



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Α. ΚΑΝΤΣΑΔΗ

Βιοχημικός - Βιοτεχνολόγος

Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ
ΝΕΩΝ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Λάρισα 2015

Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΝΕ-
ΩΝ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

- **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Λεωνίδας Δημήτριος (Επιβλέπων Καθηγητής)

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κοντού Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

- **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Ηλιόπουλος Ηλίας

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Χολή-Παπαδοπούλου Θεοδώρα

Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Κοντοπίδης Γεώργιος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λεωνίδας Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κοντού Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σκαμνάκη Βασιλική

Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Λ. ΚΑΝΤΣΑΔΗ

Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΝΕ-
ΩΝ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Λ. ΚΑΝΤΣΑΔΗ

2015

Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΝΕ-
ΩΝ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: viii

Συνολικός αριθμός σελίδων: 310

Αριθμός πινάκων: 25

Αριθμός εικόνων: 128

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 235

Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχει παρουσιασθεί στις ακόλουθες δημοσιεύσεις:

Glycogen Phosphorylase as a Target for Type 2 Diabetes: Synthetic, Biochemical, Structural and Computational Evaluation of Novel N-acyl-N'-(β-D-glucopyranosyl) Urea Inhibitors. **Kantsadi, A.L.**, Parmenopoulou, V., Bakalov, D.N., Snelgrove, L., Stravodimos, G.A., Chatzileontiadiou, D.S., Manta, S., Panagiotopoulou, A., Hayes, J.M., Komiotis, D., Leonidas, D.D. (2015) *Curr Top Med Chem.* 15 (23), 2373-2389.

Structure based inhibitor design targeting glycogen phosphorylase b. Virtual screening, synthesis, biochemical and biological assessment of novel N-acyl-beta-D-glucopyranosylamines. Parmenopoulou, V*, **Kantsadi, A.L.***, Tsirkone, V.G.*, Chatzileontiadiou, D.S.M., Manta, S., Zographos, S.E., Molfeta, C., Archontis, G., Agius, L., Hayes, J.M., Leonidas, D.D., and Komiotis, D. (2014) *Bioorg. & Med. Chem.* 22 (17), 4810-4825.

The binding of C5-alkynyl and alkylfurano[2,3-d]pyrimidine glucopyranonucleosides to glycogen phosphorylase b. Synthesis, biochemical and biological assessment. **Kantsadi, A.L.**, Manta, S., Psarra, A.-M.G., Dimopoulou, A., Kiritsis, C., Parmenopoulou, V., Skamnaki, V.T., Zoumpoulakis, P., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., and Komiotis D. (2012) *Eur. J. Med. Chem.* 54, 740-749.

The σ-hole phenomenon of halogen atoms form the structural basis of the strong inhibitory potency of C-5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b. **Kantsadi, A.L.**, Hayes, J.M., Manta, S., Skamnaki, V.T., Kiritsis, C., Psarra, A.-M.G., Koutsogiannis, Z., Dimopoulou, A., Theofanous, S., Nikoleousakos, N., Zoumpoulakis, P., Kontou, M., Papadopoulos, G., Zographos, S.E., Komiotis, D., and Leonidas, D.D. (2012). *ChemMedChem* 7, 722-732.

Ευχαριστίες

Η πολύχρονη αυτή διαδρομή που λέγεται διδακτορική διατριβή ξεκίνησε για μένα στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η πρώτη σελίδα αυτού του κειμένου είναι ουσιαστικά η τελευταία σελίδα σε αυτό το πολύχρονο «ταξίδι» της γνώσης και της προσπάθειας, και είναι εξίσου σημαντική με όσα αναλύονται στις επόμενες σελίδες της παρούσας διατριβής.

Πως μπορείς άλλωστε μέσα σε λίγες γραμμές να περιγράψεις με λόγια όλη την ευγνωμοσύνη σου για τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της δημιουργικής και δύσκολης προσπάθειας όλα αυτά τα χρόνια, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ηθικό επίπεδο.

