην αντίθετη περίπτωση σταθεροποιούν τους υδροφοβικούς δεσμούς [McMurry, 2001].

Οργανικοί διαλύτες. Τροποποιούν τη διηλεκτρική σταθερά προκαλώντας αλλαγές σε διάφορες αλληλεπιδράσεις. Με μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς παρουσιάζεται αύξηση της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ ανόμοιων φορτίων, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται η διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτεί το γεγονός ότι οι οργανικοί διαλύτες ορισμένες φορές μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες και οδηγούν σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα [McMurry, 2001].

4.4 Διαλύτης συγκρυστάλλωσης

Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ των πρωτεϊνικών κρυστάλλων και των κρυστάλλων που σχηματίζουν τα μικρότερα-μόρια είναι ότι οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης περιέχουν σημαντική ποσότητα υγρού διαλύτη. Οι κρύσταλλοι γενικά αποτελούνται από δυο φάσεις: μια στερεή, που αποτελείται από τα σημεία επαφής των μακρομορίων και δημιουργεί το ανοιχτό πλέγμα και μια υγρή, που συμπληρώνει τα κενά μεταξύ του πλέγματος. Τα μόρια του διαλύτη που βρίσκονται πιο κοντά στα πρωτεϊνικά μακρομόρια, είναι σαφώς οργανωμένα και συνδέονται με τις

επιφανειακές πολικές ομάδες της πρωτεΐνης με ισχυρές αλληλεπιδράσεις, ενώ εκείνα που εισχωρούν στα κανάλια που σχηματίζει η πρωτεΐνη είναι αποδιοργανωμένα [Blundell & Johnson, 1976].

4.5 Κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης

4.5.1 Γενικά

Η κρυσταλλογραφία υψηλής απόδοσης για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων είναι μια ταχεία μέθοδος αναγνώρισης νέων εν δυνάμει φαρμάκων. Οι μέθοδοι υψηλής απόδοσης που έχουν αναπτυχθεί για την κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι πολύ εξελιγμένοι, ενώ οι αντίστοιχοι για την NMR τεχνική βρίσκονται ακόμη σε αρχικά στάδια [Blundell *et al.*, 2002].

Η επίδραση της κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης στο σχεδιασμό φαρμάκων είναι διπλή: η επιλογή και η καταλληλότητα του πρωτεϊνικού στόχου μπορεί να είναι πιο ακριβής και ο διαχωρισμός μορίων, που μπορεί να αποτελούν πρόδρομες ενώσεις, αντικαθίσταται από τον σχεδιασμό αυτών των μορίων σε πολύ πιο γρήγορη κλίμακα έτσι ώστε να συμβαδίζει με τις ανάγκες της ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Γι' αυτό το λόγο η χρήση της κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης προκαλεί επανάσταση στη διαδικασία του σχεδιασμού νέων φαρμάκων [Blundell *et al.*, 2002].

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πάρα πολλές βελτιώσεις τόσο στο μηχανολογικό κομμάτι όσο και στο λογισμικό των ηλεκτρονικών υπολογιστών με αποτέλεσμα η συλλογή δεδομένων να έχει γίνει ταχύτερη και αποτελεσματικότερη. Η επεξεργασία και η ανάλυση των δεδομένων εξακολουθούν να είναι δύο από τα βασικότερα στάδια του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων που επιβραδύνουν την όλη διαδικασία, κυρίως γιατί το πλήθος των ενώσεων που μελετούνται είναι εξαιρετικά μεγάλο και η επανάληψη των μετρήσεων για την επικύρωση των αποτελεσμάτων είναι επιβεβλημένη. Ωστόσο η χρήση εξειδικευμένων προγραμμάτων ελαχιστοποιεί την ανθρώπινη παρέμβαση και άρα αποκλείει το ανθρώπινο λάθος [Blundell *et al.*, 2002].

Με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας υψηλής απόδοσης μελετάται ο τρόπος σύνδεσης και οι βασικές αλληλεπιδράσεις των ενώσεων, οι οποίες αν και εμφανίζουν

μικρή συγγένεια με το μακρομοριακό στόχο, συνδέονται σ' αυτό με μεγάλη εξειδίκευση. Η έκφραση, ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών σε ποσότητα και μορφή που απαιτείται για την κρυστάλλωση και την ανάλυση ακτίνων Χ είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απασχολεί το μεγαλύτερο ποσοστό των ερευνητών που ασχολούνται με τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων. Ο αρχικός στόχος είναι η λήψη μιας μικρής ποσότητας πρωτεΐνης, η οποία θα δώσει κάποιους καλούς κρυστάλλους. Ο αντικειμενικός στόχος είναι η ανακάλυψη περιοχών οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να αναδιπλώνονται και να διαλυτοποιούνται. Οι περιοχές αυτές θα πρέπει να μην έχουν αλληλουχίες μικρής πολυπλοκότητας, που μπορεί να έχουν περισσότερες από μία διαμορφώσεις και να παρεμβάλλουν στη κρυστάλλωση, αλλά ούτε και μεγάλους βρόχους, οι οποίοι καθιστούν την πρωτεΐνη μη λειτουργική και χωρίς συγκεκριμένη διαμόρφωση [Blundell *et al.*, 2002].

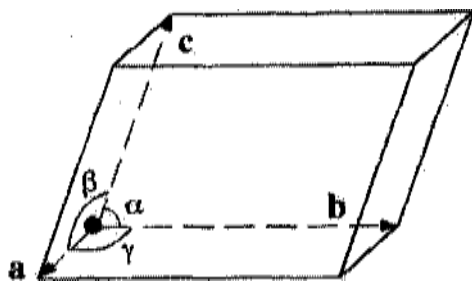
Ωστόσο ακόμη και σήμερα, η ανάπτυξη κρυστάλλων καλής ποιότητας, που να μπορούν να δώσουν περίθλαση σε υψηλή ευκρίνεια παραμένει ένα ουσιαστικό πρόβλημα. Κάποια πρωτεϊνικά μόρια δίνουν άριστους κρυστάλλους μόνο μετά από λίγες προσπάθειες ενώ άλλα απαιτούν μερικούς μήνες και για πολλά δεν έχει γίνει δυνατή η κρυστάλλωσή τους. Η βελτίωση της ποιότητας των κρυστάλλων συμβάλλει κατά πολύ στην ακριβέστερη ανάλυση της δομής σε υψηλότερη ευκρίνεια [Acharya & Rees, 1997].

4.5.2 Βασικές αρχές

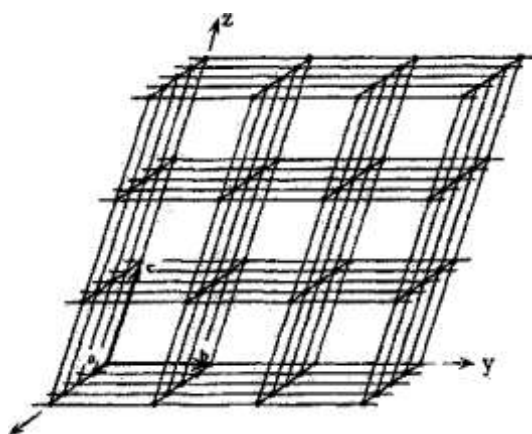
Τα στερεά σώματα διακρίνονται σε κρυσταλλικά και άμορφα. Τα κρυσταλλικά στερεά εμφανίζουν κανονικότητα στον τρόπο δόμησής τους, έτσι ώστε τα συστατικά τους (μόρια, άτομα ή ιόντα) να βρίσκονται σε καθορισμένες θέσεις και οι μεταξύ τους αποστάσεις να είναι για κάθε κρυσταλλικό στερεό σταθερές. Αντίθετα τα άμορφα στερεά δεν εμφανίζουν καμιά κανονικότητα στη δόμησή τους. Η διάκριση αυτή βασίστηκε αρχικά στα εξωτερικά γνωρίσματα των κρυστάλλων και στη διαφορετική συμπεριφορά ορισμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους (π.χ. το σημείο τήξης) [Τσαγκάρης, 1999].

Η έννοια του κρυστάλλου βασίζεται στην παρατήρηση ότι τα ανεξάρτητα μόρια μιας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα συνδέονται και παρουσιάζουν έναν ή ελάχιστους μόνο

προσανατολισμούς. Η τρισδιάστατη δομή του κρυστάλλου που προκύπτει, δημιουργείται από την επανάληψη πανομοιότυπων ομάδων, ατομικά αλλά και χωροταξικά. Η μικρότερη στοιχειώδης ομάδα, η οποία αντιπροσωπεύει πλήρως την τρισδιάστατη δομή ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα. Το μέγεθος και η δομή της περιγράφονται από τρία διανύσματα **a**, **b** και **c** και τα οποία έχουν ένα κοινό σημείο εφαρμογής. Οι άξονες οι οποίοι σχηματίζονται από τα διανύσματα αυτά ονομάζονται κρυσταλλογραφικοί άξονες. Το σύνολο των διανυσμάτων **a**, **b** και **c** καθώς και των γωνιών **α**, **β** και **γ** που σχηματίζονται μεταξύ τους ονομάζονται πλεγματικές παράμετροι και ορίζουν πλήρως τη στοιχειώδη κυψελίδα. Αντίστοιχα, το σημειακό πλέγμα του κρυστάλλου της πρωτεΐνης ορίζεται με ακρίβεια αν μετατοπιστούν διαδοχικά τα διανύσματα **a**, **b** και **c** [Τσαγκάρης, 1999].



Εικόνα 12: Γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στοιχειώδους κυψελίδας [Dreath, 2002].



Εικόνα 13: Το τρισδιάστατο κρυσταλλικό πλέγμα ως αποτέλεσμα κανονικής διάταξης της στοιχειώδους κυψελίδας [Dreath, 2002].

Αν διαιρέσουμε τον χώρο σε τρία σύνολα επιπέδων είναι δυνατόν να παραχθούν όλα τα είδη των μοναδιαίων κυψελίδων, π.χ. αν τα επίπεδα των τριών συνόλων είναι ισοδιάστατα και ταυτόχρονα κάθετα μεταξύ τους τότε η κυψελίδα που δημιουργείται είναι κύβος (κυβικό σύστημα με $a=b=c$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$). Αν τοποθετήσουμε σημεία στα σημεία τομής των επιπέδων αλλά και σε άλλες θέσεις έτσι ώστε όλα τα πλεγματικά σημεία να έχουν το ίδιο περιβάλλον μπορούμε να δημιουργήσουμε σημειακά πλέγματα.

Σύμφωνα με τον Γάλλο κρυσταλλογράφο Bravais (1848) μπορούμε να δημιουργήσουμε δεκατέσσερα σημειακά πλέγματα ή πλέγματα Bravais. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα επτά κρυσταλλικά συστήματα και τα αντίστοιχα σημειακά πλέγματα. Τα πλέγματα Bravais χαρακτηρίζονται με τα σύμβολα P (primitive, θεμελιώδης ή R, ειδικά για το ρομβοεδρικό σύστημα), I (body-centered, χωροκεντρωμένη) και F (face-centered, εδροκεντρωμένη), αν υπάρχουν μόνο σημεία στα σημεία τομής των επιπέδων των κρυσταλλικών συστημάτων, αν υπάρχουν επιπλέον σημεία στο κέντρο του σημειακού πλέγματος και αν υπάρχουν επιπλέον σημεία στις έδρες του σημειακού πλέγματος αντίστοιχα [Παπαϊωάννου, 2004].

Σύστημα	Γεωμετρικά χαρακτηριστικά	Πλέγματα Bravais	Παράδειγμα
Κυβικό	$a=b=c$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P,I,F	NaCl
Τετραγωνικό	$a=b\neq c$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P,I	Zn
Ορθορομβικό	$a\neq b\neq c$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	P,I,F,C	Ρομβικό S
Μονοκλινές	$a\neq b\neq c$, $\alpha=\gamma=90^\circ$, $\beta\neq 90^\circ$	P,C	Μονοκλινές S
Τρικλινές	$a\neq b\neq c$, $\alpha\neq\beta\neq\gamma\neq 90^\circ$	P	$K_2Cr_2O_7$
Τριγωνικό/ρομβοεδρικό	$a=b=c$, $\alpha\neq\beta\neq\gamma\neq 90^\circ$	R	$CaCO_3$
Εξαγωνικό	$a=b\neq c$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$	P	Γραφίτης, Χαλαζίας

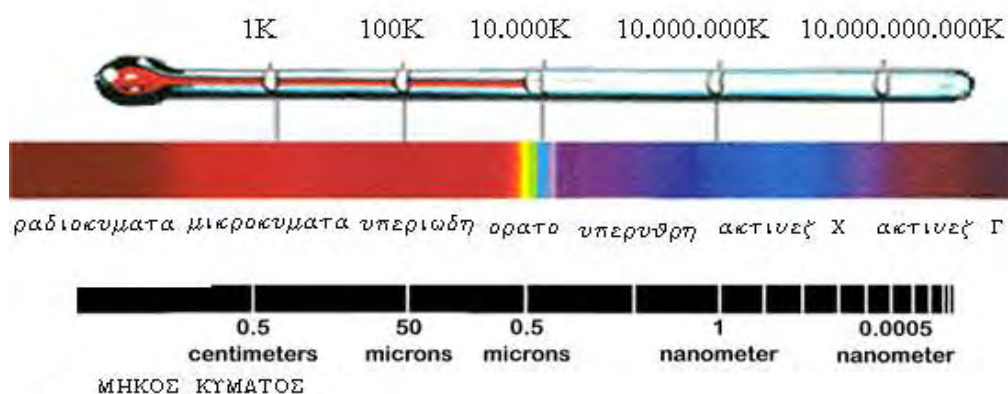
Πίνακας 2: Παρουσίαση των επτά κρυσταλλικών συστημάτων και των αντίστοιχων σημειακών πλεγμάτων (πλέγματα Bravais) [Παπαϊωάννου, 2004].

Ο συνδυασμός των δεκατεσσάρων πλεγμάτων Bravais με τις συμμετρίες σημείου (άξονες περιστροφής, επίπεδα ανάκλασης και μη-κανονικοί άξονες) και τις συμμετρίες μεταφοράς (επίπεδα ολίσθησης και άξονες ελικώσεως) παράγουν τις 230 ομάδες χώρου στις οποίες περιλαμβάνονται τόσο τα πλέγματα Bravais αλλά και η συμμετρία των πραγματικών κρυστάλλων.

4.5.3 Ακτίνες X (Röntgen)

Η μελέτη των κρυσταλλικών δομών γίνεται, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, με τη βοήθεια των ακτίνων X. Οι ακτίνες X αποτελούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος 100-0.1Å και ανακαλύφθηκαν το 1895 από τον Wilhelm Conrad Röntgen. Οι διάφορες μέθοδοι βασίζονται στο φαινόμενο της περίθλασης ακτίνων X στα διάφορα επίπεδα που ορίζονται από τις θέσεις των συστατικών των κρυσταλλικών σωμάτων. Έχουν αναπτυχθεί κατάλληλες συσκευές και μεθοδολογίες (XRD: X-ray Diffraction) που έχουν τη δυνατότητα να υπολογίζουν τις σταθερές του πλέγματος των κρυσταλλικών σωμάτων και να τις ταυτοποιούν [Τσαγκάρης, 1999].

Οι ακτίνες X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και αποτελεί μέρος του συνολικού ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (Εικόνα 14).



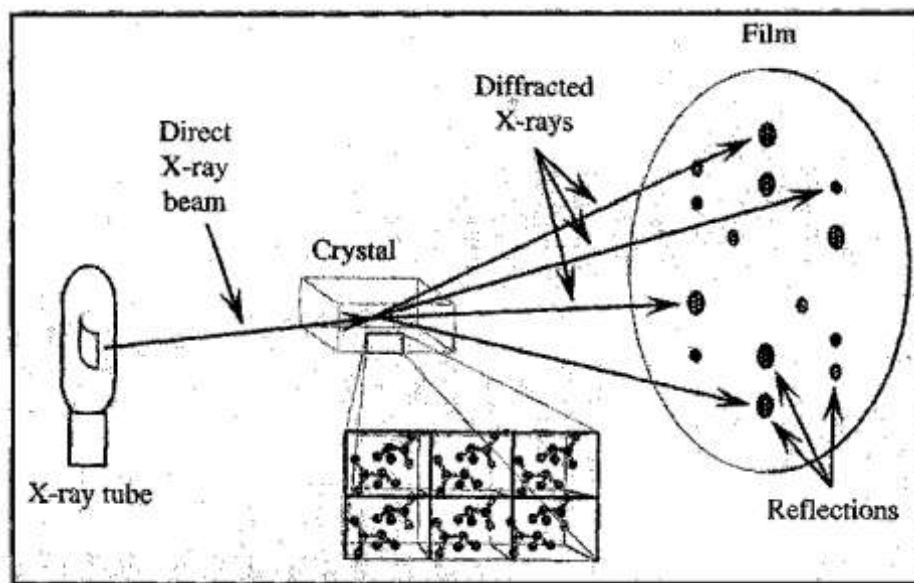
Εικόνα 14: Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Ακτίνες X παράγονται όταν ηλεκτρόνια που κινούνται με μεγάλες ταχύτητες χτυπήσουν υλικά. Τότε ένα μέρος της κινητικής τους ενέργειας μετατρέπεται σε

ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία της περιοχής των ακτίνων X. Το υπόλοιπο μετατρέπεται σε θερμότητα. Οι ακτίνες X ανιχνεύονται από τα αποτελέσματά τους. Έχουν ισχυρή φωτοχημική δράση που μαυρίζει τις φωτογραφικές πλάκες, προκαλούν ισχυρό φθορισμό, ιονίζουν τα αέρια και έχουν έντονη βιολογική δράση. Μπορούν να προκαλέσουν εγκαύματα και οι πολύ «σκληρές» ακτινοβολίες (μικρού μήκους κύματος) μπορούν να προκαλέσουν μεταβολή στις κληρονομικές ιδιότητες προσβάλλοντας τα γονίδια των χρωμοσωμάτων του πυρήνα των κυττάρων [Τσαγκάρης, 1999].

4.5.4 Πηγές ακτίνων X και ανιχνευτές

Το πείραμα περίθλασης ακτίνων X απαιτεί δύο κύρια όργανα, την πηγή και τον ανιχνευτή ακτίνων X. Στην Εικόνα 15 παρουσιάζεται η διάταξη κατά το πείραμα της περίθλασης ακτίνων X.



Εικόνα 15: Παρουσίαση της διάταξης κατά το πείραμα περίθλασης ακτίνων X. Η πηγή ακτίνων X εκπέμπει ακτίνες που προσπίπτουν στον κρύσταλλο (κρυσταλλικό πλέγμα), τα ηλεκτρόνια περιθλούν ακτινοβολία ίσου μήκους κύματος προς όλες τις κατευθύνσεις. Με τη βοήθεια του ανιχνευτή καταγράφεται το περιθλασίγραμμα, στο οποίο εντοπίζονται οι κηλίδες έντασης των περιθλάσεων.

Πηγές ακτίνων X

Σήμερα υπάρχουν δύο κύρια είδη πηγών, οι συμβατικές πηγές που ελευθερώνουν ακτινοβολία μετά από επιτάχυνση ηλεκτρονίων (εντός ηλεκτρικού πεδίου) και μετάπτωση ηλεκτρονίων μετάλλου και οι συγχροτρονικές πηγές όπου επιταχυντές σωματιδίων (ηλεκτρονίων, ποζιτρονίων) προκαλούν σωματίδια να κινούνται σχεδόν με ταχύτητα του φωτός και να αποδίδουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατά την αλλαγή κατεύθυνσης.

Στις συμβατικές εργαστηριακές πηγές, οι ακτίνες X παράγονται από μια λυχνία με υψηλό κενό (περίπου 10^{-7} mmHg), η οποία περιέχει μια κάθοδο ηλεκτρικά θερμαινόμενη και μια άνοδο από κατάλληλο υλικό (συνήθως χαλκός, Cu, αλλά και μολυβδαίνιο, Mo). Μια πηγή υψηλής τάσης (20-70kV) συνδέει την άνοδο με την κάθοδο ενώ το θετικό δυναμικό της πηγής συνδέεται με την άνοδο. Η άνοδος ψύχεται διότι η υψηλή τάση θερμαίνει γρήγορα το μεταλλικό έλασμα. Ο συνηθέστερος τρόπος ψύξης της ανόδου είναι με τη χρησιμοποίηση νερού ενώ αποτελεσματική ψύξη πραγματοποιείται και με τη χρησιμοποίηση περιστρεφόμενης ανόδου, όπου το μέταλλο περιστρέφεται καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος για να αποφεύγεται η άνοδος της θερμοκρασίας σ' ένα μόνο σημείο [Τσαγκάρης, 1999].

Το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ της ανόδου και της καθόδου επιταχύνει τα ηλεκτρόνια, τα οποία αποκτούν ενέργειες της τάξης των 10^5 eV ($1\text{eV} = 1.6 \times 10^{-19}$ Joule) ικανές να παράγουν ακτίνες X στην άνοδο [Τσαγκάρης, 1999].

Οι πηγές συγχροτρονικής ακτινοβολίας αποτελούν μεγάλες εγκαταστάσεις με δακτυλίους επιτάχυνσης σωματιδίων από 10 έως μερικές εκατοντάδες μέτρα. Τα ηλεκτρόνια (ποζιτρόνια) διατηρούνται σε μία κυκλική τροχιά με τη βοήθεια ισχυρών μαγνητών. Υπάρχουν τέσσερις τύποι μαγνητικών πεδίων στους δακτυλίους αποθήκευσης σωματιδίων: οι μαγνήτες κλίσης, που αναγκάζουν τα σωματίδια να κινούνται σε κυκλική τροχιά και άλλες τρεις συσκευές, που επεκτείνουν και ενισχύουν το φάσμα σε μικρότερα μήκη κύματος χωρίς να προκαλούν καθαρή μετατόπιση από την κυκλική τροχιά π.χ. σύστημα μετατόπισης μήκους κύματος.

Το κύριο πλεονέκτημα της συγχροτρονικής ακτινοβολίας είναι η έντασή της που είναι περίπου δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από τις συμβατικές πηγές. Η ισχυρή ακτινοβολία χρησιμοποιείται για κρυσταλλικά δείγματα που περιθλούν ασθενώς, όπως μικροί κρύσταλλοι ή κρύσταλλοι με μεγάλη μοναδιαία κυψελίδα.

Επίσης, λόγω της χαμηλής απόκλισης (divergence) της ακτίνας οι κηλίδες είναι πιο διακριτές (sharp).

Μία άλλη διαφορά της συγχροτρονικής ακτινοβολίας από τις συμβατικές πηγές είναι η ρύθμιση του μήκους κύματος (tunability). Οποιοδήποτε μήκος κύματος από την περιοχή του υπέρυθρου μέχρι αυτή των ακτίνων X μπορεί να επιλεγεί. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται σε πειράματα ανώμαλης σκέδασης από ακτίνες πολλαπλών μηκών κύματος. Συνήθως επιλέγονται ακτίνες X μήκους κύματος 1Å ή ακόμα και μικρότερου μήκους κύματος με αποτέλεσμα τον περιορισμό της απορρόφησης κατά την πορεία της ακτίνας αλλά και εντός του κρυστάλλου, περιορίζοντας και την καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος του κρυστάλλου [Rhodes, 1993].

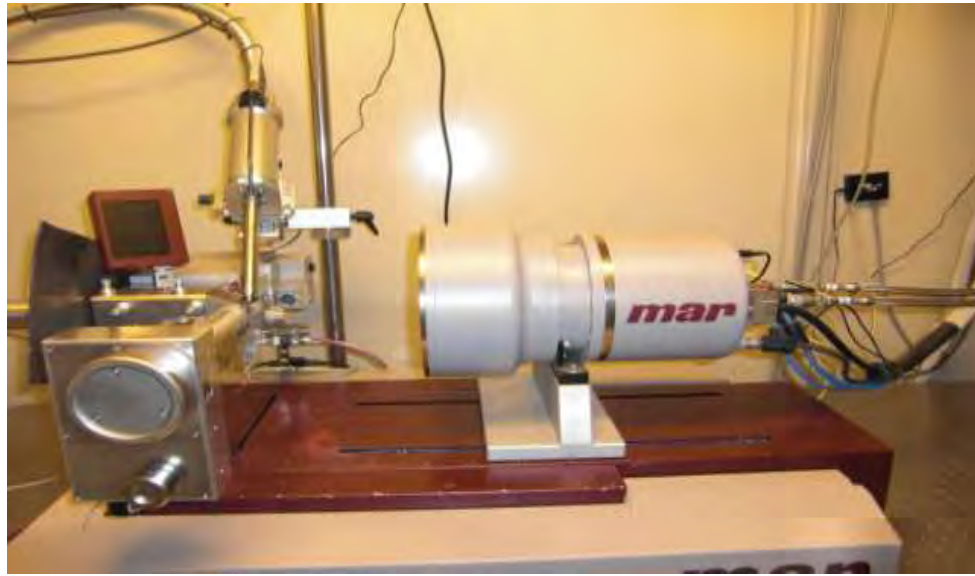
Η πρόσβαση στις συγχροτρονικές ακτίνες X είναι πολύ σημαντική. Το μήκος κύματος των ακτίνων X είναι συγκρίσιμο με τις διατομικές αποστάσεις. Έτσι είναι δυνατή η περίθλαση ακτίνων X από δείγματα κρυστάλλων και οι δομές τους μπορούν να αναλυθούν σε ατομική κλίμακα. Αυτό φυσικά έχει σαν αποτέλεσμα η συμβολή της συγχροτρονικής ακτινοβολίας στην πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία να είναι κεφαλαιώδης. Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων με περιστρεφόμενη ανοδική πηγή παλαιότερα, απαιτούσε την έκθεση του κρυστάλλου στην ακτινοβολία για αρκετές ώρες ενώ σήμερα αρκούν λίγα μόλις λεπτά. Η δυνατότητα επιλογής του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, συμβάλλει πολύ σημαντικά στην επίλυση του προβλήματος φάσης. Τα μικρά μήκη κύματος μειώνουν τόσο την απορρόφηση του κρυστάλλου, όσο και του αέρα, με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη σχέση σήματος-θορύβου. Η χρήση μικρών γωνιών επιτρέπει την καταγραφή περισσότερων δεδομένων στο ίδιο φιλμ. Η νεκρή περιοχή του πλέγματος, που είναι απρόσιτη κατά την περιστροφή του κρυστάλλου γύρω από ένα μοναδικό άξονα, είναι αναλογικά μικρότερη απ' ό τι σε μεγαλύτερο μήκος κύματος [Ζωγράφος, 2000].

Ανιχνευτές ακτίνων X [Dreath, 2002]

Ο προσδιορισμός της δομής μίας πρωτεΐνης (ή ενός μακρομορίου) με περίθλαση ακτίνων X απαιτεί την καταγραφή όλων (ή ένα μεγάλο ποσοστό) των σκεδαζόμενων ακτινών. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει όλα τα κρυσταλλικά σημεία του ανάστροφου πλέγματος να βρεθούν σε κατάσταση περίθλασης, δηλαδή εντός

σφαίρας ακτίνας $1/\lambda$ (σφαίρα του Ewald, βλέπε παρακάτω), με περιστροφή του κρυστάλλου. Έτσι, ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα απαιτεί τις ακόλουθες συσκευές:

1. Το μηχανισμό περιστροφής του κρυστάλλου
2. Μία συσκευή μέτρησης της θέσης και της έντασης της κάθε περιθλώμενης ακτινοβολίας.

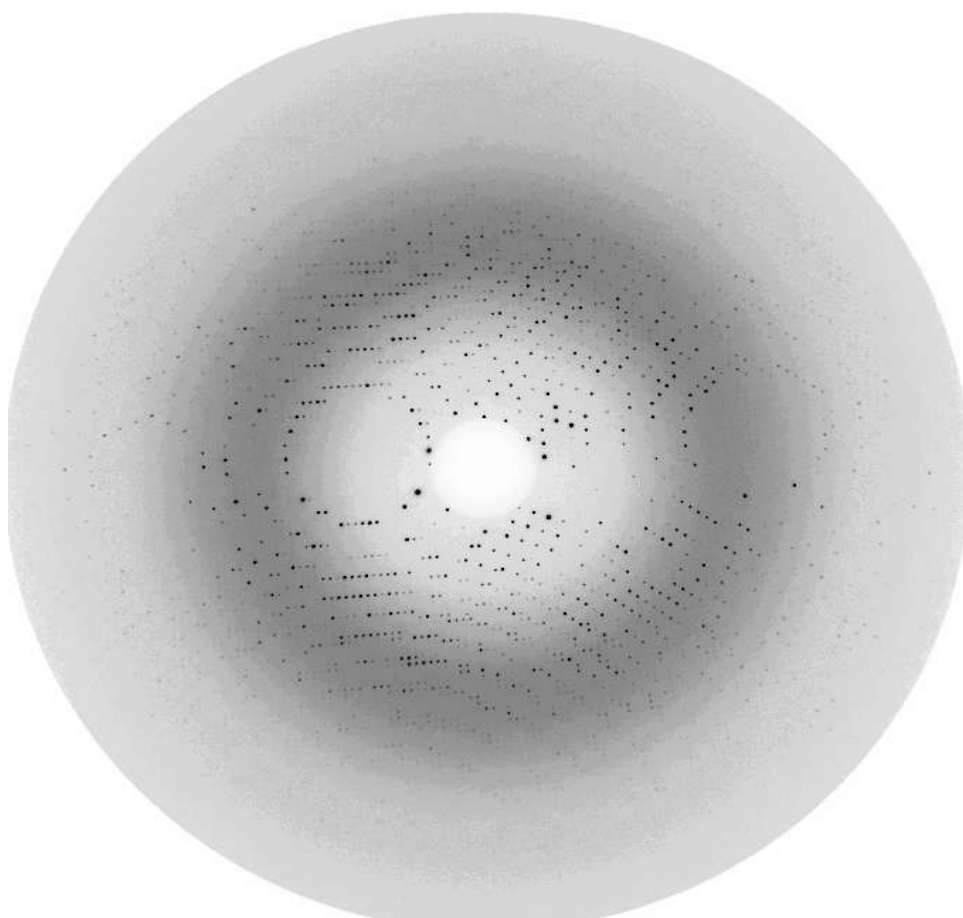


Εικόνα 16: Συσκευή κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ του εργαστηρίου MAX-lab του Lund University. Κάτω: γωνιόμετρο τοποθετημένο στη ειδική θέση.

Τις τελευταίες δεκαετίες η συλλογή των δεδομένων έχει βελτιωθεί σημαντικά. Αρχικά η καταγραφή γινόταν σε φωτογραφικό φιλμ, ενώ σήμερα γίνεται με

συστήματα που μπορούν αυτόματα να μετατρέπουν το σήμα σε ψηφιακή μορφή, αμέσως μετά την έκθεση του κρυστάλλου (Εικόνα 16).

Οι ανιχνευτές πεδιάς (area detectors) (παρόλο που το φωτογραφικό φιλμ και οι τύπου image plate ανιχνευτές ανιχνεύουν περιοχή, ο όρος χρησιμοποιείται για ηλεκτρονικές συσκευές) αποτελούν ηλεκτρονικές συσκευές που ανιχνεύουν φωτόνια σε μία επιφάνεια και η επεξεργασία του σήματος γίνεται αμέσως μετά την ανίχνευση φωτονίων. Η βασική διαφορά είναι ότι οι ανιχνευτές πεδιάς μπορούν να καταγράφουν ταλάντωση 0.1° δίνοντας την τρισδιάστατη εικόνα της κηλίδας, αντίθετα από το φιλμ και τους image plate ανιχνευτές που καταγράφουν πολύ μεγαλύτερη ταλάντωση. Οι ανιχνευτές αυτοί στηρίζονται στην τεχνολογία του θαλάμου ιονισμού αερίων, πολλαπλασιαστή εικόνας (image intensifier) συνδεδεμένο με σύστημα video ή CCD (charge coupled device).



Εικόνα 17 : παράδειγμα περιθλασιγράμματος. Το συγκεκριμένο περιθλασίγραμμα προέκυψε από περίθλαση ακτινών X κρυστάλλου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου εμποτισμένου με έναν αναστολέα του ενζύμου.

4.5.5 Θεωρία περίθλασης ακτινών X από κρύσταλλο

Περίθλαση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο το φως (αλλά και οποιοδήποτε κύμα) αποκλίνει από την ευθύγραμμη πορεία του όταν συναντήσει εμπόδιο ή οπή της τάξης του μήκους κύματος των διαδεδομένων κυμάτων. Στην περίπτωση των ακτινών X, όπου ο W. Röntgen ανακάλυψε ότι είναι ακτινοβολία μήκους κύματος της τάξης του 1Å , δεν είναι δυνατό να δημιουργήσουμε φράγμα με τόσο μικρό εύρος για να μελετήσουμε την περίθλαση τους. Το 1913 ο Max von Laue διατύπωσε την ιδέα της χρησιμοποίησης του κρυστάλλου ως φράγμα για τη μελέτη της περίθλασης των ακτινών X. Τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά, ο Laue όχι μόνο απόδειξε την ορθότητα της ιδέας του αλλά προκάλεσε και την αρχή του προσδιορισμού της κρυσταλλικής δομής με την χρήση των ακτινών X, λόγος για τον οποίο και βραβεύτηκε με το Nobel φυσικής το 1914 .

- Σκέδαση ακτινών X από σύστημα δυο ηλεκτρονίων [Rossman & Arnold, 2001]

Η σκέδαση αποτελεί το φαινόμενο αλληλεπίδρασης των ακτινών X, ως ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, με τα ηλεκτρόνια. Όταν ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα επιδρά σε ένα σύστημα ηλεκτρονίων, η ηλεκτρική και μαγνητική συνιστώσα του κύματος ασκούν δύναμη στα ηλεκτρόνια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την δόνηση των ηλεκτρονίων και την εκπομπή ακτινοβολίας του ίδιου μήκους κύματος με το αρχικό. Σύμφωνα με την ηλεκτρομαγνητική θεωρία που αναπτύχθηκε από τον J.J. Thomson η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας υπό γωνία 2θ ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία ορίζεται ίση με:

$$I_{2\theta} = I_0 \cdot (n \cdot e^4 / 2r^2 \cdot m^2 \cdot c^4) \cdot (1 + \cos^2 2\theta) \quad (1.1)$$

I_0 =ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας, n =αριθμός σκεδαζόμενων ηλεκτρονίων, r =απόσταση παρατηρητή από το ηλεκτρόνιο, e =φορτίο ηλεκτρονίου, m =μάζα ηλεκτρονίου c =ταχύτητα φωτός,

όπου η ένταση είναι αντιστρόφως ανάλογη του τετραγώνου της μάζας του σωματιδίου, με συνέπεια το πρωτόνιο (με μάζα 2000 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ηλεκτρονίου) να σκεδάζει ασήμαντα και να μη θεωρείται σκεδαστής ακτινοβολίας.

Έστω σύστημα δυο ηλεκτρονίων (e_1 και e_2) που βρίσκονται σε απόσταση r (βλ. Σχήμα 18 α). Η ηλεκτρομαγνητική προσπίπτουσα ακτινοβολία s_0 έχει μήκος κύματος λ και προσπίπτει στο σύστημα. Τα ηλεκτρόνια υπό την επίδραση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου εκπέμπουν ακτινοβολία ίδιου μήκους κύματος προς κάθε κατεύθυνση (στην Εικόνα 18 απεικονίζεται μόνο η ανακλώμενη ακτινοβολία s). Η διαδρομή που ακολουθεί η ακτινοβολία που προσπίπτει στο e_2 είναι μεγαλύτερη κατά το άθροισμα των p και q αποστάσεων. Όμως, τα s_0 και s είναι διανύσματα με μήκος κύματος λ , και η διαδρομή $p = \lambda \cdot r \cdot s_0$ και $q = -\lambda \cdot r \cdot s$. Η διαφορά διαδρομής των σκεδαζόμενων ακτινοβολιών (κύμα 1 και 2) είναι ίση με $p+q = \lambda \cdot r \cdot (s - s_0)$. Το κύμα 2 που σκεδάζεται από το e_2 έχει διαφορά φάσης (ακτίνια) σε σχέση με το κύμα 1 ίση με:

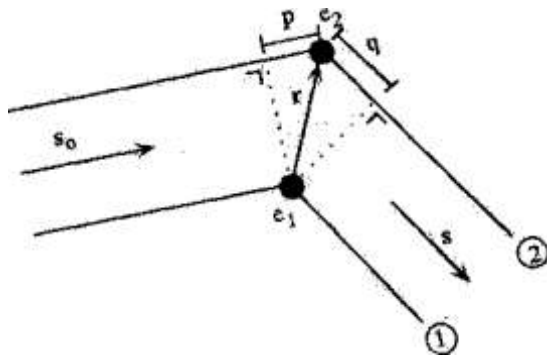
$$- [2\pi \cdot (s - s_0) \cdot \lambda] / \lambda = 2\pi \cdot S, \text{ όπου } S = s - s_0 \text{ (διάνυσμα σκέδασης)} \quad (1.2)$$

Δεδομένου ότι οι σκεδαζόμενες ακτινοβολίες έχουν τα ίδια μέτρα, ίσα με $1/\lambda$ ($|s|$, $|s_0|$),

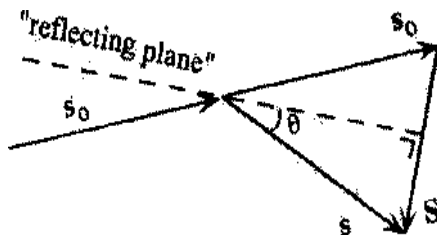
τότε γεωμετρικώς ισχύει ότι, $|S| = |s - s_0| = 2 \cdot \sin\theta / \lambda$ (1.3),

όπου θ η γωνία μεταξύ των διανυσμάτων s , s_0 και του νοητού επιπέδου κάθετου στο διάνυσμα S και καλείται επίπεδο ανάκλασης (βλ. Σχήμα 18 β).

α)



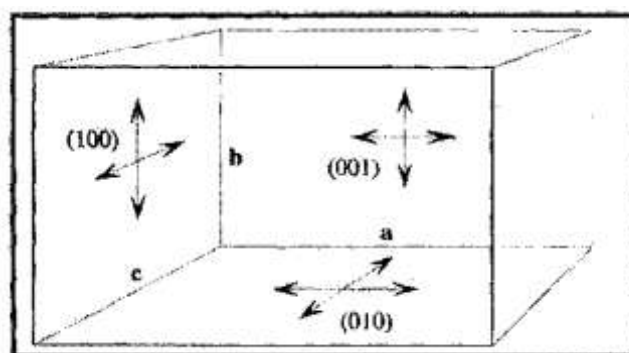
β)



Εικόνα 18: α) Σύστημα σκέδασης από δυο ηλεκτρόνια και β) διάγραμμα σκέδασης S κάθετο στο επίπεδο ανάκλασης (reflecting plane) [Dreath, 2002]

- Συνθήκες περίθλασης - Ο νόμος του Bragg [Rhodes]

Ο W.L. Bragg σε μια προσπάθεια του να ερμηνεύσει τα φαινόμενα περίθλασης ακτινών X υπέθεσε ότι τα προσπίπτοντα κύματα ανακλώνται από τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα που σχηματίζουν τα άτομα που αποτελούν τον κρύσταλλο (γι' αυτό και οι περιθλώμενες ακτινοβολίες καλούνται και ανακλάσεις). Όπως έχουμε αναφέρει ήδη οι στοιχειώδεις κυψελίδες σχηματίζονται από τρία ζεύγη επιπέδων. Τα επίπεδα αυτά μπορούν να χαρακτηριστούν από τρεις δείκτες h , k και l (γνωστοί και ως δείκτες Miller, από το όνομα του κρυσταλλογράφου Miller που εισήγαγε το σύστημα αυτό). Γενικά, κάθε επίπεδο μπορεί να περιγράψει από τις συντεταγμένες των σημείων τομής τους με τους κρυσταλλογραφικούς άξονες a , b και c , οι οποίες και αποτελούν πολλαπλάσια των a , b και c με ακέραιους ή κλασματικούς αριθμούς. Όταν το επίπεδο είναι παράλληλο με τον κρυσταλλογραφικό άξονα τότε το σημείο τομής είναι το άπειρο. Προς αποφυγή αυτού, ο Miller εισήγαγε τους αντίστροφους αριθμούς των συντεταγμένων τομής. Αν π.χ. οι δείκτες Miller επιπέδου είναι h , k και l , τότε οι συντεταγμένες των σημείων αυτού με τους άξονες a , b και c είναι $1/h$, $1/k$ και $1/l$, και οι αντίστοιχες αποστάσεις από τους άξονες είναι a/h , b/k και c/l . Στην Εικόνα 19 παρουσιάζεται μια ορθορομβική στοιχειώδης κυψελίδα και οι δείκτες Miller των κύριων επιπέδων που την σχηματίζουν.