Ο πρώτος άνθρωπος που θα ήθελα να αναφερθώ είναι ο επιβλέπωντας καθηγητής της παρούσας διατριβής, Αναπληρωτής Καθηγητής Δημήτρης Δ. Λεωνίδα. Θα μπορούσα να ξοδέψω αρκετές ώρες αναλύοντας τους λόγους για τους οποίους είμαι ευγνώμων για αυτή τη συνεργασία, αλλά θα προσπαθήσω να συνοψίσω τις σκέψεις μου μέσα σε λίγες γραμμές. Αρχικά θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη και πίστη που έδειξε στο πρόσωπο μου, από την πρώτη μέρα που πέρασα την πόρτα του γραφείου του, μεταπτυχιακή φοιτήτρια τότε. Ως πραγματικός δάσκαλος συνέβαλλε στη διαμόρφωση της σκέψης μου, και η διαρκής αναζήτηση και αγάπη του για την έρευνα με ενέπνευσαν όλα αυτά τα χρόνια. Οι συμβουλές, η καθοδήγηση, η υπομονή και η συνεχής ενθάρρυνση του μου έδιναν πάντα την δύναμη να συνεχίζω και να πηγαίνω ένα βήμα παρακάτω, στον μακρύ αυτό δρόμο. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την ανεκτίμητη βοήθεια και τις παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια της συγγραφής της διατριβής και τις πολυώρες επιστημονικές συζητήσεις που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της. Τέλος, εκτός από την ανεκτίμητη επιστημονική βοήθεια του σε όλους τους τομείς, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ολόψυχα για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση σε ανθρώπινο επίπεδο αλλά και την αγάπη και τον ενθουσιασμό που με μετέδωσε για την έρευνα και θα ευχηθώ κάποια μέρα στο μέλλον οι δρόμοι μας να διασταυρωθούν ξανά.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Κοντού Μαρία, για την εμπιστοσύνη και τη στήριξη της όλα αυτά τα χρόνια, καθώς το ταξίδι μου στην έρευνα ξεκίνησε πριν πολλά χρόνια από το γραφείο της. Οι συμβουλές της, οι παρατηρήσεις και η πίστη της συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση των σπουδών μου αλλά και της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Λέκτορα Σκαμνάκη Βασιλική, για την πολύτιμη βοήθεια της καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω επίσης για την στήριξη, τις συμβουλές και τις εποικοδομητικές συζητήσεις μας, αλλά και για την συνολική, ουσιαστική συμβολή της στην ολοκλήρωση της διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρο Καθηγήτρια Ψαρρά Άννα-Μαρία για την βοήθεια, τις συμβουλές της και τη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Ηλιόπουλο Ηλία, την Καθηγήτρια Χολή-Παπαδοπούλου Θεοδώρα και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κοντοπίδη Γεώργιο, για την τιμή που μου κάνανε να βρίσκονται στην εξεταστική επιτροπή, για τον χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση και κρίση της διατριβής, αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους καθηγητές και συναδέλφους μου στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια, ενώ θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Μπαλατσό Νικόλαο ως μέλος του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη συνεργασία, την ευγένεια του, τις συμβουλές του και τη βοήθεια του από την πρώτη μέρα μου στο εργαστήριο.

Σε όλο αυτό το ταξίδι, συνοδοιπόροι στάθηκαν οι συνάδελφοι μου, τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας που υπήρξαν πολλοί, γι' αυτό εκ των προτέρων ας με συγχωρήσουν κάποιοι αν τους λησμονήσω. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους υποψήφιους διδάκτορες Κυρίτση Θάνο, Μαραγκοζίδη Παναγιώτη και Γοργογιέτα Βύρωνα για την συνεργασία μας και την βοήθεια τους. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον μεταπτυχιακό φοιτητή Κυριάκη Ευθύμη για όλη τη βοήθεια και την συμπαράσταση του αλλά και το ευχάριστο περιβάλλον που δημιουργούσε πάντα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μπέτα Ραφαηλία αλλά και την απόφοιτο Λίγγη Παναγιώτα για την συμπαράσταση τους, την στήριξη τους και τις εποικοδομητικές και ευχάριστες συζητήσεις μας. Τέλος την μεγαλύτερη ευγνωμοσύνη μου θέλω να εκφράσω στους συναδέλφους μου, υποψήφιους διδάκτορες, μα πάνω από όλα φίλους μου, Στραβοδήμο Γεώργιο και Χατζηλεοντιάδου Δήμητρα. Θέλω να τους ευχαριστήσω για όλη τη βοήθεια, την κατανόηση αλλά και τη σχέση αλληλοβοήθειας που αναπτύχθηκε μεταξύ μας, αλλά και για όλες τις πολύτιμες εμπειρίες και αναμνήσεις κατά την παραμονή μας στους σταθμούς συγχροτρονικής ακτινοβολίας. Επίσης θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για την στήριξη και τη συμπαράσταση τους καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αλλά και κατά τη διάρκεια της συγγραφής. Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη, παλαιά και νεότερα, του εργαστηρίου που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της διατριβής.