Εικόνα 19: Ορθορομβική στοιχειώδης κυψελίδα ($a \neq b \neq c$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) και δείκτες Miller των επιπέδων που την ορίζουν (Rhodes).

Στο μοντέλο του Bragg για την περίθλαση των ακτινών X (ως ανάκλαση) στα κρυσταλλογραφικά επίπεδα, οποιοδήποτε σύνολο παράλληλων κρυσταλλογραφικών επιπέδων μπορεί να αποτελέσει πηγή μιας περιθλώμενης ακτινοβολίας (δηλαδή ολόκληρο το σύνολο των παραλλήλων επιπέδων δρουν σαν μοναδικός σκεδαστής της προσπίπτουσας ακτινοβολίας προσδίδοντας μια ενισχυμένη ανακλώμενη ακτινοβολία).

Ο νόμος του Bragg ορίζει ότι παράλληλα κρυσταλλογραφικά επίπεδα με δείκτες h, k, l και διεπιφανειακή απόσταση d_{hkl} παράγουν ανάκλαση, όταν ακτίνα X μήκους κύματος λ προσπίπτει στα επίπεδα υπό γωνία θ και ανακλάται υπό την ίδια γωνία, όταν η γωνία θ υπακούει στην συνθήκη:

$$2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda \quad (1.4) \quad (\text{Νόμος του Bragg})$$

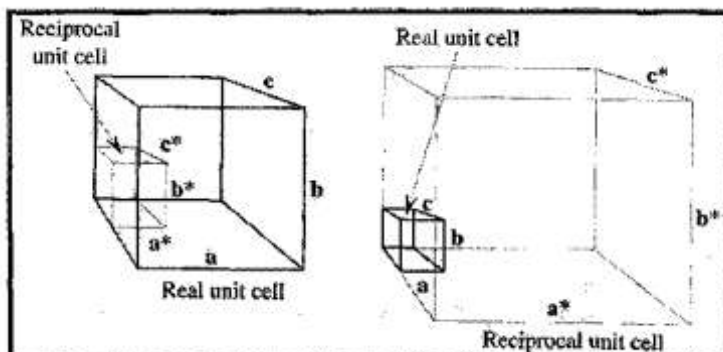
n = ακέριος αριθμός που καλείται και τάξη ανάκλασης

Στην πραγματικότητα ο νόμος του Bragg αναφέρεται την ενισχυτική και καταστρεπτική συμβολή των κυμάτων όταν πληρούν ή όχι την πιο πάνω συνθήκη, δηλ. όταν η διαφορά διαδρομής των κυμάτων είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος ή όταν η διάφορα φάσης τους είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του 2π θα έχουμε ενισχυτική συμβολή. Η διεπιφανειακή απόσταση d_{hkl} των επιπέδων χαρακτηρίζεται ως μέτρο της ευκρίνειας (διακριτικής ικανότητας) σε ένα πείραμα περίθλασης ακτινών X. Όσο μικρότερη είναι η τιμή της διεπιφανειακής απόστασης τόσο μεγαλύτερη θεωρείται η ευκρίνεια και λεπτομερέστερος ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής.

- *Ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα και η σφαίρα του Ewald*

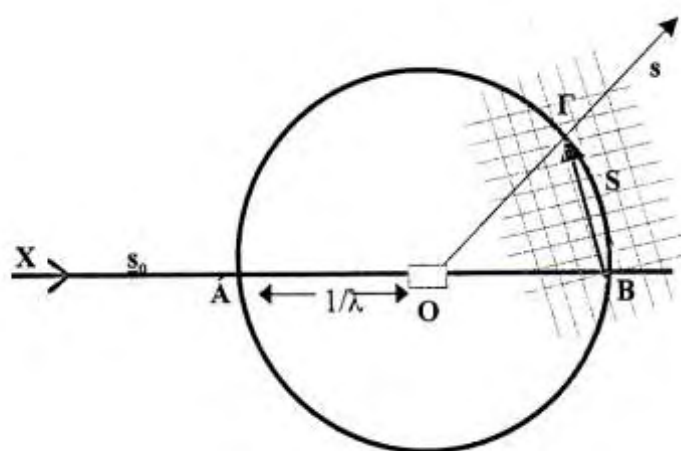
Το περιθλασίγραμμα χαρακτηρίζεται από κηλίδες που έχουν συγκεκριμένη γεωμετρία, συμμετρία και ένταση. Η κάθε κηλίδα χαρακτηρίζεται από τρεις συντεταγμένες που δεν είναι τίποτα άλλο από τους δείκτες Miller που χρησιμοποιήσαμε για να χαρακτηρίσουμε τα παράλληλα κρυσταλλογραφικά επίπεδα. Οι κηλίδες έχουν συντεταγμένες που ανήκουν σε ένα υποθετικό σύστημα συντεταγμένων, το ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα, που βοήθα στον καθορισμό της διεύθυνσης των κυμάτων. Το ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα μπορούμε να το

χαρακτηρίσουμε γεωμετρικά όπως και το πραγματικό. Στην Εικόνα 20 παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά μιας ανάστροφης στοιχειώδους κυψελίδας σύμφωνα με αυτά της πραγματικής.



Εικόνα 20: Γεωμετρικά χαρακτηριστικά ανάστροφης (reciprocal) μοναδιαίας και διαστάσεις σύμφωνα με μια μεγάλη και μια μικρή πραγματική (real) μοναδιαία κυψελίδα [Rhodes].

Το 1921, ο Edwald εισήγαγε για τη περιγραφή του φαινομένου της περίθλασης, τη χρήση μιας γεωμετρικής κατασκευής η οποία απλοποιεί σε μεγάλο ποσοστό την περιγραφή του φαινομένου. Η κατασκευή αυτή συνίσταται από μια σφαίρα με κέντρο, O , τον κρύσταλλο (Εικόνα 21) Στο σημείο B βρίσκεται η αρχή του ανάστροφου πλέγματος όπου η προσπίπτουσα δέσμη ακτινών XAO συναντάει τη σφαίρα. Η συνθήκη για να παριστάνει μια ακτίνα της σφαίρας OG τη διεύθυνση των περιθλώμενων ακτινών X , ικανοποιείται εφόσον το σημείο Γ είναι σημείο του αντίστροφου πλέγματος (h,k,l) . Το διάνυσμα $B\Gamma$ σε αυτή τη περίπτωση είναι το διάνυσμα της σκέδασης S .



Εικόνα 21: Η σφαίρα του Ewald

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, για την παρατήρηση μιας περίθλασης το σημείο hkl του ανάστροφου πλέγματος πρέπει να ανήκει στη σφαίρα ανάκλασης. Αυτό επιτυγχάνεται με περιστροφή του κρυστάλλου.

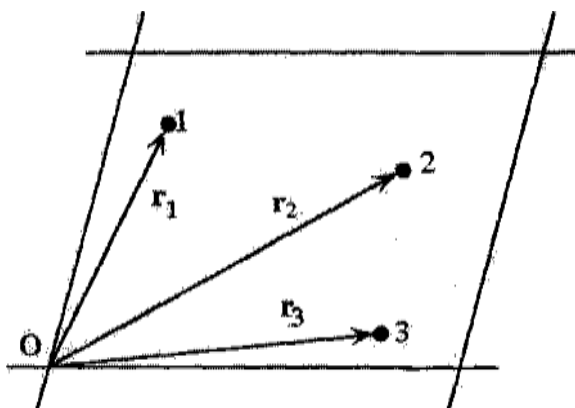
- Σκέδαση από ένα άτομο - Ατομικός παράγοντας σκέδασης (f)

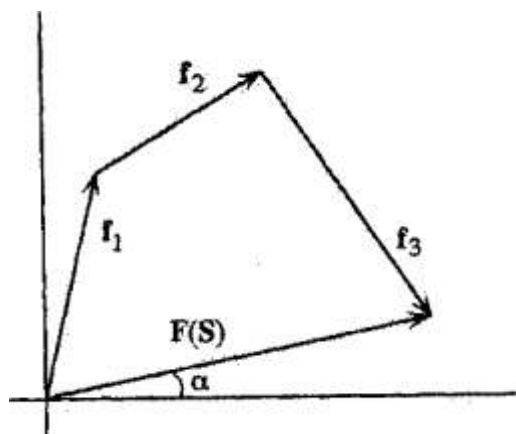
Το ηλεκτρονιακό νέφος ενός ατόμου σκεδάζει τις ακτίνες X , και η σκέδαση εξαρτάται από τον αριθμό των ηλεκτρονίων και τις θέσεις τους στο νέφος. Επεκτείνοντας την θεώρηση για την σκέδαση δυο ηλεκτρονίων ορίζουμε τον ατομικό παράγοντα σκέδασης:

$$f = \int \rho(r) \exp[2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}] dr \quad (1.5),$$

όπου $\rho(r)$ η ηλεκτρονιακή πυκνότητα με διάνυσμα θέσης r από τον πυρήνα. Ο ατομικός παράγοντας εξαρτάται επίσης από τον αριθμό ηλεκτρονίων κάθε ατόμου και εκφράζει την δύναμη σκέδασης κάθε ατόμου. Επίσης, λόγω της σφαιρικής συμμετρίας του ατόμου, είναι ανεξάρτητος της διεύθυνσης του διανύσματος S αλλά εξαρτάται από το μέτρο αυτού (εξίσωση 1.3). Όταν η γωνία σκέδασης είναι μηδέν ($\theta=0$), τότε ο ατομικός παράγοντας σκέδασης ισούται με τον ατομικό αριθμό Z . Καθώς η γωνία αυξάνεται θα αυξάνονται και οι διαφορές των σκεδαζόμενων κυμάτων, όποτε ο ατομικός παράγοντας σκέδασης θα μειώνεται.

- Σκέδαση από μοναδιαία κυψελίδα - Δομικός παράγοντας





Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση μοναδιαίας κυψελίδας με τρία άτομα και δεξιά το διάγραμμα Argand [Dreath, 2002].

Υποθέτουμε ότι στην μοναδιαία κυψελίδα περιέχονται n άτομα (με ατομικό παράγοντα σκέδασης, f_i) σε διάνυσμα θέσης r_i ($i=1,2,3,\dots,n$) με αρχή το σημείο O (Εικόνα 22). Τα άτομα σκεδάζουν σύμφωνα με τον ατομικό παράγοντα σκέδασης, f_i και το άθροισμα των ατομικών παραγόντων μας δίνει το δομικό παράγοντα που φαίνεται στο διάγραμμα του Argand και ορίζεται από τη σχέση:

$$F(S) = \sum_{i=1}^n f_i \exp[2\pi i r_i \cdot S] \quad (1.6)$$

- Υπολογισμός ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $\rho(x \ \psi \ z)$ - Μετασχηματισμός Fourier

Το περιθλασίγραμμα (Εικόνα 17) αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier (forward Fourier transformation) της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, και αντίστροφα, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier (reverse Fourier transformation) του περιθλασιγράμματος. Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας (hkl) είναι ανάλογη του τετράγωνου του πλάτους του δομικού παράγοντα $F(hkl)$ και ο δομικός παράγοντας είναι συνάρτηση των ατομικών δομικών παραγόντων (εξίσωση 1.6). Επειδή η περίθλαση οφείλεται στο ηλεκτρονιακό νέφος κάθε ατόμου, είναι δυνατό να εκφραστεί και ως συνάρτηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας αντί των

διακριτών ηλεκτρονίων του κάθε ατόμου, όποτε

$$F(S) = \int_{\text{cell}} \rho(r) \exp [2\pi i r \cdot S] dv \quad (1.7),$$

όπου $dv=Vdx\psi dz$, και

$r \cdot S = (a \cdot x + b \cdot \psi + c \cdot z) \cdot S = a \cdot S \cdot x + b \cdot S \cdot \psi + c \cdot S \cdot z = h \cdot x + k \cdot \psi + l \cdot z$. Συνεπώς, ο $F(S)$ μπορεί να γραφεί και ως:

$$F(h \ k \ l) = V \int_{x=0}^1 \int_{\psi=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(x\psi z) \exp[2\pi i(h \cdot x + k \cdot \psi + l \cdot z)] dx d\psi dz \quad (1.8)$$

Φυσικά αυτό που χρειαζόμαστε στην κρυσταλλογραφία ακτίνων X δεν είναι το περιθλασίγραμμα αλλά η ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Οπότε χρησιμοποιώντας τον μετασχηματισμό Fourier, ($F = |F| \exp[i\alpha]$)

$$\rho(x \ \psi \ z) = 1/V \cdot \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp[-2\pi i (hx + k\psi + lz) + i\alpha(hkl)] \quad (1.9)$$

Παρόλο που το μέτρο του δομικού παράγοντα μπορεί να προκύψει από τις εντάσεις $I(hkl) = |F(hkl)|^2$, οι φάσεις $\alpha(hkl)$ δεν μπορούν να προκύψουν κατευθείαν από το περιθλασίγραμμα (γνωστό ως «πρόβλημα των φάσεων» που αντιμετωπίζεται με μια σειρά μεθόδων, άμεσων ή έμμεσων [Taylor, 2003]). Σε περίπτωση που τμήμα ενός μορίου μιας άλλης δομής υπάρχει στην υπό μελέτη δομή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το μοντέλο αυτό έτσι ώστε να ληφθούν οι απύουσες φάσεις. Το μοντέλο στρέφεται και μεταφέρεται στον χώρο έτσι ώστε τα μέτρα των δομικών παραγόντων $|F_c(hkl)|$, να πλησιάζουν αυτά των πειραματικών $|F_0(hkl)|$. Η μέθοδος αυτή καλείται μοριακή

αντικατάσταση. Μέτρο σύγκρισης της ταύτισης του μοντέλου με τα πειραματικά αποτελέσματα αποτελεί ο κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας που ορίζεται ως:

$$R = \frac{\sum_{hkl} (|F_o(hkl)| - |F_c(hkl)|)}{\sum_{hkl} (|F_o(hkl)|)} \quad (1.10),$$

όπου ειδικά για την κρυσταλλογραφία μακρομορίων ένα μοντέλο με δείκτη αξιοπιστίας $R=0.2-0.3$ είναι αξιόπιστο. Επίσης, ένας άλλος δείκτης της ποιότητας του μοντέλου (πιο αξιόπιστος σε σύγκριση με τον πιο πάνω) αποτελεί ο R_{free} που αντιστοιχεί στον κρυσταλλογραφικό δείκτη αξιοπιστίας R για ένα 5% ανακλάσεων που δεν έχουν συμπεριληφθεί στη βελτιστοποίηση.

4.5.6 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου [Dreath, 2002]

Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου είναι η διαδικασία προσαρμογής του μοντέλου (δηλ. των συντεταγμένων x, y, z για κάθε άτομο της ασύμμετρης μονάδας) έτσι ώστε οι πειραματικοί και οι υπολογιζόμενοι (χρησιμοποιώντας το μοντέλο) δομικοί παράγοντες να βρίσκονται σε όσο καλύτερη συμφωνία γίνεται. Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας, R , και ο R_{free} αποτελούν κριτήρια της συμφωνίας αυτής. Η προσαρμογή του μοντέλου περιλαμβάνει την αλλαγή στις θέσεις των ατόμων και των παραγόντων θερμοκρασίας για όλα τα άτομα της δομής εκτός από τα υδρογόνα. Επειδή τα υδρογόνα έχουν μόνο ένα ηλεκτρόνιο, η επίδραση τους στην σκέδαση είναι πολύ μικρή γι' αυτό και συνήθως δεν λαμβάνονται υπόψη κατά τον προσδιορισμό της δομής.

Εδώ να αναφερθεί ότι θερμικός παράγοντας (B , temperature factor ή παράγοντας Debye-Waller) αποτελεί μέτρο της δόνησης των ατόμων και επηρεάζει το μέγεθος του νέφους ηλεκτρονιακής πυκνότητας γύρω από κάθε πυρήνα ατόμου λόγω της επίδρασης του στον ατομικό παράγοντα σκέδασης. Ορίζεται ως:

$$B = 8\pi^2 \langle u^2 \rangle \quad (1.11),$$

όπου $\langle u^2 \rangle$ αντιστοιχεί στο τετράγωνο της μέσης τιμής του εύρους δόνησης, όταν υποθέσουμε ότι έχουμε ισότροπη και αρμονική δόνηση ατόμων (π.χ. για $B=30\text{Å}^2$, $\langle u^2 \rangle = \sqrt{30/8\pi^2} = 0.62\text{Å}$, δίνει μια αίσθηση της δόνησης των ατόμων). Στην περίπτωση προσδιορισμού δομής πρωτεϊνών είναι σύνηθες να δουλεύουμε με ισότροπους θερμικούς παράγοντες για το κάθε άτομο λόγω της μικρής ευκρίνειας των αποτελεσμάτων. Υπάρχουν τέσσερις παράμετροι που πρέπει να προσδιορισθούν για κάθε άτομο: x , ψ , z και B . Μια πρωτεΐνη με 2000 άτομα στην ασύμμετρη μονάδα έχει 8000 παραμέτρους άγνωστους που πρέπει να προσδιοριστούν. Σ' αυτή την περίπτωση για την απόδοση μια αξιόπιστης δομής πρέπει τα δεδομένα (εντάσεις ανακλάσεων) να είναι περίπου ίσα με τον αριθμό των παραμέτρων. Επίσης μια μέση τιμή B για μια πρωτεΐνη που κυμαίνεται από μερικά Å^2 μέχρι 30Å^2 αποτελεί μια καλά οργανωμένη δομή.

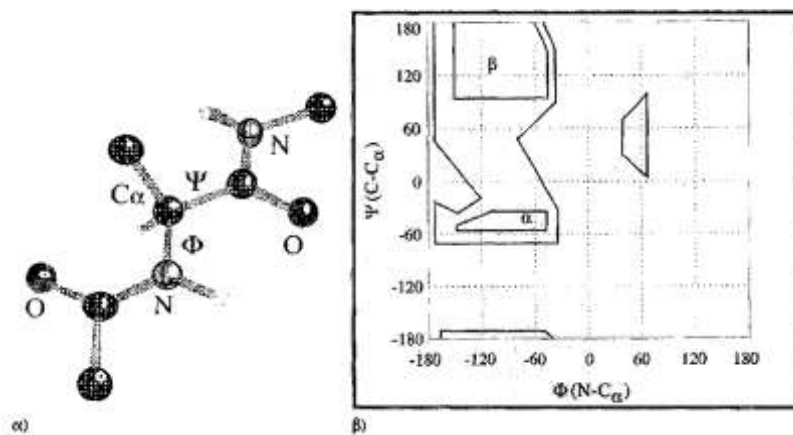
4.5.7 Έλεγχος του δομικού μοντέλου

Μετά την βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου, είναι απαραίτητος ο έλεγχος αυτού έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η εκτίμηση μπορεί να γίνει με προσεκτικό έλεγχο του μοντέλου και της ηλεκτρονιακής πυκνότητάς του αλλά και την εξαγωγή διαφόρων στατιστικών παραμέτρων και διαγραμμάτων που βοηθούν στην αξιολόγηση του μοντέλου. Εκτός από την ορθότητα της ερμηνείας της ηλεκτρονιακής πυκνότητας πρέπει τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του μοντέλου (γωνίες, μήκη δεσμών) να μην αποκλίνουν από αυτές των μικρών μορίων αλλά και αυτές των βάσεων δεδομένων, όπως επίσης και τα στερεοχημικά χαρακτηριστικά του να είναι ελεγμένα (πεπτιδικοί δεσμοί, διέδρες γωνίες πλευρικών ομάδων και στερεοχημική παρεμπόδιση) [Τσιτσάνου, 2001].

Διάγραμμα Ramachandran

Η στερεοχημεία της κύριας αλυσίδας πρωτεϊνικού μορίου μπορεί να διερευνηθεί με το διάγραμμα Ramachandran, στο οποίο οι διέδρες γωνίες ϕ και ψ για κάθε κατάλοιπο καταχωρούνται σε διάγραμμα όπως αυτό που φαίνεται στο Σχήμα β. Ο

G.N. Ramachandran παρατήρησε ότι τα αμινοξέα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν μπορούν να έχουν οποιοδήποτε ζεύγος ϕ και ψ . Μερικοί συνδυασμοί δεν είναι δυνατοί λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Στην περίπτωση που εξαχθεί το διάγραμμα για κάποιο μοντέλο πρέπει όλα τα κατάλοιπα να βρίσκονται σε περιοχές που είναι επιτρεπτές, διαφορετικά το μοντέλο πρέπει να επανεξεταστεί για τα κατάλοιπα που παρουσιάζουν λάθος στερεοχημεία.



Εικόνα 23: α) Ορισμός των ϕ (C α -N) και ψ (C α -C) διεδρων γωνιών και β) το διάγραμμα Ramachandran για κατάλοιπα εκτός γλυκίνης (περιοχή χωρίς γράμμα) ενώ η περιοχή α: δεξιόστροφη α -έλικα και η περιοχή β: αντιπαράλληλη-παράλληλη πτυχωτή επιφάνεια [Rhodes].

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer & Krebs (1962), με μικρές μόνο τροποποιήσεις (χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) [Melpidou and Oikonomakos, 1983].

Υλικά:

- Κουνέλια (2 μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃),
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO₃ και 10mM EDTA στους 100°C και συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους)

Όργανα:

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

Πορεία:

Βήμα 1^ο: Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από 2 κουνέλια. Οι μυς αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2^ο: Οξινή καταβύθιση άλλων ενζύμων

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH_3COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κεκορεσμένο KHCO_3 και ογκομέτρηση του διαλύματος.

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειϊκό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια

το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5500rpm για 30min στους 0-4°C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH7.0 όγκου ίσο με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1M pH7.0 ίσο με το 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά από επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH₃COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετράται.

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1mL AMP 0.1M (pH 7.0) και (CH₃COO)₂Mg 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, (το AMP και το (CH₃COO)₂Mg διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστο 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH₃COO)₂Mg, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση

γίνεται απουσία AMP.

Βήμα 6^ο: Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20 °C.

2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου. Ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen_(n)**, προς **Glycogen_(n-1)** και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**.



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, δηλαδή μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Πορεία:

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται και λαμβάνεται το εναιώρημα ενζύμου περιεκτικότητας ~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25 μg ενζύμου/ mL , γλυκογόνο 0.2 % (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου 5% (v/v). Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται επίσης το υπόστρωμα για $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ 2.0mM με προσθήκη 200 μL υποστρώματος $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ 9.0mM, 20 μL AMP 45mM και 500 μL H_2O (κατάλληλο

για τέσσερα δείγματα).

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση στους 30°C επί 15 λεπτά και το υπόστρωμα επί 5 λεπτά. Μετά την επώαση, 180μL από το ενζυμικό μείγμα προστίθενται στον σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε: 5.0μg ένζυμου ανά mL, 1.0mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υπόστρωμα α-D- Glc-1-P 2.0mM, 50mM υδροχλωρικής τριαιθανολαμίνης, 100mM KCl και 1mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονται δείγματα των 200μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50μL SDS 1.0% (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται). Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της παρουσίας φωσφορικών).

2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α-D- Glc-1-P).

Πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 5% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D- Glc-1-P 1.0 έως 20mM, με προσθήκη 200μL από το αντίστοιχο υπόστρωμα α-D- Glc-1-P, 20μL AMP 45mM και 500μL H₂O.

Το ενζυμικό μείγμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C επί 15 λεπτά και τα υποστρώματα επί 5 λεπτά. Στη συνέχεια, για την εκκίνηση της αντίδρασης σε όλους τους σωλήνες των υποστρωμάτων σταδιακά προστίθενται 180λ ενζυμικού μίγματος. Στις συνθήκες αυτές, στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, έχουμε: 5.0μg ένζυμο/mL, AMP 1.0mM, γλυκογόνο 1%, υπόστρωμα α-D- Glc-1-P 1.0-20mM, 50

mM υδροχλωρικής τρις-αιθανολαμίνης, 100 mM KCl και 1 mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1,2,3,4) λαμβάνονται δείγματα των 200μL από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50μL SDS 1.0% .

Στα δείγματα γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών).

2.3 Προσδιορισμός IC₅₀ αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής (Segel, 1975).

Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου δρουν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή (fully competitive inhibition), αφού η σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος και κατ' επέκταση τη δράση του ενζύμου. Σύμφωνα με το μοντέλο της πλήρους συναγωνιστικής αναστολής, ο αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου «μιμούμενος» το υπόστρωμα και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Η σταθερά IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του IC₅₀ και για συγκεκριμένη συγκέντρωση G1P (1-φωσφορικής γλυκόζης).

Υλικά :

- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (α-D- Glc-1-P) 18mM

- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50mM β-φωσφογλυκερόλης (β-GP), 50mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA)
- Γλυκογόνο 1 % (w/v)
- Διάλυμα SDS 1%
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8
- Διάλυμα του αναστολέα

Όργανα:

- Υδατόλουτρο (ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία στους 30° C.)
- Φασματοφωτόμετρο
- Δοκιμαστικούς σωλήνες
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Συσκευή vortex
- pHμετρο
- Χρονόμετρο

Πορεία :

2.3.1 Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε γλυκερόλη παίρνουμε 10μl και το αραιώνουμε με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκεντρώσεως της GPb, με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1cm.

Εν συνεχεία παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα το οποίο περιέχει 25μg/mL GPb, γλυκογόνο 5% w/v, και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 v/v, έτσι ώστε με την προσθήκη του διαλύματος με το υπόστρωμα η αντίδραση να λαμβάνει χώρα στις εξής συνθήκες: ένζυμο 5.0 μg/ mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2 % w/v και υπόστρωμα α-D-

Glc-1-P σταθερής συγκέντρωσης και αναστολέα μεταβαλλόμενης. Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση 15 min σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 30°C.

2.3.2 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC₅₀, και σταθερή συγκέντρωση α-D- Glc-1-P 18mM και AMP 50mM ώστε μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180μl) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P να είναι 4 mM και της AMP 1mM. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720 μL. Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D- Glc-1-P (18mM)	200 μL	200 μL
AMP (50mM)	18 μL	18 μL
Αναστολέας	-	X μL
H ₂ O	502 μL	720-(200+18+X) μL
Τελικός όγκος	720 μL	720 μL

Τα διαλύματα υποστρώματος τοποθετούνται πριν την εκτέλεση του πειράματος στο υδατόλουτρο ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ενζυμικό διάλυμα.

2.3.3 Εκτέλεση του πειράματος

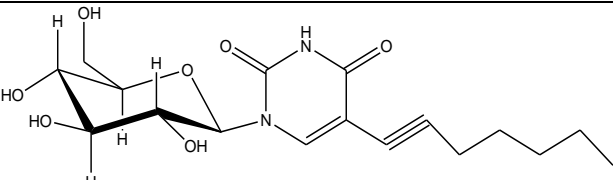
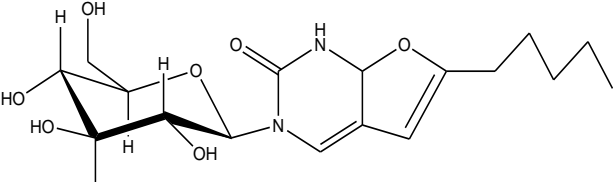
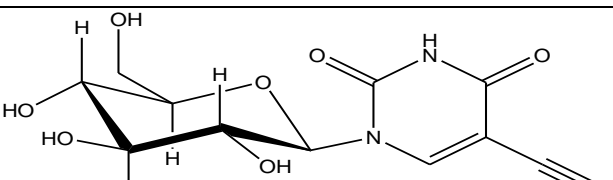
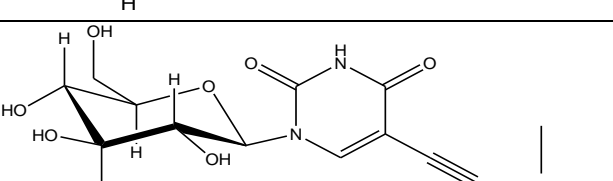
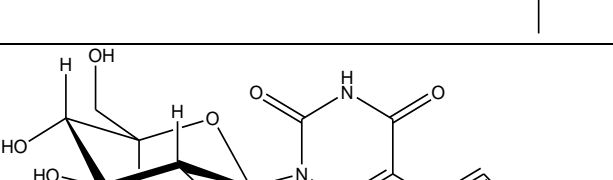
Μετά την επώαση, του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 180μl από το ενζυμικό μίγμα στον χρόνο 0 σε κάθε διάλυμα υποστρώματος όγκου 720 μL, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ακολουθώς, ανά 1 λεπτό (σε χρόνους 1, 2, 3, 4), από λαμβάνονται 200 μL και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1%. Έτσι σταματά η ενζυμική αντίδραση, αφού παρουσία του απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μια διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα.

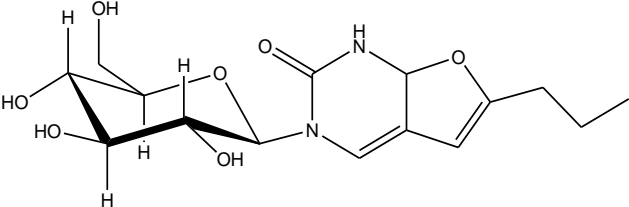
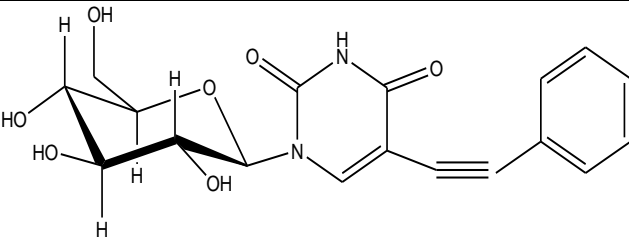
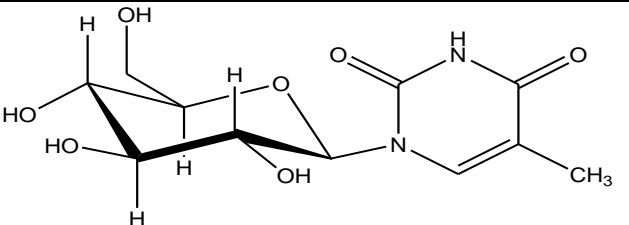
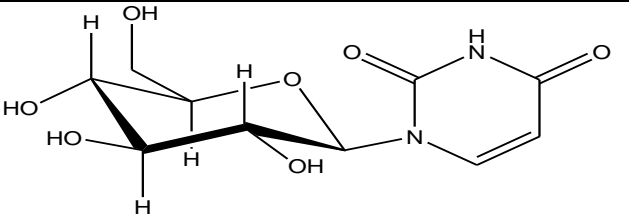
Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 2.5 ml διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου (βλ. Πειραματικό μέρος §2.4) σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15min και ακολουθεί φωτομέτρηση τους σε μήκος κύματος 850nm. Από τα

αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των Ρi που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit (βλ. Πειραματικό μέρος §2.6), προκειμένου να προσδιοριστεί η IC₅₀. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά α-D- Glc-1-P, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της, αλλά και του ενζυμικού διαλύματος, λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.

Ακολουθεί η λίστα με τους αναστολείς (με την ονομασία DK) που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και περιγραφή των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν των για τον προσδιορισμό της IC₅₀. Οι συνθήκες κάθε σειράς πειραμάτων ήταν :

- α-D- Glc-1-P: 4mM
- AMP: 1mM
- Γλυκογόνο: 0,2% w/v

Όνομα	Ένωση	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν
DK10		0,5mM, 1mM, 1,75mM, 2mM, 2,5 mM
DK11		0.3mM, 0.4mM, 0.5mM, 0.7mM, 1mM
DK12		4μM, 12μM, 15 μM, 18μM, 20 μM
DK13		0.3mM, 0.5mM, 0.8mM, 1mM, 1.2mM, 1.5mM
DK15		0,3mM, 0.5mM, 0.8mM, 1 mM

DK16		0.05mM, 0.16mM, 0.25mM, 0.5 mM
DK17		0.05 mM, 0.5mM, 1 mM
DK18		4μM, 6μM, 10μM, 20μM, 30μM, 40μM, 50μM
DK19		10μM, 20μM, 30μM, 40μM, 50μM

Πίνακας 3 : Λίστα αναστολέων και συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν στα κινητικά πειράματα

2.4 Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστηριότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου. Η χρησιμότητα του προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου οδήγησε σε μια συνεχή τροποποίηση και βελτιστοποίηση της αρχικής μεθόδου που προτάθηκε από τους Fiske και Subbarow (1925).

Μέθοδος ασκορβικού οξέος [Saheki et al, 1985]

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε

ορθοφωσφορικά ιόντα πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.4 μM προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Υλικά:

- Διάλυμα μολυβδαινίου, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με αμιζών HCl 1N.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N. Ανάμιξη 4:1 όγκους αντιδραστήριου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος.

Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από 15 min μετά την παρασκευή του και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

Πορεία:

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2.5mL από το αντιδραστήριο χρώσης. Μετά από ισχυρή ανάμιξη οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850nm. Επίσης γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών.

2.5 Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC_{50} βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb. Γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να διορθωθούν οι απορροφήσεις λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά :

- Τυφλό νερού για την ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της.
- Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.
- Παρασκευάζονται από δυο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός του νερού, και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους. Επίσης, παρασκευάζεται γνωστό πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε μmol Pi.

2.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της α-D- Glc-1-P και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό μείγμα) μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten, $v=V_{max}[S]/K_m + [S]$ (οπού v : ταχύτητα, V_{max} : μέγιστη ταχύτητα, $[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος, K_m : σταθερά Michaelis-Menten). Γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{max} .

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα.

3. Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι θα πρέπει στο διάλυμα του ενζύμου να μην υπάρχει AMP. Για τον λόγο αυτό ακολουθείται διαδικασία για την απομάκρυνση του.

Το διάλυμα του ενζύμου υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM BES (pH 6.7) για 16h. Στη συνέχεια πραγματοποιείται κατεργασία με ενεργό ζωάνθρακα

ώστε να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, μετρείται η οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος 280nm 260nm. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων (A_{260}/A_{280}) πρέπει να είναι ~ 0.53 .

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Έτσι δίδεται χρόνος στην πρωτεΐνη να οργανωθεί σε κρυστάλλους και όχι σε άμορφο ίζημα. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T state) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο batch [Oikonomakos et al, 1985]. Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων GPb (T state), η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου P43212) εντός γυάλινων σωλήνων.

ΥΛΙΚΑ:

- Ρυθμιστικό διάλυμα BES, σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθανίου(10mM BES, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT pH 6.7)
- Διάλυμα DTT 200mM, pH 6.7
- Διάλυμα σπερμίνης 200mM, pH 6.7
- Πυρήνες κρυστάλλωσης
- Εναιώρημα GPb περιεκτικότητας 20-30 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα BES.
- Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3 nm και μήκους 3 cm

ΟΡΓΑΝΑ:

- Φασματοφωτόμετρο UV

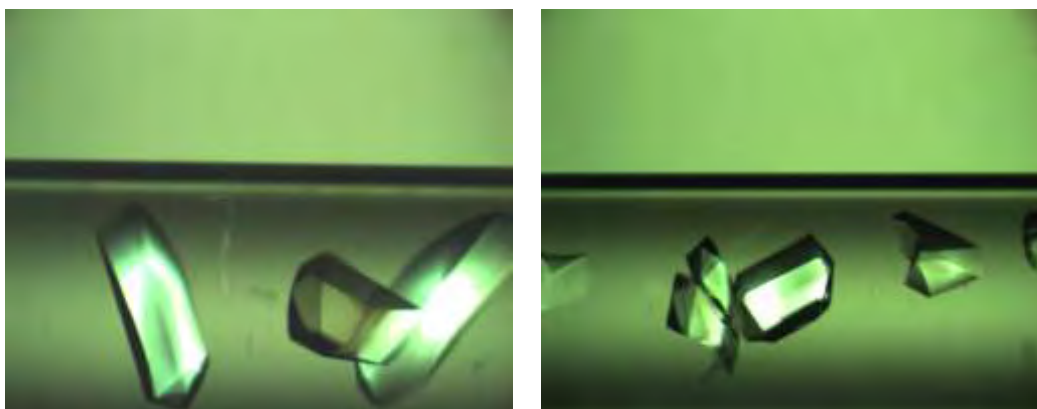
Πορεία

Για την ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων (ομάδας συμμετρίας χώρου P4₃2₁2) της GP χρησιμοποιείται η στατική μέθοδος (batch method). Το ένζυμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από AMP ($A_{260}/A_{280} = 0.53-0.54$). Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του

διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε μικρούς σωλήνες μήκους περίπου 3 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3 mm, των οποίων τα δύο άκρα κλείνονται με parafilm.

Οι κρύσταλλοι της φυσικής T διαμόρφωσης της GPb αναπτύσσονται από μίγμα 20-30 mg/ml καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 10 mM BES/HCl (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN₃ στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραιώσης (Oikonomakos *et al.*, 1985). Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 h, ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας των κρυστάλλων είναι $a=b=128.6 \text{ \AA}$, $c=116.1 \text{ \AA}$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι ισόμορφοι με τους κρυστάλλους που αναπτύσσονται παρουσία οξικού μαγνησίου αντί σπερμίνης. Συνήθως το μέγεθος αυτών είναι 0.2-0.5mm, κατάλληλο για την περαιτέρω χρήση αυτών σε πειράματα περίθλαση ακτινών X. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι: $I = I_0 * e^{-\mu t}$



Εικόνα 24: Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της GPb στην T διαμόρφωση.

4. Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου- αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη.

ΥΛΙΚΑ:

- Διάλυμα αναστολέα
- Κρύσταλλοι GPb
- Ρυθμιστικό διάλυμα BES (10mM BES, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT pH 6.7)
- Τριχοειδείς σωλήνες (διαμέτρου 1.0, 2.0 mm)
- Κερί
- Σύριγγες

ΟΡΓΑΝΑ:

- Στερεοσκόπιο
- Πιπέτες Pasteur

Η κρυσταλλογραφική μελέτη των εν δυνάμει αναστολέων έχει σαν σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου δράσης των ενώσεων που υπέδειξαν τα κινητικά πειράματα.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο- αναστολέας πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της συγκρυστάλλωσης είτε με τη μέθοδο του εμποτισμού προσχηματισμένων κρυστάλλων του ενζύμου με διάλυμα αναστολέα, όπου η ουσία διαχέεται εντός των καναλιών του κρυστάλλου και συνδέεται στην πρωτεΐνη, στο κέντρο σύνδεσης για το οποίο παρουσιάζει συγγένεια. Στην περίπτωση όπου το σύμπλοκο σχηματίζεται με τη μέθοδο του εμποτισμού ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες θα γίνει η συλλογή δεδομένων (κρυογενείς συνθήκες ή σε θερμοκρασία δωματίου) ακολουθείται διαφορετική διαδικασία. Οι κρύσταλλοι αρχικά μεταφέρονται σε διάλυμα BES εντός τριβλίου Petri. Στη συνέχεια, επιλέγονται μεμονωμένοι κρύσταλλοι οι οποίοι δεν φέρουν ορατές προσμίξεις ή άλλες εναποθέσεις μικροκρυστάλλων στην επιφάνειά τους οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή δεδομένων.

Στην περίπτωση συλλογής σε θερμοκρασία δωματίου οι κρύσταλλοι μεταφέρονται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur μέσα σε μικρούς τριχοειδείς σωλήνες και

το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο τον περιβάλλει απομακρύνεται με χρήση μικρών λωρίδων απορροφητικού χαρτιού για να αντικατασταθεί από το διάλυμα του αναστολέα που θα μελετηθεί. Το διάλυμα του αναστολέα προστίθεται στον σωλήνα και αφήνεται για ικανό χρονικό διάστημα ώστε να εμποτίσει τον κρύσταλλο (π.χ. ~2-3 hrs). Στη συνέχεια το διάλυμα απομακρύνεται από το σωλήνα και στα δύο του άκρα τοποθετείται μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος BES (για την αποφυγή αφυδάτωσης του κρυστάλλου). Τέλος ο τριχοειδής σωλήνας σφραγίζεται και στα δύο του άκρα με τη χρήση μικρής ποσότητας κεριού και τοποθετείται στο γωνιόμετρο για την έκθεση του στη δέσμη ακτίνων X.