Σημαντική υπήρξε όλα αυτά τα χρόνια η παρουσία στη ζωή μου ανθρώπων που με τη φιλία και την κατανόηση τους με βοήθουσαν να ξεπερνάω τις δυσκολίες που προέκυπταν. Θέλω να ευχαριστήσω τους συμπαραστάτες μου όλα αυτά τα χρόνια, Ευπνητού Ανδρομάχη, Αργύρη Ματίνα, Κοντοπούλου Χρύσα, Τανταλάκη Άγγελο για όλη τη συμβολή τους, την υποστήριξη, την υπομονή, την ενθάρρυνση, τη δύναμη και την αγάπη τους όλα αυτά τα χρόνια.

Τις τελευταίες γραμμές θέλω να τις αφιερώσω στην οικογένεια μου. Στους γονείς μου Λάζαρο και Χρυσούλα και τον πολυαγαπημένο δίδυμο αδερφό μου Θεόφιλο, που πάντα στήριζαν και στηρίζουν τις επιλογές μου και βρίσκονται δίπλα μου σε όλα τα βήματα μου. Η εμπιστοσύνη τους, η πίστη τους και η αγάπη τους ήταν και είναι πάντα η δύναμη μου για να εκπληρώνω τους στόχους μου. Τους ευγνωμονώ για όλη την προσπάθεια και τη συμπαράσταση τους όλα αυτά τα χρόνια καθώς χωρίς αυτούς δεν θα είχα καταφέρει τίποτα. Ελπίζω να τους κάνω πάντα υπερήφανους.

Λάρισα, Δεκέμβριος 2015

Καντσάδη Α. Αναστασία

*Σε όσους επιμένουν στην αναζήτηση της γνώσης,
με την ελπίδα να νιώσουν κάποτε αληθινά ελεύθεροι*

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. Εισαγωγή	9
1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης	9
1.2 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενος).....	10
1.3 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II (μη ινσουλινοεξαρτώμενος).....	11
1.4 Μεταβολισμός γλυκόζης σε φυσιολογική και διαβητική κατάσταση.....	13
1.5 Μεταβολισμός του γλυκογόνου	15
1.5.1 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου	17
1.5.2 Σύνθεση γλυκογόνου	19
1.6 Ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου.....	20
1.6.1 Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου.....	21
1.6.2 Ο ρόλος της ινσουλίνης στο μεταβολισμό του γλυκογόνου.....	22
1.6.3. Ο ρόλος της γλυκόζης στο μεταβολισμό του γλυκογόνου	23
1.6.4 Αλλοστερικός έλεγχος του μεταβολισμού του γλυκογόνου.....	23
2. Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων	26
2.1 Εισαγωγή.....	26
2.2 Επιλογή στόχου για την ανάπτυξη φαρμάκου	27
2.3 Προσδιορισμός της δομής πρωτεΐνης - στόχου	28
2.4 Προσδιορισμός πρόδρομων ενώσεων.....	29
2.5 Αξιολόγηση και βελτιστοποίηση των πρόδρομων φαρμακευτικών ενώσεων.....	29
2.6 Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II ...	34
3. Η Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	40
3.1 Γενική περιγραφή του ενζύμου.....	40
3.2 Αλλοστερικές ιδιότητες φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	42
3.3 Ρόλος της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP).....	47
3.4 Δομικά χαρακτηριστικά φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	48
3.5 Κέντρα σύνδεσης ως στόχοι του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων	50
4. Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ	68
4.1 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	68
4.1.1. Στάδια κρυστάλλωσης	70