5. Έκθεση πρωτεϊνικού μονοκρυστάλλου σε ακτίνες X

Η έκθεση μονοκρυστάλλου πρωτεΐνης σε ακτίνες X έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων των ατόμων, που αποτελούν την πρωτεΐνη, με την ακτινοβολία και την ελευθέρωση δευτερογενούς ακτινοβολίας. Η ένταση της περιθλώμενης αυτής ακτινοβολίας μπορεί να μετρηθεί με ειδικούς ανιχνευτές και να γίνει συλλογή περιθλασιγραμμάτων. Τα περιθλασιγράμματα αυτά αποτελούν τα πειραματικά δεδομένα, από τα οποία, μετά από κατάλληλη επεξεργασία και συγχώνευσή αυτών με ειδικό λογισμικό για κρυσταλλογραφικές μελέτες, υπολογίζεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου.

Υλικά:

- Μονοκρύσταλλος

Όργανα:

- Πηγή ακτίνων X (X-ray tubes CuK α , $\lambda=1,54184\text{\AA}$, συγχροτρονική ακτινοβολία)
- Ανιχνευτής πεδιάς
- Γωνιόμετρο

Πορεία:

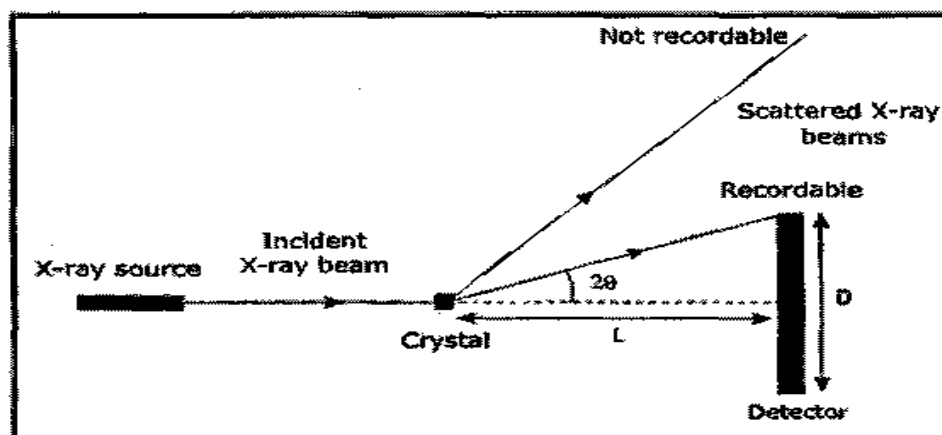
Ο κρύσταλλος που βρίσκεται στον τριχοειδή σωλήνα τοποθετείται στο γωνιόμετρο και στη συνέχεια το όλο σύστημα τοποθετείται στην κατάλληλη υποδοχή

ανάμεσα στον ανιχνευτή και την έξοδο της ακτινοβολίας. Ο κρύσταλλος ευθυγραμμίζεται ως προς την διεύθυνση της δέσμης της ακτινοβολίας με ρυθμίσεις του γωνιομέτρου.



Εικόνα 25: Τριχοειδής σωλήνας τοποθετημένος στο γωνιόμετρο.

Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού καταχωρούνται όλα τα χαρακτηριστικά του πειράματος: μήκος κύματος ακτινοβολίας (λ), απόσταση ανιχνευτή-κρυστάλλου (d), χρόνος έκθεσης (t), γωνία περιστροφής και αριθμός εικόνων. Ο καθορισμός της απόστασης κρυστάλλου-ανιχνευτή γίνεται σύμφωνα με το νόμο του Bragg και δεδομένων της διαμέτρου του ανιχνευτή, του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της επιθυμητής μέγιστης ευκρίνειας. Στο Σχήμα 25 παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της διάταξης του πειράματος περίθλασης ακτινών X.



Εικόνα 26: Γεωμετρικά χαρακτηριστικά πειραματικής διάταξης περίθλασης ακτινών X. Η πηγή ακτινών X εκπέμπει ακτινοβολία η οποία και προσπίπτει στον κρύσταλλο.

Σύμφωνα με το νόμο του Bragg, η ακτινοβολία περιθλάται υπό γωνία 2θ και μετράται από ανιχνευτή που βρίσκεται σε απόσταση L από το κρύσταλλο. Σύμφωνα με τη διάταξη γίνεται καταγραφή μόνο των ανακλάσεων που πληρούν τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του τριγώνου: κρύσταλλος-κέντρο ανιχνευτή-άκρο ανιχνευτή. Από τον νόμο του Bragg καθορίζεται η γωνία θ (2θ αποτελεί η γωνία μεταξύ του επιπέδου διάδοσης της ακτίνας και της ανακλώμενης ακτίνας), από τη διάταξη η απόσταση L , έτσι ώστε να έχουμε την επιθυμητή ευκρίνεια [Rhodes, 1993].

Στη συνέχεια ακολουθεί η έκθεση του κρυστάλλου και η λήψη των περιθλασιγραμμάτων. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο Max-Lab του Lund University στην Σουηδία, στο σταθμό I911-2 με την χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας. Ταυτόχρονα γίνεται και η αρχική επεξεργασία τους με το πρόγραμμα HKL, όπου η κάθε εικόνα επεξεργάζεται ξεχωριστά (ταξινόμηση κηλίδων) και στη συνέχεια οι εικόνες συγχωνεύονται. Η συγχώνευση μας δίνει την πληρότητα αλλά και τη ποιότητα των δεδομένων.

6. Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων αποτελεί κυρίως τον υπολογισμό των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $2Fo-Fc$, $Fo-Fc$ (Fo : ηλεκτρονιακή πυκνότητα που προκύπτει από πειραματικούς δομικούς παράγοντες, Fc : ηλεκτρονιακή πυκνότητα που προκύπτει από θεωρητικούς δομικούς παράγοντες του μοντέλου), την βελτιστοποίηση του αρχικού μοντέλου της δομής της πρωτεΐνης με κύκλους βελτιστοποίησης (ακολουθώντας το πρωτόκολλο που υπαγορεύεται από το REFMAC) (CCP4, 1994).

7.Κρυσταλλογραφική μελέτη της ένωσης DK12.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφική μελέτη της σύνδεσης στη φωσφορυλάση b της ένωσης DK12. Τα επί μέρους στάδια της μελέτης είναι τα εξής:

Εμποτισμός μονοκρυστάλλου GPb (διαμόρφωση T) με διάλυμα του αναστολέα και συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων X

Κρύσταλλος φωσφορυλάσης γλυκογόνου b, που είχε αναπτυχθεί με τη μέθοδο batch (βλ. Πειραματικό μέρος, §3) εμβαπτίστηκε (βλ. Πειραματικό μέρος, §4) σε διάλυμα αναστολέα που είχε αραιωθεί σε τελική συγκέντρωση 50mM με 10 mM BES pH 6.8 και έπειτα επώαστηκε για 24h. Ακολούθησε η τοποθέτηση του κρυστάλλου στη διάταξη του σχήματος 16 με τέτοιο τρόπο ώστε κατά την περιστροφή του να παραμένει στη δέσμη της ακτινοβολίας.

Βελτιστοποίηση του μοντέλου

Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο τη δομή της T διαμόρφωσης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου όπως παρουσιάζεται στο σύμπλοκο του ενζύμου με την α-D-γλυκόζη με τη βοήθεια του προγράμματος REFMAC (CCP4, 1994). Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται είναι οι ατομικές συντεταγμένες, οι συντελεστές θερμοκρασίας και οι συντελεστές κατάληψης (occupancies). Οι στερεοχημικοί περιορισμοί που λαμβάνονται υπόψη για την ελαχιστοποίηση της τιμής της ελεύθερης ενέργειας αυξάνουν το λόγο των παρατηρήσεων προς τον αριθμό των παραμέτρων. Τα επιπρόσθετα αυτά δεδομένα προέρχονται από τη γνώση της στερεοχημείας των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα τα μήκη και οι γωνίες των δεσμών μεταξύ των ατόμων, πληροφορίες που είναι γνωστές από τις ακριβείς δομές των αμινοξέων.

Ένα μέρος των δεδομένων περίθλασης (5-10%) επιλέγεται τυχαία πριν από τη διαδικασία βελτιστοποίησης με σκοπό να υπολογιστεί ο αρχικός δείκτης αξιοπιστίας R, ο οποίος στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητο κριτήριο της προόδου της βελτιστοποίησης (Brunger, 1992).

Στατιστικά στοιχεία συλλογής κρυσταλλογραφικών δεδομένων του συμπλόκου GPb- DK12	
Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης διαποτίζονται με διάλυμα 25mM DK2 για 20h
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας MAX-Lab, Lund, Σουηδία	ID911-2

Μήκος κύματος, λ (Å)	1.03954
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.8
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων	65
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 ₃ 2 ₁ 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας a, b, c (Å)	128.9, 128.9, 116.7
Αριθμός μορίων/Ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	99 – 2.0
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	475554
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (Εξώτ. στοιβάδα)	58367 (1642)
R_{merge} (Εξωτερική στοιβάδα)*	0.071 (0.329)
Πληρότητα (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	87.6 (50.2)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.03 – 2.00
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ (Εξωτερική στοιβάδα)**	10.9 (2.7)
Πολλαπλότητα (Εξωτερική στοιβάδα)	3.6 (2.0)
Τιμή συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Wilson plot)	27.5

*Ο συντελεστής R_{merge} ορίζεται ως $R_m = \sum_i \sum_h |I_h - I_{ih}| / \sum_i \sum_h I_{ih}$, όπου (I_h) και I_{ih} είναι η μέση και η i -οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h , αντίστοιχα R_{iso} είναι η μέση κλασματική ισόμορφος διαφορά των ευρών των δομικών παραγόντων από τη φυσική GPb, T διαμόρφωσης.

** $\sigma(I)$ είναι η τυπική απόκλιση του I .

Ακολούθησαν πολλαπλοί κύκλοι διόρθωσης του μοντέλου με το πρόγραμμα COOT [Paul Emsley & Kevin Cowtan, 2004] και βελτιστοποίησης με το REFMAC. Τα μόρια του ύδατος προστέθηκαν στο μοντέλο εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπιζόνταν στον ηλεκτρονιακό χάρτη 2Fo-Fc με σ 1.0. Τα μόρια των αναστολέων συμπεριλήφθηκαν επίσης στα τελικά στάδια της διαδικασίας της βελτιστοποίησης (refinement) και τα αρχικά τους μοντέλα

προήλθαν από την βιβλιοθήκη του COOT. Τέλος, η βελτιστοποίηση των ιστροπικών παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων βελτίωσε αισθητά το τελικό μοντέλο.

Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας διαφοράς Fo-Fc και 2Fo-Fc, στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης έδειξε πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου που υποδήλωνε χωρίς αμφιβολία τη σύνδεση της ένωσης DK12 σε αυτό. Ακολούθησε διαδοχική βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στους νέους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, διεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πακέτο προγραμμάτων CCP4. Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση ατομικών συντεταγμένων (positional refinement) και ακολούθησε βελτιστοποίηση του ατομικού ιστροπικού συντελεστή θερμοκρασίας B (B factor). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας Fo-Fc και 2Fo-Fc. Το τελικό μοντέλο περιείχε τα αμινοξέα 12-836, 146 μόρια ύδατος, τον αναστολέα και την φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Οι δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Παρουσίαση στατιστικών χαρακτηριστικών του τελικού μοντέλου GPb-DK12	
Βελτιστοποίηση (Ευκρίνεια) (Å)	86.5 - 2.0
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (παραλείπονται) κατά την βελτιστοποίηση [#]	55243 (2357)
Αμινοξέα που περιελήφθησαν	(12-254) (261-314) (324-836)
Αριθμός πρωτεϊνικών ατόμων	6591
Αριθμός μορίων ύδατος	146
Αριθμός ατόμων υποκαταστατών	21 άτομα (DK12) 24 άτομα (PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R (R _{free})* (%)	16.977 (21.491)
R (R _{free}) (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	21.5 (28.5)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) του μήκους δεσμών (Å)	0.023
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) της γωνίας των δεσμών (°)	1.884
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Πρωτεϊνικά άτομα)	
Όλα τα άτομα	32.4
Ca, C, N, O	30.3
Πλευρική αλυσίδα	34.4
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (ετεροάτομα)	
DK12	20.7
Μόρια ύδατος	29.2

* Ο δείκτης αξιοπιστίας R ορίζεται ως $R = \frac{\sum |F_o| - |F_c|}{\sum F_o}$, όπου F_o και $|F_c|$ είναι τα παρατηρούμενα και τα υπολογιζόμενα εύρη των δομικών παραγόντων, αντίστοιχα.

Ποσοστό 5% επί του συνόλου των περιθλάσεων που χρησιμοποιείται κατά τη βελτιστοποίηση. Χρησιμεύει για την πιστοποίηση της ορθής εξέλιξης της βελτιστοποίησης.

Η δομή του συμπλόκου GPb – DK12 χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των εν δυνάμει δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων van der Waals που μπορεί να σχηματίζει ο αναστολέας με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο προγραμμάτων CCP4 με όριο απόστασης 3.3Å για τους δεσμούς υδρογόνου και 4.0Å για τις αλληλεπιδράσεις van der Waals. Τέλος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα γραφικών Rymol για την μοριακή απεικόνιση τρισδιάστατων μακρομοριακών μορίων.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η αύξηση αριθμού των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με στόχο το σχεδιασμό νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα αυτά έχουν στόχο ένζυμα και υποδοχείς που συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και αποσκοπούν σε μία πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 [Kurukulasuriya et al, 2003].

Το ήπαρ είναι ένα όργανο που έχει ως σκοπό να αποκαθιστά της ενεργειακές ανάγκες των άλλων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP, Liver GP), ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, αποτελεί έναν από της μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η αναστολή του ενζύμου αυτού έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου και τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών. Η φωσφορυλάση και η γλυκοκινάση αποτελούν δύο ένζυμα που φαίνεται να έχουν κατά κύριο λόγο τον έλεγχο της ρύθμισης της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τα ηπατικά κύτταρα. (Agius et al. 2001).

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης μικρομοριακών αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό εν

δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή, ει δυνατόν ατομική, ευκρίνεια, μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης \Leftrightarrow σύνθεσης γλυκογόνου στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Ο σχεδιασμός με βάση τη μακρομοριακή δομή, η σύνθεση, η βιοχημική και βιολογική μελέτη της ουσίας αποτελεί σήμερα μία πορεία εργασιών με στόχο την ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και μεγάλη συγγένεια για την πρωτεΐνη-στόχο. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της πορείας και συγκεκριμένα αποσκοπεί στη βιοχημική και κρυσταλλογραφική μελέτη ουσιών που έχουν συντεθεί μετά από κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό και έχουν ως στόχο το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά η κινητική μελέτη της σειράς ουσιών, αναλόγων της γλυκόζης, για τον προσδιορισμό της IC50 έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν κρυσταλλογραφικά οι δομές των συμπλοκών ενζύμου-αναστολέα προκειμένου να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής του ενζύμου

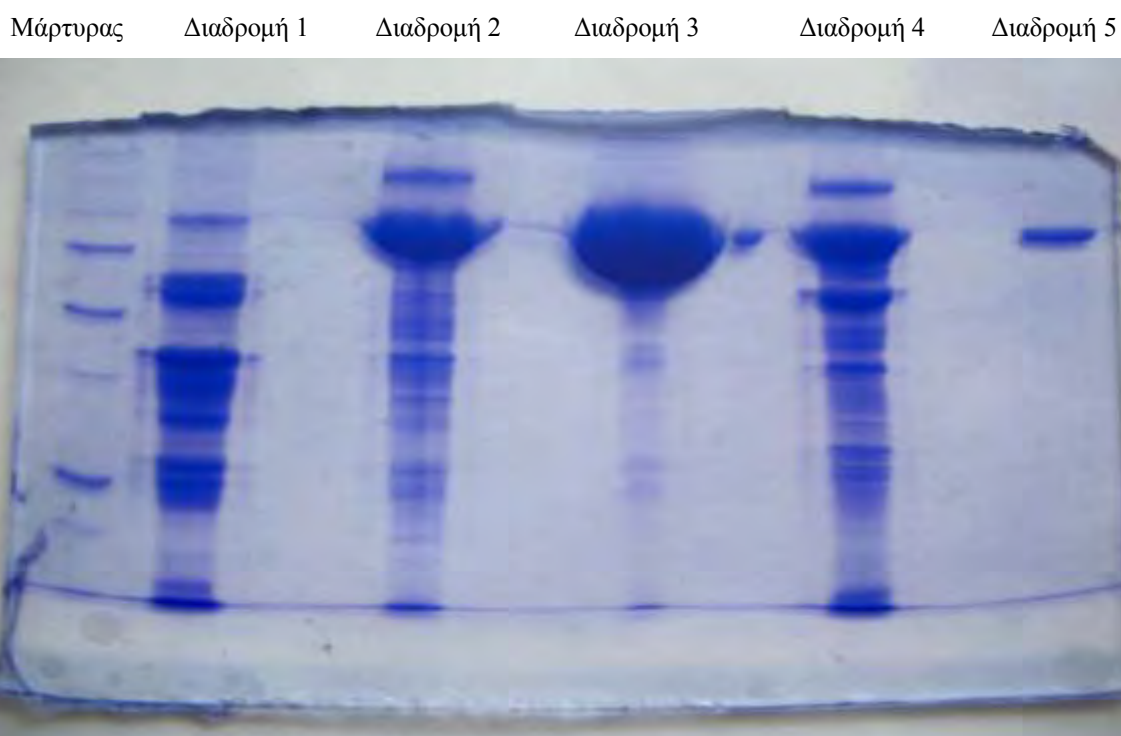
Παρόλο που ο πρωταρχικός στόχος είναι η ηπατική GP, το κρυσταλλογραφικό πρότυπο στο οποίο στηρίζεται ο σχεδιασμός ενώσεων στην παρούσα διατριβή είναι η μυϊκή GP. Η ηπατική GP είναι 80 % ομόλογη (ως προς την αμινοξική ακολουθία) με την μυϊκή GP, όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων είναι 100% στην περιοχή του ενεργού κέντρου.

Η σειρά των γλυκοκυρανοζυλο-πυριμιδινικών αναλόγων με την κωδική ονομασία DK συντέθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 1).



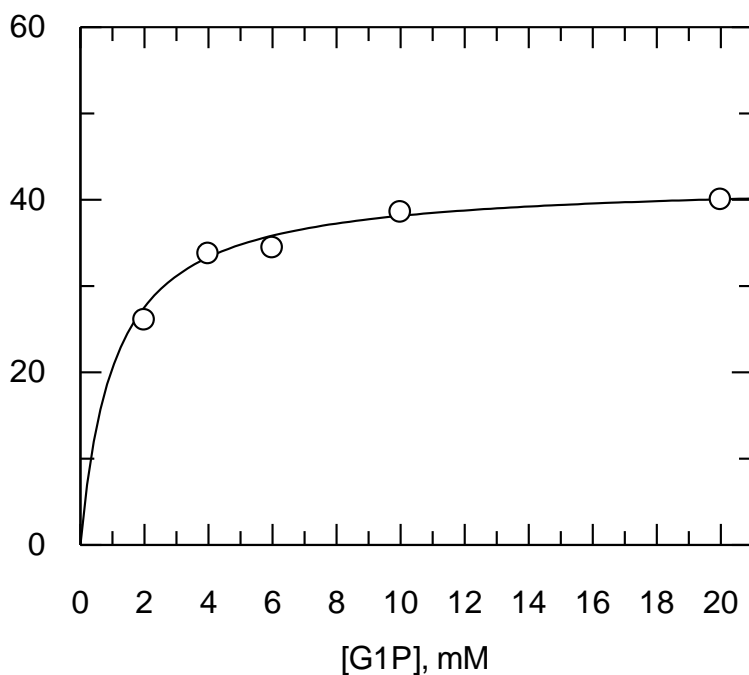
Εικόνα 27: Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

2.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m .(βλ. Πειραματικό μέρος, §2.2)

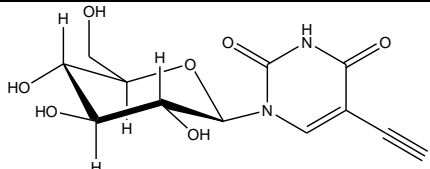
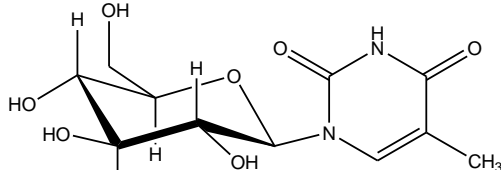
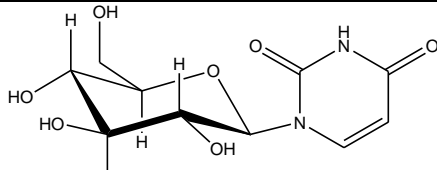
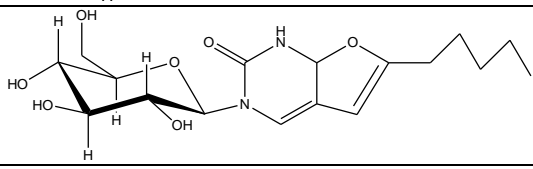
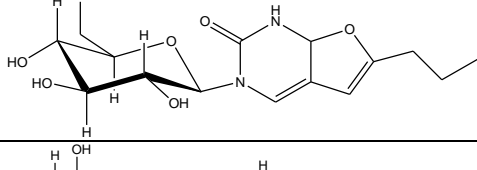
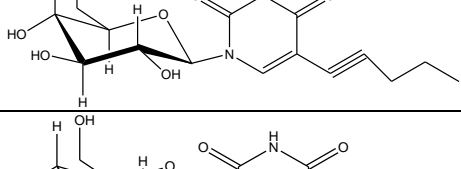
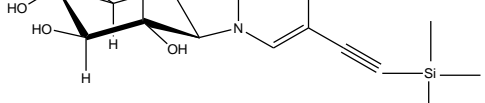
Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=1.06 \pm 0.19$ mM και $V_{max}=42.17 \pm 0.21$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. Στο σχήμα 29 παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G-1-P).

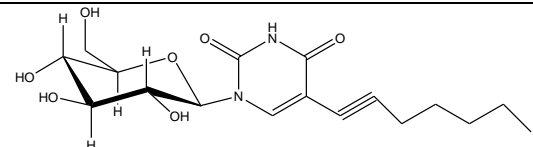
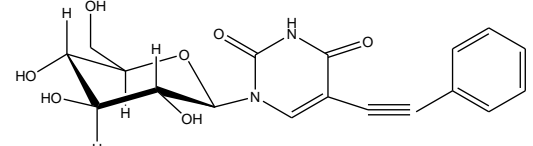


Εικόνα 28: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

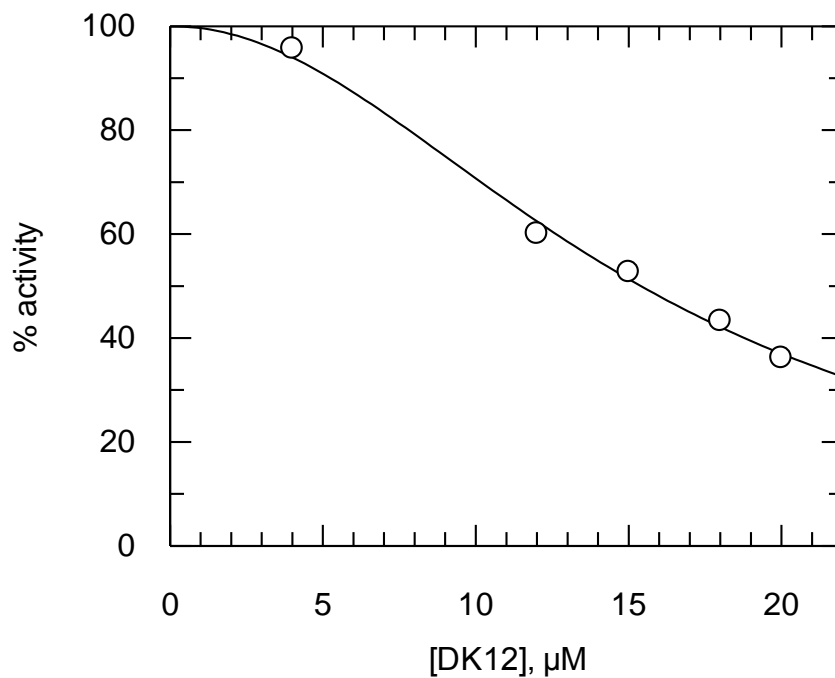
2.2 Κινητική μελέτη ενώσεων DK

Για το σκοπό της εργασίας, μετά την απομόνωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου μελετήθηκαν οι ενώσεις DK ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Η ένωση που μελετήθηκε αρχικά και χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για την σύνθεση και μελέτη των υπόλοιπων ενώσεων ήταν η DK12. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Grafit (Leatherberrow,1997)

Όνομα	Ένωση	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν	IC50 (μm)
DK12		4μM, 12μM, 15 μM, 18μM, 20 μM	15.4 ± 0.3
DK18		4μM, 6μM, 10μM, 20μM, 30μM, 40μM, 50μM	22.0 ± 0.5
DK19		10μM, 20μM, 30μM, 40μM, 50μM	31.8 ± 1.5
DK11		0.3mM, 0.4mM, 0.5mM, 0.7mM, 1 mM	121.8 ± 0.1
DK16		0.05mM, 0.16mM, 0.25mM, 0.5 mM	154.2 ± 4.1
DK15		0,3mM, 0.5mM, 0.8mM, 1 mM	765.8 ± 9.6
DK13		0.3mM, 0.5mM, 0.8mM, 1mM, 1.2mM, 1.5mM	839.3 ± 28.5

DK10		0.5mM, 1mM, 1.75mM, 2mM, 2.5 mM	6145.8 ± 237.6
DK17		0.05 mM, 0.5mM, 1 mM	Δεν παρουσίασε αναστολή

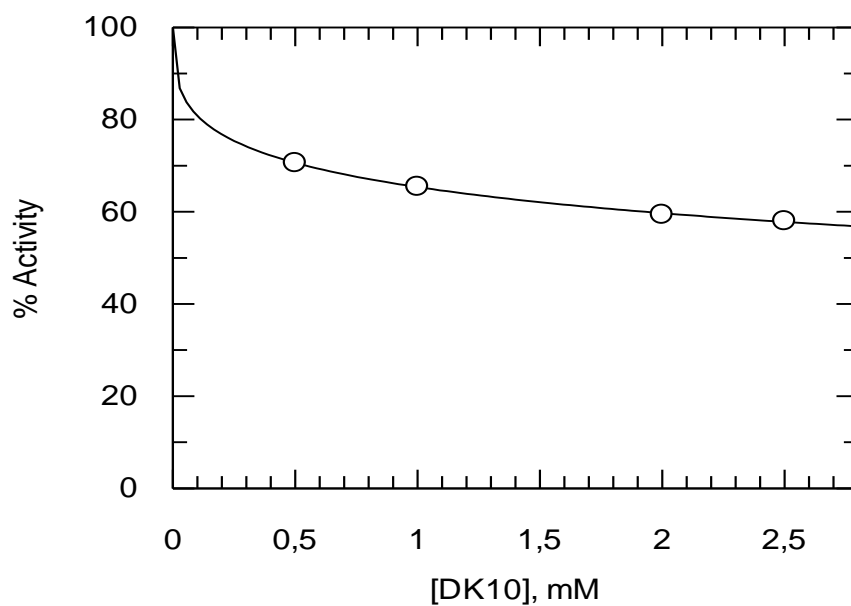
• **DK12**



Parameter	Value	Std. Error
IC 50	15,3999	0,3158
Slope factor	2,0414	0,1695

Εικόνα 29: Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της DK12 και υπολογισμός της IC₅₀.

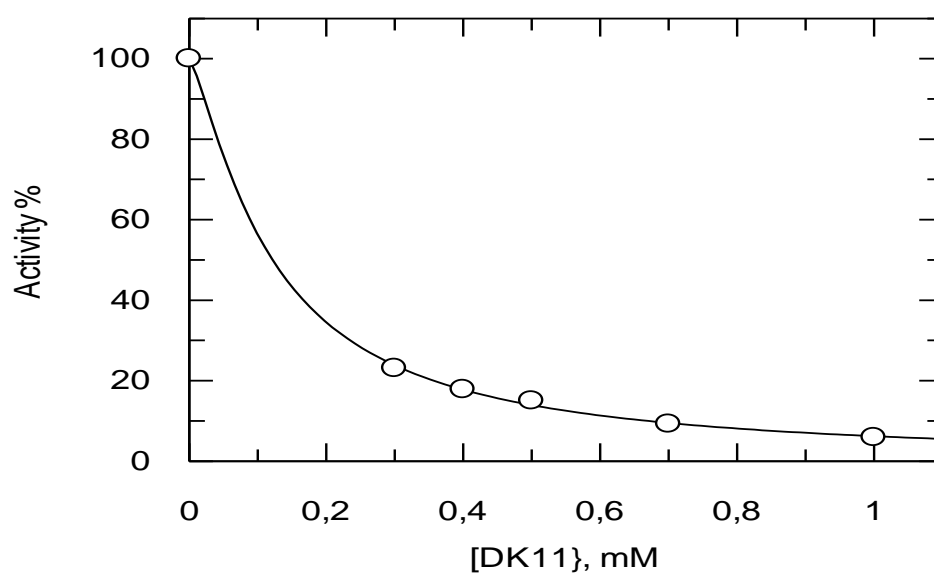
•DK10



Parameter	Value	Std. Error
IC 50	6,1458	0,2376
Slope factor	0,3497	0,0067

Εικόνα 30: Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της DK10 και υπολογισμός της IC₅₀

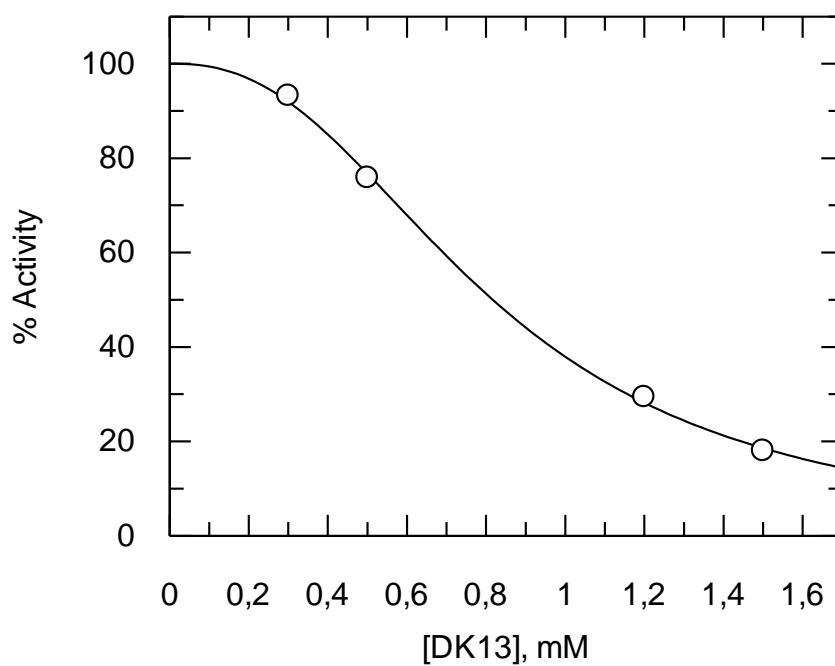
•DK11



Parameter	Value	Std. Error
IC 50	0,1218	0,0078
Slope factor	1,2899	0,0619

Εικόνα 31: Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της DK11 και υπολογισμός της IC₅₀

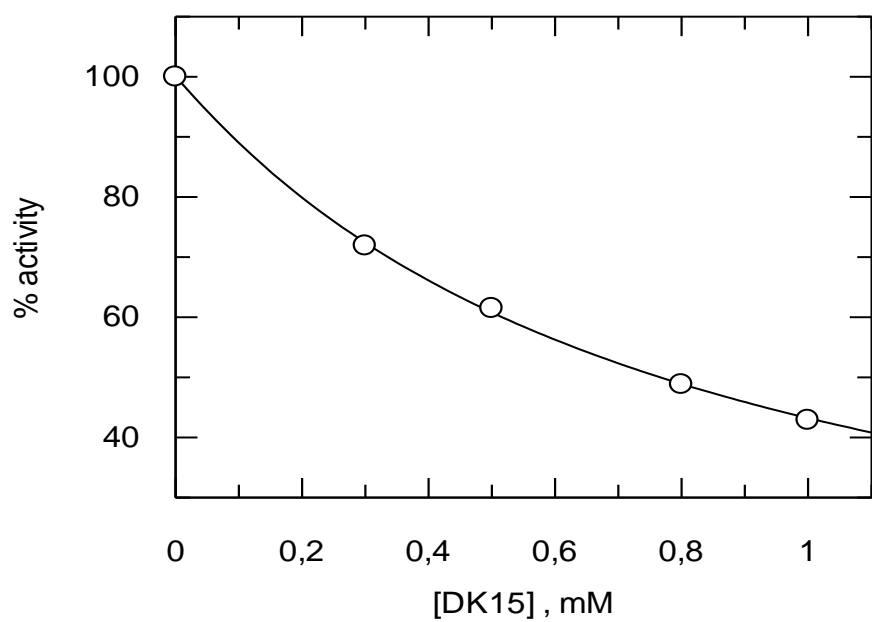
•DK13



Parameter	Value	Std. Error
IC 50	0,8167	0,0153
Slope factor	2,4315	0,0866

Εικόνα 32: Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της DK13 και υπολογισμός της IC₅₀

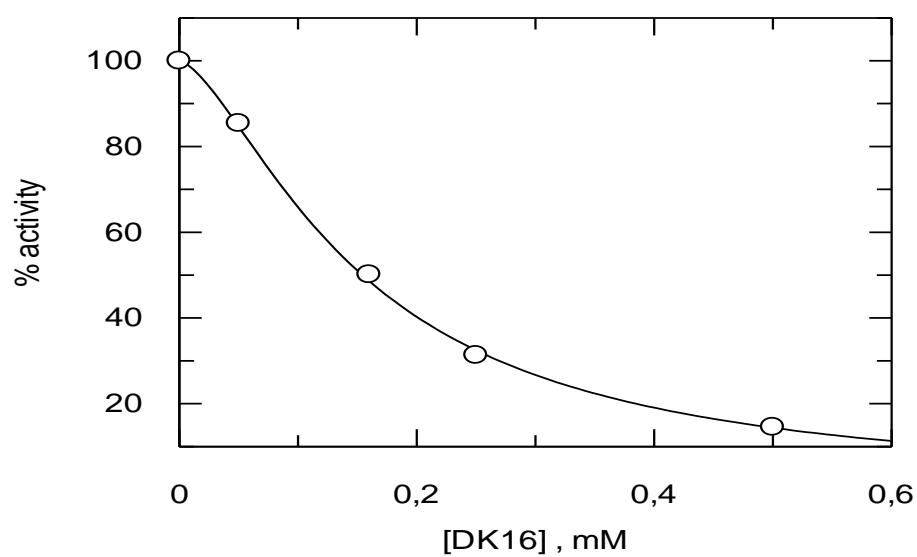
•DK15



Parameter	Value	Std. Error
IC ₅₀	0,7658	0,0096
Slope factor	1,0272	0,0266

Εικόνα 33: Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της DK15 και υπολογισμός της IC₅₀

•DK16



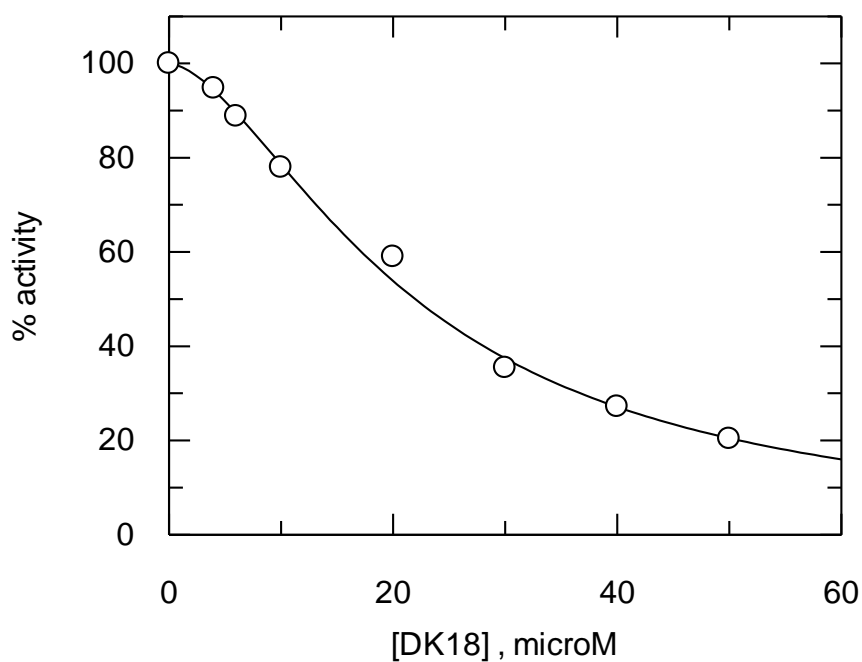
Parameter	Value	Std. Error
IC 50	0,1542	0,0041
Slope factor	1,5167	0,0432

Εικόνα 34: Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της DK16 και υπολογισμός της IC₅₀

•DK17

Δεν παρουσίασε αναστολή σε καμία συγκέντρωση που δοκιμάστηκε μέχρι και 1mM.

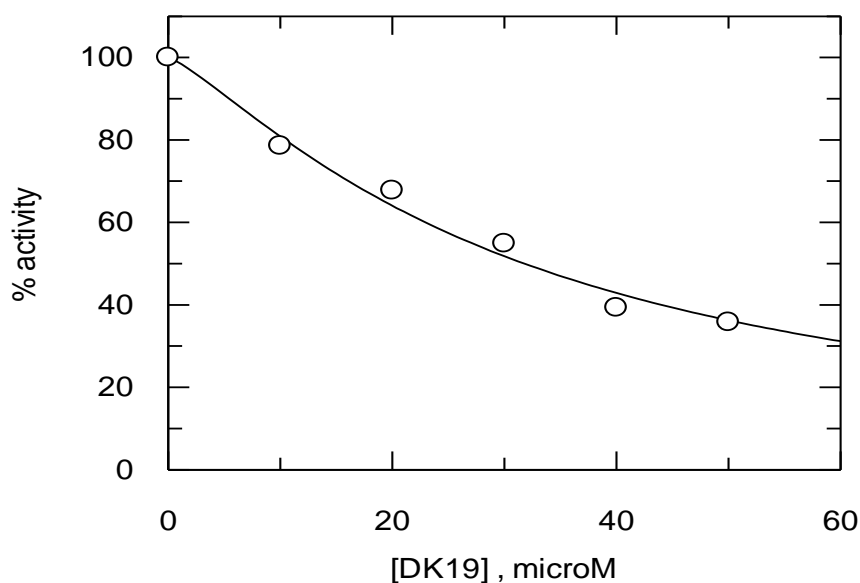
•DK18



Parameter	Value	Std. Error
IC 50	21,9713	0,4922
Slope factor	1,6505	0,0500

Εικόνα 35: Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της DK18 και υπολογισμός της IC₅₀

•DK19



Parameter	Value	Std. Error
IC 50	31,7891	1,4729
Slope factor	1,2464	0,1022

Εικόνα 36: Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της DK19 και υπολογισμός της IC₅₀

Οι ενώσεις που μελετήθηκαν ως αναστολείς αποτελούν γλυκοκυρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης. Στη συνέχεια στη θέση 5 της ουρακίλης προστέθηκαν τελικά αλκύνια. Από τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι η ένωση DK12 η οποία στην θέση 5 έχει έναν αιθύνυλο (ακετυλένιο) υποκαταστάτη, αποτελεί τον καλύτερο αναστολέα με IC₅₀ 15.4μM. Ο αναστολέας αυτός αλληλεπιδρά εκτός από τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με αμινοξέα του βρόχου 280s. Η αλληλεπίδραση αυτή προωθεί την

μετάβαση προς την κατάσταση T, η οποία αποκλείει την πρόσβαση του υποστρώματος (γλυκογόνο) στο καταλυτικό κέντρο.