4.1.2 Διάγραμμα φάσης	73
4.1.3 Μέθοδοι κρυστάλλωσης	76
4.2 Κρύσταλλοι πρωτεϊνών.....	77
4.3 Ακτινοβολία Χ και περίθλαση.....	81
4.4 Δείκτες Miller	86
4.5 Νόμος του Bragg.....	87
4.6 Ανάλυση Fourier.....	89
4.7 Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας	92
4.8 Αξιολόγηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	93
4.9 Βελτιστοποίηση του πρωτεϊνικού μοντέλου.....	96
4.10 Έλεγχος της αξιοπιστίας του πρωτεϊνικού μοντέλου.....	97
Αντικείμενο μελέτης	101
5. Υλικά και Μέθοδοι	110
A. Παρασκευαστικές μέθοδοι.....	110
5.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κονίκλων	110
5.2 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> με χημική μέθοδο.....	112
5.3 Μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> με πλασμιακό φορέα.....	114
5.4 Απομόνωση της HRV 3C πρωτεάσης (3C PreScission Protease).....	115
5.4.1 Υπερέκφραση της HRV 3C πρωτεάσης σε βακτηριακά στελέχη <i>E.coli</i> B834 (DE3)	115
5.4.2 Λύση των βακτηριακών κυττάρων	117
5.4.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της HRV 3C πρωτεάσης.....	117
5.5 Απομόνωση της γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης (γ-PhK) με υπερέκφραση σε βακτηριακά στελέχη <i>E.coli</i> B834 (DE3).....	119
5.5.1 Υπερέκφραση της γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης (γ-PhK) σε βακτηριακά στελέχη <i>E.coli</i> B834 (DE3)	120
5.5.2 Λύση των βακτηριακών κυττάρων	121
5.5.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της καταλυτικής υπομονάδας γ της κινάσης της φωσφορυλάσης.....	121
5.6 Απομόνωση της πρωτεάσης TEV (Tobacco Etch Virus protease).....	124
5.6.1 Υπερέκφραση της TEV πρωτεάσης σε βακτηριακά στελέχη <i>E.coli</i> BL21 (DE3) Gold	124
5.6.2 Λύση των βακτηριακών κυττάρων	125
5.6.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της πρωτεάσης TEV	126

5.7 Απομόνωση ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (h1GP)	128
5.7.1 Υπερέκφραση της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (h1GP) σε βακτηριακά κύτταρα <i>E.coli</i> BL21 (DE3) Gold.....	128
5.7.2 Λύση των βακτηριακών κυττάρων	129
5.7.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (h1GPb).....	130
5.8 Παρασκευή ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου a	133
5.9 Παρασκευή μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου a.....	134
5.10 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb	135
B. Αναλυτικές μέθοδοι	137
5.11 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	137
5.11.1 Μέθοδος Bradford	137
5.11.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός	137
5.12 Κινητική μελέτη μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	138
5.12.1 Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	138
5.12.2 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρώματος α -D-Glc-1-P	139
5.12.3 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb	139
5.12.4 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)	140
5.12.5 Προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ιόντων- Μέθοδος ασκορβικού οξέος.....	141
5.12.6 Προσδιορισμός της K_i αναστολέων στη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου b.....	142
5.13 Κινητική μελέτη μυϊκής κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	143
5.13.1 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m).....	144
5.13.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της γ -PhK ως προς ATP.....	144
5.13.3 Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της GPa	145
5.14 Κινητική μελέτη ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	145
5.14.1 Βελτιστοποίηση κινητικών συνθηκών.....	146
5.14.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis –Menten (K_m)	146
5.14.3 Προσδιορισμός της K_i αναστολέων στην ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου a.....	147
5.15 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit	147
5.15.1 Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας GP και τυπικών αποκλίσεων.....	148
5.15.2 Υπολογισμός κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} για την GP	148