Στη συνέχεια η ένωση DK18 η οποία είναι ένας γλυκοπυρανονουκλεοζίτη της θυμίνης, αποτελεί τον αμέσως επόμενο καλύτερο αναστολέα με IC_{50} 22 μ M. Η ένωση DK19, ο γλυκοπυρανονουκλεοζίτης της ουρακίλης, ο οποίος δεν έχει υποκαταστάτη στην θέση 5, αποτελεί τον τρίτο καλύτερο αναστολέα με IC_{50} 31.8 μ M.

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις προκύπτει το συμπέρασμα πως αν και οι τιμές της IC_{50} δεν έχουν πολύ μεγάλη διαφορά για τις τρεις αυτές ενώσεις, η προσθήκη ενός υποκαταστάτη στη θέση 5 της ουρακίλης έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου. Συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας έναν αιθύνυλο υποκαταστάτη στη θέση 5 ο αναστολέας συνδέεται ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα την μείωση της τιμής IC_{50} .

Ακολούθησε η σύνθεση της ένωσης DK15 που αποτελεί και αυτή γλυκοπυρανονουκλεοζίτη της ουρακίλης με προσθήκη τελικών αλκυνίων στη θέση 5 της ουρακίλης. Συγκεκριμένα στον DK15 προστέθηκε ένας πεντύνυλο υποκαταστάτης σχηματίζοντας έτσι μια «ουρά» στο τέλος του αναστολέα. Συγκρίνοντας τον αναστολέα DK15 με τους DK12 και DK18 που έχουν πολύ μικρότερους υποκαταστάτες στην ίδια θέση παρατηρούμε πως η ουρά του τελικού αλκυνίου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους των αναστολέα. Το μεγάλο μέγεθος δυσκολεύει ακόμα περισσότερο την διόδο του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο με αποτέλεσμα η τιμή της IC_{50} να αυξάνονται ακόμα περισσότερο στα 765.8 μ M.

Οι αναστολείς DK10 και DK17 είναι οι χειρότεροι από τις ενώσεις που δοκιμάστηκαν. Ο DK10 διαθέτει έναν επτύνυλο υποκαταστάτη στη θέση 5 της ουρακίλης. Η ουρά του τελικού αλκυνίου, που δημιουργείται όπως και στην περίπτωση του DK15, αυξάνει το μέγεθος του αναστολέα. Η προσθήκη ακόμα 2 ατόμων άνθρακα στο τελικό αλκύνιο δυσκολεύει την πρόσβαση του αναστολέα και την ισχυρή πρόσδεση του στο καταλυτικό κέντρο για μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου. Το μεγάλο μέγεθος του αναστολέα έχει σαν αποτέλεσμα η τιμή της IC_{50} να είναι 6145.8 μ M, μεγαλύτερη δηλαδή από κάθε άλλη ένωση που μελετήθηκε. Ο DK17 διαθέτει ως υποκαταστάτη ένα φαίνυλο-ακετυλένιο. Ο υποκαταστάτης είναι πολύ ογκώδης με αποτέλεσμα να καθιστά αδύνατη την πρόσδεση του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.

Στη συνέχεια στις ενώσεις DK11, DK16 πραγματοποιήθηκε η κυκλοποίηση των αλκυνίων με σκοπό τη σύνθεση φουρανοπυριμιδινό-νουκλεοζιτών. Οι νουκλεοζίτες αυτοί είναι αρκετά ογκώδεις με αποτέλεσμα να δυσκολεύεται η διόδος τους στο καταλυτικό

κέντρο του ενζύμου και η μείωση της δραστηριότητάς τους. Έτσι στους αναστολείς αυτούς η τιμή της IC_{50} αυξάνεται στα 121.8 μ M για την DK11 και 154.2 μ M για την DK16.

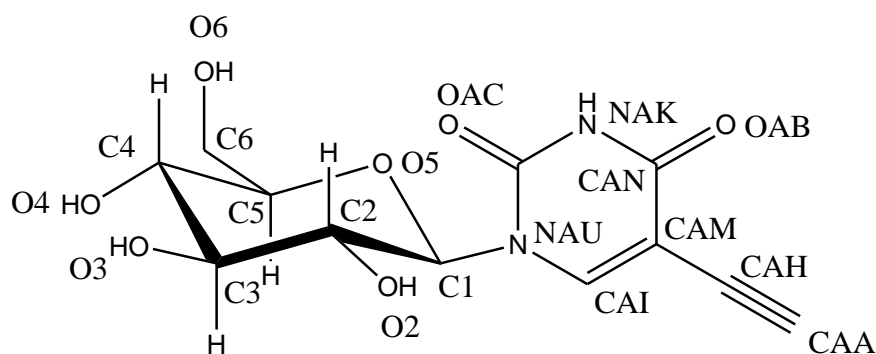
Η ένωση DK13 αποτελεί έναν πυριτικό ενδιάμεσο νουκλεοζίτη κατά την διαδικασία σύνθεσης του 5-αιθύνυλο-πυριμιδινο-γλυκοπυρανονουκλεοζίτη DK12. Το πυρίτιο που βρίσκεται στη θέση 5 της ουρακίλης είναι ιδιαίτερα ογκώδες με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η είσοδος του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και η τιμή της IC_{50} να αυξάνεται στα 839.3 μ M.

Επίσης θα πρέπει να αναφέρουμε πως εκτός από το μέγεθος του υποκαταστάτη, σημαντικό ρόλο για την δραστηριότητα του αναστολέα παίζει και το περιβάλλον στο οποίο θα βρεθεί. Το καταλυτικό κέντρο της GPb αποτελείται από αμινοξέα και μόρια ύδατος τα οποία δημιουργούν ένα υδρόφιλο περιβάλλον. Στην περίπτωση των αναστολέων που φέρουν ως υποκαταστάτες τελικά αλκύνια με μεγάλο μήκος, η αλυσίδα από άτομα άνθρακα που δημιουργείται είναι υδρόφοβη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η υδρόφοβη αλυσίδα να εκτοπίζει τα υδρόφιλα αμινοξέα και να μην μπορεί να δημιουργήσει δεσμούς σε ένα υδρόφιλο περιβάλλον όπως αυτό του καταλυτικού κέντρου. Το υδρόφιλο περιβάλλον καθώς και η υδρόφοβη αλυσίδα συντελούν στην δημιουργία μιας «ταλάντωσης» στην τελική αλυσίδα του αλκυνίου που δυσκολεύει ακόμα περισσότερο την πρόσδεση του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο.

Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως η δραστηριότητα των αναστολέων που μελετήθηκαν, εξαρτάται από τον υποκαταστάτη που προστίθεται στη θέση 5 της ουρακίλης. Υποκαταστάτες με ιδιαίτερα μεγάλο μήκος ή μέγεθος παρεμποδίζουν την πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται και η αναστολή της βιολογικής δραστηριότητας του ενζύμου.

3. Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης

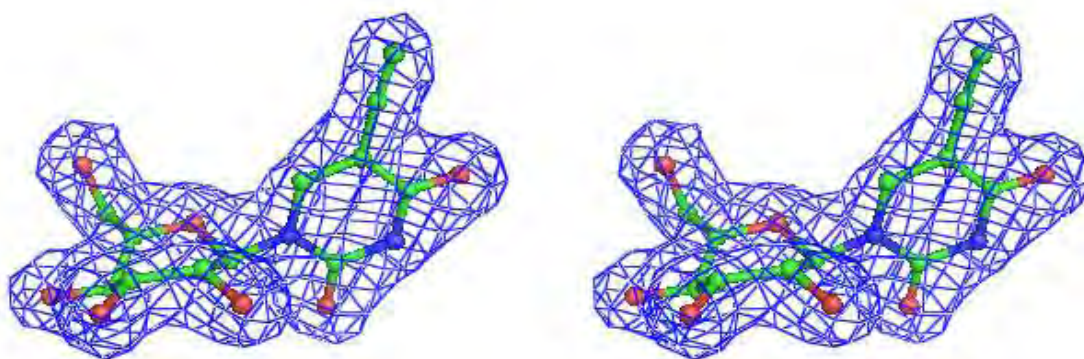
Η κρυσταλλογραφική μελέτη αποτέλεσε το επόμενο στάδιο της έρευνάς μας και είχε ως στόχο την περαιτέρω μελέτη του τρόπου σύνδεσης της μίας εκ των ενώσεων, DK12, για την ερμηνεία των κινητικών αποτελεσμάτων.



Εικόνα 37: Χημικός τύπος της ένωσης DK12 και η ονοματολογία των ατόμων που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη.

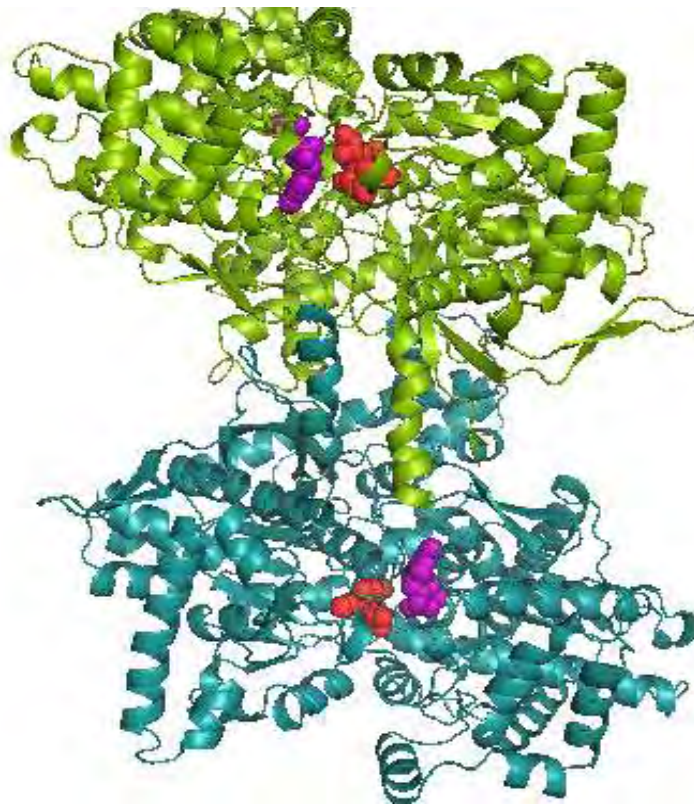
Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε την κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (διαμόρφωση T), τον εμποτισμό κρυστάλλου με διάλυμα της υπό μελέτη ουσίας, τη συλλογή και την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Στη συνέχεια η δομή της GPb ως συμπλόκου με την α-D-γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο το οποίο υποβλήθηκε σε βελτιστοποίηση έναντι των πειραματικών δεδομένων για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του νέου συμπλόκου.

Στο Σχήμα 38 παρουσιάζεται ο νέος χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας διαφοράς 2Fo-Fc που προέκυψε μετά τη βελτιστοποίηση έχοντας συμπεριλάβει την ένωση DK12 στο μοντέλο.



Εικόνα 38: Στερεοδιάγραμμα του τελικού μοντέλου του DK12 και του ηλεκτρονιακού χάρτη διαφοράς 2Fo-Fc.

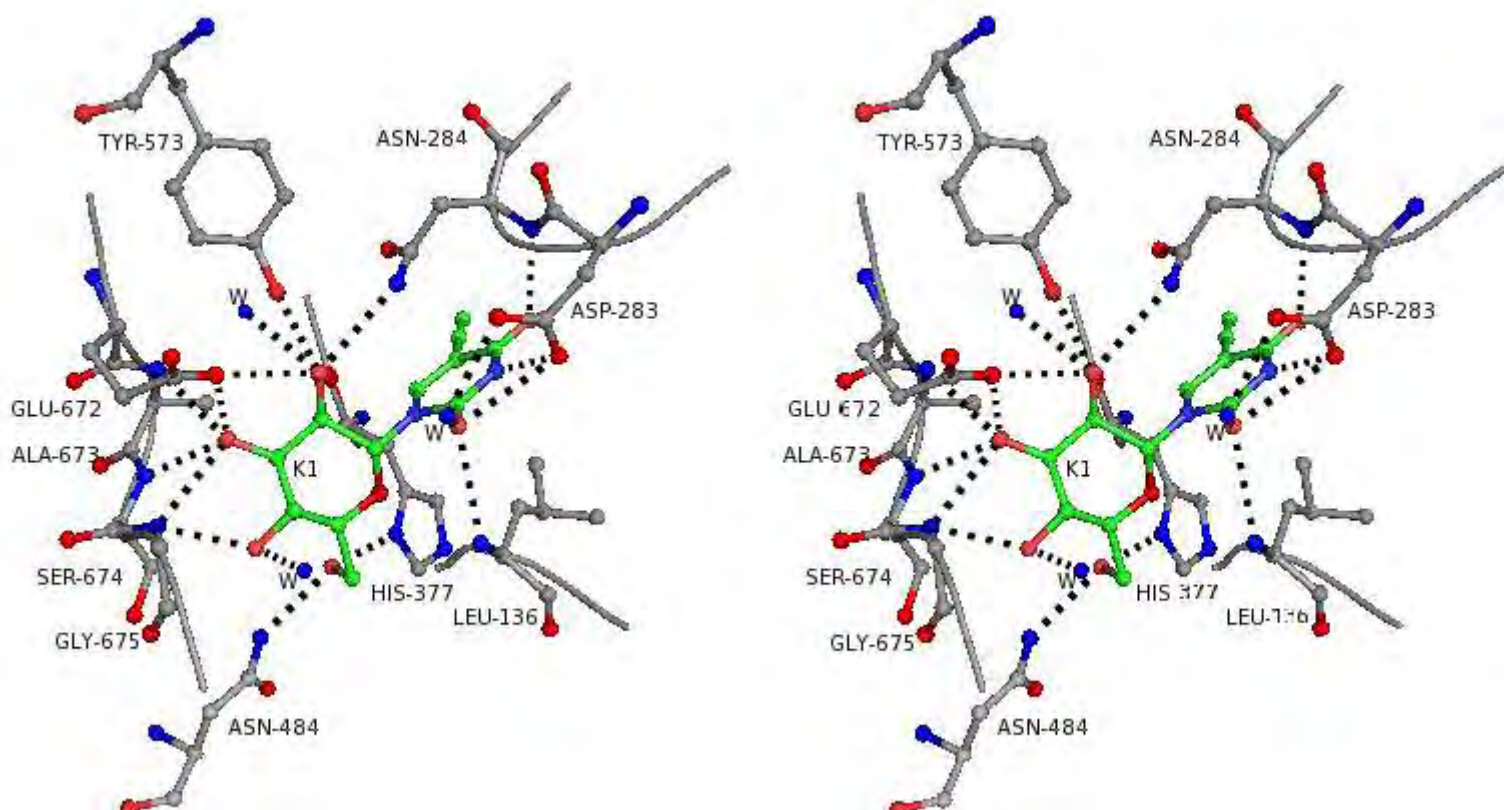
Στη συνέχεια πραγματοποιείται ανάλυση της δομής με στόχο τον ανάλυση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης αναστολέα. Η κρυσταλλογραφική μελέτη έδειξε πως η ένωση DK12 συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Παρακάτω παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου που μπορεί να σχηματίσει η ένωση DK12 με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου (Πίνακας 2), καθώς και με μόρια ύδατος. Οι van der Waals αλληλεπιδράσεις του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο παραθέτονται στον πίνακα 3.



Εικόνα 39: Κρυσταλλική δομή της GPb σε σύμπλοκο με τον αναστολέα DK12. Η μια υπομονάδα φαίνεται με πράσινο χρώμα, ενώ η δεύτερη με κυανό. Η καταλυτική περιοχή χαρακτηρίζεται από την σύνδεση της ένωσης DK12 (κόκκινο χρώμα) και από την παρουσία της φωσφορικής πυριδοξάλης PLP (μωβ χρώμα)

Άτομο αναστολέα	Άτομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)
OAB[O]	Asn284 N	3.05
O3	Gly675 N Glu672 OE1 Ala673 N Ser674 N	2.99 2.6 3.2 2.98
O4	Gly675 N Wat123 O	2.73 2.84
O6	His377 ND1 Asn484	2.76 2.73
O2	Glu672 OE1 Asn284 ND2 Wat277 O Tyr573	3.1 3.13 2.9 3.0
OAC[O]	Asp283 OD1 Leu136 N Wat57 O	3.23 3.17 2.79
NAK[N]	Asp283 OD1	2.87

Πίνακας 2: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης DK12 και αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου, καθώς και μορίων ύδατος.



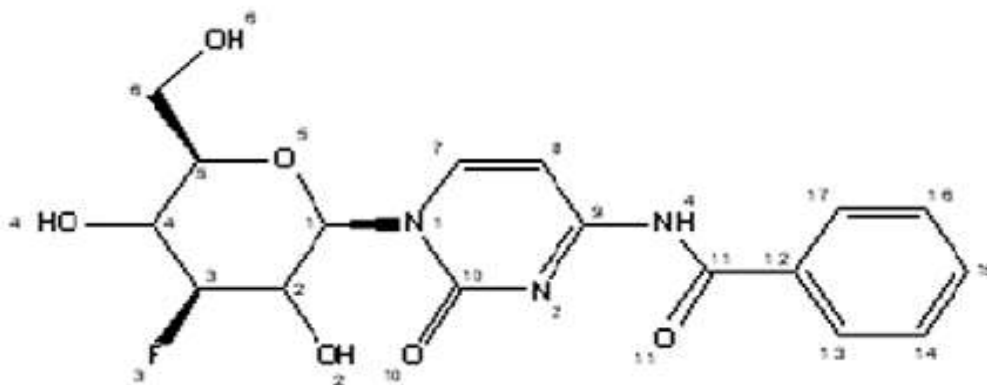
Εικόνα 40: Στερεοσκοπική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης DK12 (K1) με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και τα μόρια ύδατος. Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.

Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο και με μόρια ύδατος παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

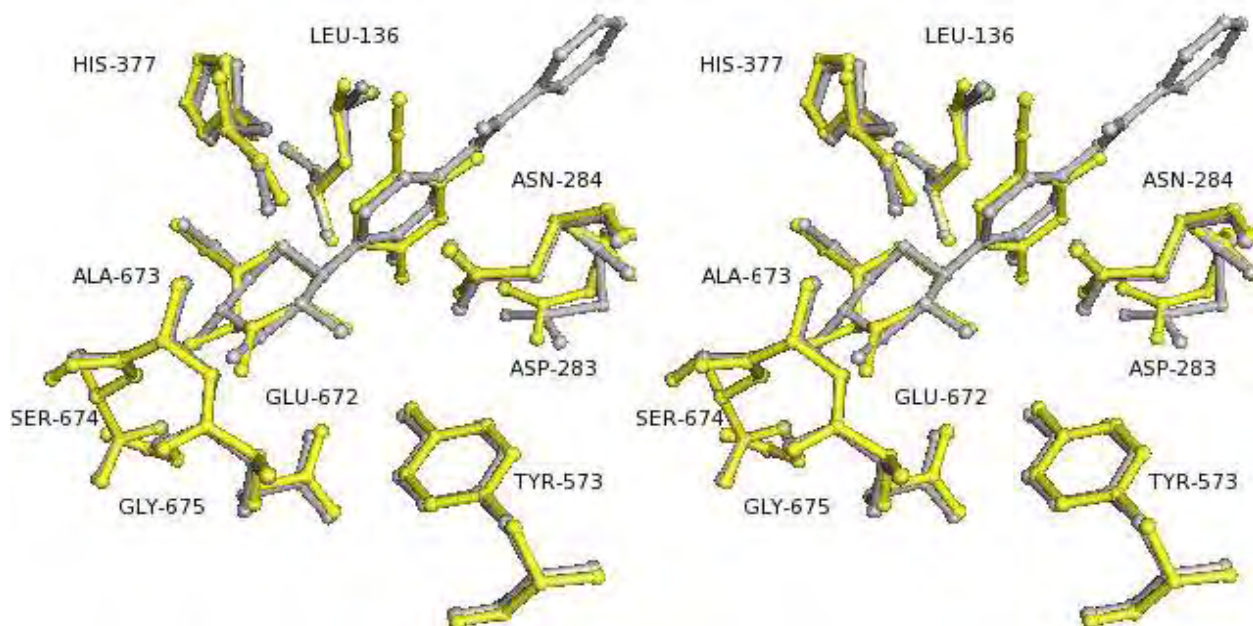
Πίνακας 2: Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης DK12 και αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου της GPb.		
CAA	Asp339 OD1, Asp339 CG, Asp339 OD2, Thr378 CB, Thr378 CG2	5
CAM	Leu136 CD1, Asn284 OD1, Asn284 GC, His377 O,	4
CAI	Asn284 OD1, His377 O, His377 CB	3
CAN	Asn284 ND2, Asn284 OD1, Asp283 OD1	3
CAH	His377 CB, His377 O, Asp339 OD1, Asn284 OD1	4
CAO	Leu136 CB, Asn284 ND2, Leu136 N, Asp283 OD1	4
C2	Glu672 OE1, His377 O	2

C3	Glu672 OE1, Ser674 N, Gly675 N	3
C4	Gly675 N	1
C6	Gly135 C, Gly135 O, His377 ND1, Asn484 ND2	4
NAK	Leu136 CB, Asn284 ND2,Asn284 CG, Asp283 OD2, Asp283 OD1, Asp283 CG	6
NAU	Leu136 N, Leu136 CB, Asn284 ND2	3
OAC	Gly135 CA, Gly135 N, Leu136 CB, Asp283 OD2, Asp283 OD1, Asp283 CG	6
O2	Glu672 OE1, Asn284 CG, Asn284 OD1, Tyr573 OH	6
O3	Gly675 CA, Ala673 C, Ala673 CA, Ala673 CB, Glu672 CG, Glu672 CD, Ser674 CA, Ser674 C	8
O4	Gly675 C, Gly675 N, Gly675 O, Gly675 CA, Ser674 CA, Ser674 CB, Ser674 OG, Asn484 ND2	8
O6	Val455 CG2, Val455 CG1, Leu139 CD2, His377 ND1, His377 CE1, His377 CG, Asn484 ND2, Asn484 CG.	8
	Σύνολο	78
	Αμινοξικά κατάλοιπα	13

Στη συνέχεια πραγματοποιείται υπέρθεση με άλλες δομές της GPb ως συμπλόκου με αναστολείς για τον εντοπισμό των διαφορών στον τρόπο σύνδεσης. Συγκεκριμένα, έγινε σύγκριση με τη δομή του συμπλόκου GPb- DK2.(Tsirkone et al., 2010)



Εικόνα 41: Χημικός τύπος της ένωσης DK2.



Εικόνα 42: Υπέρθωση του συμπλόκου GPb-DK12 πάνω στο σύμπλοκο GPb-DK2. Με κίτρινο χρώμα φαίνεται το σύμπλοκο GPb-DK12, ενώ με γκρι το σύμπλοκο GPb-DK2

Η ένωση DK2 αποτελεί ανάλογο της γλυκόζης που διαθέτει ένα φθόριο στη θέση 3 της γλυκόζης αντί για υδροξύλιο και μια N⁴-βενζοϋλ-κυτοσίνη συνδεδεμένη στη θέση 1 της γλυκοπυρανόζης. Μετά από κινητικά πειράματα για την ένωση DK2 βρέθηκε πως η K_i του αναστολέα είναι 46.2μM. Η κρυσταλλογραφική μελέτη της ένωσης έδειξε πως σχηματίζει συνολικά 17 δεσμούς H και 55 δεσμούς Van der Waals. (Tsirkone et al., 2010). Αντίστοιχα, για την ένωση DK12, μετά από κινητικά πειράματα βρέθηκε πως η IC₅₀ είναι 15.4 μM ενώ η K_i υπολογίστηκε σε 3.1μM.

Ειδικότερα, συγκρίνοντας το σύμπλοκο GPb-DK12 με το σύμπλοκο GPb-DK2 βλέπουμε ότι η θέση της γλυκόζης είναι και στις δύο περιπτώσεις η ίδια. Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζουν τα περιφερειακά υδροξύλια της γλυκόζης διατηρούνται και στις δυο περιπτώσεις με μοναδική διαφορά ότι το οξυγόνο του υδροξυλίου που βρίσκεται στη θέση 3' της γλυκόζης του DK12 σχηματίζει έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου με το υδρόφιλο αμινοξύ Glu672 σε σχέση με το φθόριο που βρίσκεται στην ίδια θέση στον DK2.

Ακόμα, ο υποκαταστάτης N⁴-βενζοϋλ-κυτοσίνη σχηματίζει επιπλέον δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. Συγκεκριμένα το άζωτο στη θέση 4 σχηματίζει δεσμούς με το αμινοξύ Asn284 και το μόριο ύδατος 298. Επίσης το άζωτο στη θέση 2 σχηματίζει δεσμούς με το μόριο ύδατος 272 ενώ το οξυγόνο στη

θέση 10 με τα αμινοξέα Gly135, Leu136 και τα μόρια ύδατος 57 και 272. Συνολικά η ένωση DK2 σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με 8 αμινοξικά κατάλοιπα και 5 μόρια ύδατος. (Tsirkone et al., 2010).

Ο αιθύνυλο υποκαταστάτης στον DK12 σχηματίζει και αυτός επιπλέον δεσμούς υδρογόνου με το καταλυτικό κέντρο. Συγκεκριμένα το οξυγόνο που βρίσκεται στη θέση 7 (OAC) σχηματίζει δεσμούς με τα αμινοξέα Asp283, Leu136 και το μόριο ύδατος 57, το οξυγόνο στη θέση 10 (OAB) με το αμινοξύ Asn284 και το άζωτο στη θέση 9 (NAK) με το αμινοξύ Asp283. Συνολικά ο DK12 σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με 9 αμινοξικά κατάλοιπα και 3 μόρια ύδατος. Τα 8 αμινοξικά κατάλοιπα με τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και οι δυο ενώσεις είναι τα ίδια ενώ το επιπλέον αμινοξύ που σχηματίζει δεσμούς ο DK12 είναι το Asp283. Η υπέρθεση των δομών των δύο συμπλόκων έδειξε πως η πλευρική αλυσίδα του κατάλοιπου Asp283 είναι διαφορετική στα δύο σύμπλοκα με αποτέλεσμα η απόσταση των ατόμων της από τα άτομα της ένωσης DK2 να είναι αρκετά μεγάλη και να μην είναι δυνατή η δημιουργία δεσμών υδρογόνου. Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας με τις αποστάσεις των επιμέρους ατόμων του αμινοξέος Asp283 στα δύο σύμπλοκα.

Αμινοξύ	Μετατοπίσεις ατόμων (Å)
Asp283	OD2 ~ 0.94 CA ~ 0.33 OD1~ 1.21 CB ~ 0.53 CG ~ 0.77

Οι δυο ενώσεις σχηματίζουν τον ίδιο αριθμό δεσμών υδρογόνου με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου παρόλα αυτά διαφέρουν στην ικανότητα τους να αναστέλλουν τη βιοχημική δραστηριότητα του.

Η διαφορά αυτή φαίνεται πως οφείλεται στη διαφορά του αριθμού των αλληλεπιδράσεων van der Waals που σχηματίζουν οι δυο ενώσεις με κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου. Συγκεκριμένα η ένωση DK2 σχηματίζει συνολικά 55 αλληλεπιδράσεις van der Waals με 12 αμινοξικά κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου (Tsirkone et al. 2010) ενώ η ένωση DK12 σχηματίζει συνολικά 78 van der Waals αλληλεπιδράσεις με 13 αμινοξικά κατάλοιπα.

Η ενέργεια που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση van der Waals είναι πολύ μικρή. Οι συνήθεις αλληλεπιδράσεις συνεισφέρουν $0.5-1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ανά ζεύγος ατόμων. Ωστόσο, όταν οι επιφάνειες δυο μεγάλων μορίων πλησιάζουν, τότε ένας μεγάλος αριθμός ατόμων είναι σε επαφή van der Waals μεταξύ τους, οπότε η προκύπτουσα ενέργεια, αθροισόμενη για πολλά ζεύγη ατόμων, μπορεί να είναι σημαντική. Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals μεταξύ των ατόμων των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου με τα άτομα της ένωσης DK12 οδηγούν σε ραγδαία αύξηση της προκύπτουσας ενέργειας με αποτέλεσμα να σταθεροποιείται ακόμη περισσότερο η πρόσδεση του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο και η τιμή της IC_{50} να μειώνεται αισθητά.

Συμπερασματικά, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά η κινητική μελέτη μιας σειράς ενώσεων, αναλόγων της γλυκόζης, για τον προσδιορισμό της IC_{50} και στη συνέχεια προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά η δομή του συμπλόκου του ενζύμου με τον πλέον ισχυρό αναστολέα από αυτούς που μελετήθηκαν προκειμένου να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής του ενζύμου. Τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών έδειξαν πως η ένωση DK12 συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Η χαμηλή τιμή της IC_{50} οφείλεται στην εύκολη πρόσβαση της ένωσης και τη δημιουργία δεσμών με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δραστηριότητα του. Η κρυσταλλογραφική μελέτη των υπόλοιπων ενώσεων βρίσκεται σε εξέλιξη έτσι ώστε να ληφθούν συμπεράσματα για την ικανότητα τους να αναστέλλουν το ένζυμο GPb.

Περίληψη

Αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα. Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες.

Ο διαβήτης τύπου 2 αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες παθήσεις και χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα του οργανισμού να ρυθμίσει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Με στόχο τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ο σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη μοριακή δομή (ή ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων) έχει θέσει ως στόχο εξειδικευμένων μορίων, ένζυμα και υποδοχείς που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης. Μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για τον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, η μυϊκή φωσφορυλάση b του γλυκογόνου χρησιμοποιείται για την κινητική μελέτη 9 ενώσεων αναλόγων γλυκόζης, οι οποίες σχεδιάστηκαν με στόχο το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Για την πλέον ισχυρή από αυτές τις ενώσεις πραγματοποιήθηκαν κρυσταλλογραφικά πειράματα με χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας.

Ειδικότερα, η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% (IC_{50}) σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 15.4 μ M έως ~6.145 μ M, με πιο ισχυρή την ένωση DK12 και ασθενέστερη την DK10, ενώ η ένωση DK17 δεν προκαλεί καμία αναστολή στη δράση του ενζύμου μέχρι την συγκέντρωση 1 mM. Από τις κινητικές μελέτες προέκυψε το συμπέρασμα πως η δραστηριότητα των αναστολέων, εξαρτάται από το μέγεθος, το μήκος καθώς και τη φύση του υποκαταστάτη που προστίθεται στη θέση 5 της ουρακίλης.

Για την ερμηνεία των κινητικών αποτελεσμάτων που αφορούν στην ένωση DK12 πραγματοποιήθηκε η κρυσταλλογραφική μελέτη αυτής ως συμπλόκου με την GPb. Ακολούθησε η καταγραφή των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει η ένωση με τα αμινοξέα και τα μόρια του διαλύτη στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Βρέθηκε ότι η ένωση στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου σχηματίζει 17 δεσμούς υδρογόνου και 78 αλληλεπιδράσεις van der Waals.

Η παρούσα εργασία ακολουθεί πρόσφατη μελέτη από το εργαστήριο της σύνδεσης μίας σειράς 1-(3-δεοξυ-3-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο) ανάλογων πυριμιδίνης από την οποία ο πλέον ισχυρός αναστολέας (DK2) είχε σταθερά αναστολής (Ki) 46.4 μM. Σύγκριση των δομών των συμπλόκων GPb-DK12 και GPb-DK2 απεκάλυψε τις αλληλεπιδράσεις αναστολέα ενζύμου στο καταλυτικό κέντρο οι οποίες μπορούν να ερμηνεύσουν την αυξημένη συγγένεια της ένωσης που φαίνεται και από τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων.

Abstract

Design of glucose analogues, inhibitors of glycogen phosphorylase, as potential hypoglycemic drugs. Kinetic and crystallographic studies.

Type 2 diabetes (T2D) is one of the most common diseases and is characterized by the inability of the human organism to control the glucose levels in the bloodstream. Rational structure-based drug design has exploited a number of promising targets for the treatment of T2D. Hepatic glycogen phosphorylase is considered to be one of the most promising therapeutic targets for the design of new hypoglycaemic drugs.

In the present study, glycogen phosphorylase b from rabbit muscle has been employed as molecular target for the kinetic studies of 9 new glucose analogues, targeting the catalytic site of the enzyme. Crystallographic studies were carried out for the most potent compound using synchrotron radiation.

In specific, the kinetic experiments, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that the analogues reduced the enzyme activity to 50% (IC₅₀ values) at concentrations that vary from 15.4μM to ~6.145μM, with DK12 being the most potent and DK10 the one with the most poor affinity. The analogue DK17 showed no inhibition of the enzyme activity at concentrations up to 1mM. In conclusion, kinetic studies have shown that the potency of the inhibitors, depends on the size, length and type of substituent at the 5' position of uracil.

To reveal the structural basis of the inhibitory potency of DK12, the crystal structure of the GPb-DK12 complex was determined at 2.0 Å resolution, and the interactions of the inhibitor with the residues and solvent molecules at the catalytic site of the enzyme were mapped. DK12 forms 17 hydrogen bonds and 78 van der Waals interactions with protein residues at the catalytic site of the enzyme. Previous studies from our laboratory with five 1-(3-Deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives have shown that the best of these inhibitors (DK2) displays a K_i value of 46 μM. Comparative structural analysis between the GPb-DK12 and GPb-DK2 complexes has provided insights for the structural basis of the differences in the inhibitory potency between the two compounds. Furthermore, the structural analyses has shown important features which can be exploited towards the development of better inhibitors

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ :

- 4 Γρηγοροπούλου Ε. & Φιλιππόπουλος Κ., (1998). Τεχνική Χημικών Διεργασιών, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα.
- 5 Ζωγράφος Σ. Ε. (2000). Κρυσταλλογραφικές και κινητικές μελέτες των ενεργών και ανενεργών διαμορφώσεων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης: Δομικός και καταλυτικός ρόλος του συνενζύμου 5-φωσφορικής πυριδοξάλης, αλλοστερική ρύθμιση του ενζύμου και μοριακή αναγνώριση. Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.
- 6 McMurry J. (2001). Οργανική Χημεία, Τόμοι I & II, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- 7 Οικονομάκος Ν. Γ. (1977). Χημική τροποποίηση ενός αλλοστερικού ενζύμου, Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.
- 8 Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*, 63, 258-261
- 9 Παπαϊωάννου Ι., 2004, Σημειώσεις Χημείας Στερεάς Καταστάσεως, Αθήνα.
- 10 Ρακιντζής Θ. Ν., 1994, Φυσικοχημεία, Έκδοση 3^η, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα.
- 11 Σμοκοβίτης Α., 2004, Φυσιολογία, Έκδοση 4^η, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
- 12 Stryer L., 1997, Βιοχημεία, Τόμος I, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- 13 Τσαγκάρης Γ., 1999, Εργαστηριακές ασκήσεις φυσικοχημείας, Σειρά 1, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα.
- 14 Τσιτσάνου Α., 2001, Διδακτορική διατριβή, Σχεδιασμός αναστολέων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα: Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες.

EENH:

- Acharya R. & Rees A. R. (1997). Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, Volume 6, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Federal Republic of Germany, 275-282.
- Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature* 340, 609-616.
- Blundell T. L. & Johnson L. N. (1976). Protein Crystallography, Academic Press, London.
- Blundell T. L., Jhoti H. & Abell C., 2002, High-throughput crystallography for lead discovery in drug design, *Nature Reviews, Drug Discovery*, Volume 1.
- Brunger A. T., 1992, Free R value - a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystals. *Nature*, 355, 472-475.
- Brunger, A.T., 1993, Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.* 49, 24-36.
- Brunger A. T., Adams P. D., Clore G. M., DeLano W. L., Gros P., Grosse-Kunstleve R. W., Jiang J. S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N. S., Read R. J., Rice L. M., Simonson T. & Warren G. L., 1998, Crystallography and NMR system; A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr.*, 5, 802-810.
- CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4), 1994, The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr.*, D50, 760-763.
- Cori C. F. & Cori G. T., 1936, Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new ester, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 34, 702-705.
- Davis A.M., Teague S.J. and Kleywegt G.J. 2003, Application and Limitations of X-ray Crystallographic Data in Structure-Based Ligand and Drug Design. *Angew.Chem. Int. Ed.*, 42, 2718-2736.
- Diamond J., 2003, The double puzzle of diabetes, *Nature*, 423, 599-602.
- Drenth, J., 2002, Principles of protein x-ray crystallography, Springer, New York.
- Fiske C. H. & Subbarow Y., 1925, The colorimetric determination of phosphorus, *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.
- Fletterick R. J. & Madsen N. B., 1980, The structures and related functions of phosphorylase α , *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 31-61.

- Johnson L. N. & Hajdu J., 1989, Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals, *Biophysics & Synchrotron Radiation*, Hasnain S. ed, 142-155, Ellis Horwood, Chichester.
- Kam Z., Shore H. B. & Feher G., 1978, On the crystallization of proteins, *J. Mol. Biol.*, 123, 539-555.
- Kurukulasuriya R., Link J.T., Madar D.J., Pei Z., Richards S.J., Rohde J.J., Souers A.J. and Szczepankiewicz B.G. 2003. Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of the hepatic glucose production. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 123-153.
- Leatherbarrow, R. J., 1990, Using linear and non-linear regression to fit biochemical data, *TIBS*, 15, 455-458.
- Martin J. L., Johnson L. N. & Withers S. G., 1990, Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b, *Biochemistry*, 29, 10745-10757.
- McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., 2000, *Essentials of Exercise Physiology*, Τόμος Ι, Έκδοση 2^η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.
- McLaughlin, P.J., Stuart, D.I., Klein, H.W., Oikonomakos, N.G., and Johnson, L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry* 23, 5862-5873.
- McPherson, A., 1997, *Crystallization of biological macromolecules*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Melpidou A. E. & Oikonomakos N. G., 1983, Effects of glycose-6-P on the catalic and structural properties of glycogen phosphorylase α , *FEBS Lett.*, 154, 105-110.
- Mikol V. & Giege R., 1992, *The physical chemistry of protein crystallization; Crystallization of Nucleic acids and proteins. A practical approach*, Decruix A. & Giege R. eds, IRL Press.
- Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., 1963, Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, *J. Mol. Biol.*, 6, 306-329.
- Monod J., Wyman J. & Changeux J-P., 1965, On the nature of allosteric transitions: a plausible model, *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118.

- Oikonomakos N. G., Melpidou A.E & Johnson L. N., 1985, Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalic characterization, *Biochem. Biophys. Acta*, 832, 248-256.
- Oikonomakos N. G., Acharya K. R. & Johnson L. N., 1992, Post-Translational Modifications of Proteins, Harding J. J. & Crabbe M. J. C. eds, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-127.
- Oikonomakos, N.G., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E. and Johnson, L.N. (2000a). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.* 275, 34566-34573.
- Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G. and Johnson, L.N. (2000b). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* 8, 575-584.
- Oikonomakos, N.G. 2002, Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586
- Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák L., Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B. and Gergely, P., 2002, The binding of N'-acetyl- and Benzoyl-N'-β-D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696.
- Oikonomakos, N. G.; Somsak, L. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2008, 9, 379.
- Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinowetz A.M., McPherson R.K., Olson T.V., Treadway J.L. and Hoover D.J., 2000, Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at new allosteric site. *Chemistry and Biology*, 7, No 9, 677-682.
- Rhodes G, 1993, *Crystallography made crystal clear*, Academic Press Inc., London.
- Rossman, M.G., Arnold, E., 2001, *International Tables of Crystallography*, Vol. F, The international union of crystallography.
- Saheki, S., Takeda, A. & Shimazu, T., (1985), Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity, *Anal. Biochem.*, 148, 277-281.
- Segel, L.H., 1975, *Enzyme kinetics*, Wiley interscience, New York.

- Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. 2008, New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983
- Sprang S. R., Goldsmith E. J., Fletterick R. J., Withers S. G. & Madsen N. B., 1982, Catalytic site of glycogen phosphorylase: Structure of the T state and specificity for α -D-glucose, *Biochemistry*, 21, 5364-5371.
- Sprang S. R., Goldsmith E. J., Fletterick R. J., Withers S. G. & Madsen N. B., 1982, Catalytic site of glycogen phosphorylase: Structure of the T state and specificity for α -D-glucose, *Biochemistry*, 21, 5364-5371.
- Taylor, G., 2003, The phase problem *Acta Crystallogr.*, D59, 1881-1890.
- Tsirkone G.V, Tsoukala E. , Lamprakis C. , Manta S. , Hayes M. J., Skamnaki T. V., Drakou C., Zographos E. S., Komiotis D, Leonidas D.D., 2010, 1-(3-Deoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 3413–3425.
- Witters L. A. & Avruch J., 1978, Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase, *Biochemistry*, 17, 406-410.