5.15.3 Υπολογισμός της φαινόμενης K_m ($K_{m,app}$) και της σταθεράς αναστολής K_i – μοντέλο συναγωνιστικής αναστολής (competitive inhibition)	149
5.15.4 Υπολογισμός κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} για την γ -PhK	150
Γ. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων	151
5.16 Επιλογή κρυστάλλων	151
5.17 Εμβάπτιση κρυστάλλου και τοποθέτησή του σε τριχοειδείς σωλήνες	152
5.18 Έκθεση κρυστάλλου στις ακτίνες X	153
6. Αποτελέσματα- Συζήτηση	155
A. Αποτελέσματα παρασκευαστικών μεθόδων	155
6.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κονίκλων	155
6.2 Απομόνωση της γ -καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης (γ - PhK)	155
6.3 Απομόνωση ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (h1GP)	160
B. Αποτελέσματα κινητικών μελετών	167
6.4 Κινητική μελέτη μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	167
6.5 Κινητική μελέτη γ -καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης	168
6.6 Κινητική μελέτη της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου a	169
<i>Αποτελέσματα αξιολόγησης ανασταλτικής δράσης αναλόγων γλυκόζης στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου</i>	170
7. Μελέτες C5-αλογοουποκατεστημένων γλυκοκυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης	172
7.1 Κινητικές μελέτες	172
7.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες	174
7.2.1 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων	174
7.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης	175
8. Μελέτες C5- αλκυνύλ και αλκυλφουρανό[2,3-d] πυριμιδινό- γλυκοκυρανονουκλεοζιτών	186
8.1 Κινητικές μελέτες	187
8.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες	188
8.2.1 Συλλογή και βελτιστοποίηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων	188
8.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης	191
9. Μελέτη N-ακυλ-β-D- γλυκοκυρανοζυλαμινών	204
9.1 Κινητικές μελέτες	205
9.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες	207

9.2.1 Συλλογή και βελτιστοποίηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	207
9.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης.....	210
10. Μελέτη αναλόγων N-ακυλ-β-D-γλυκοπυρανοζυλουργίας.....	220
10.1 Κινητικές μελέτες.....	221
10.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες.....	222
10.2.1 Συλλογή και βελτιστοποίηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	222
10.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης.....	225
11. Μελέτες C-1,2,4-τριάζολο γλυκοπυρανονουκλεοζιτών.....	232
11.1 Κινητικές μελέτες.....	233
11.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες.....	235
11.2.1 Συλλογή και βελτιστοποίηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	235
11.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης.....	237
12. Μελέτες C-β-D-ιμιδάζολο γλυκοπυρανονουκλεοζιτών.....	254
12.1 Κινητικές μελέτες.....	255
12.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες.....	257
12.2.1 Συλλογή και βελτιστοποίηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	257
12.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης.....	259
13. Ο ρόλος του συνδέτη.....	276
14. Σύγκριση με τη δομή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	278
Summary.....	280
Βιβλιογραφία.....	282

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο διαβήτης τύπου II, μια από τις πιο σοβαρές μεταβολικές διαταραχές χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία και αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης. Σήμερα, αντιπροσωπεύει το 90% των ασθενών με διαβήτη. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί ένα βασικό ένζυμο του μεταβολισμού καθώς καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου προς παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης. Μιας και στο ήπαρ το γλυκογόνο είναι η πηγή γλυκόζης για τη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στο αίμα, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) αποτελεί ένα σημαντικό φαρμακευτικό στόχο πιστοποιημένο για την ανάπτυξη νέων αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων (αναστολέων της ενζυμικής δράσης) στο πλαίσιο της καταπολέμησης του διαβήτη τύπου II. Η ανακάλυψη αναστολέων βασίζεται στη γλυκόζη, το φυσικό αναστολέα του ενζύμου, που συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο. Η ανακάλυψη ανάλογων γλυκόζης τα οποία θα προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο και θα εμφανίζουν υψηλότερη ανασταλτική ισχύ από αυτήν ήταν ο στόχος της παρούσας διατριβής. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του κατευθυνόμενου-από-τη-δομή σχεδιασμού αναστολέων. Η μέθοδος συνίσταται στην ανάλυση της μοριακής αρ-

χιτεκτονικής που υπαγορεύει τη μοριακή αναγνώριση και εξειδίκευση του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου και στην αποτίμηση της ανασταλτικής δράσης κάθε νέου ανάλογου γλυκόζης ακολουθώντας μια συνεχή σπειροειδή πορεία δομικής ανάλυσης και αποτίμησης της βιοδραστικότητας η οποία τελικά οδηγεί σε έναν πολύ ισχυρό αναστολέα.

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, μελετήθηκαν συστηματικά έξι διαφορετικές ομάδες ενώσεων αρχικά έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κόνι-κλους και τελικά έναντι της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Με κινητικές μελέτες προσδιορίστηκε η βιοδραστικότητα και η σταθερά αναστολής (K_i) τους ενώ η κρυσταλλογραφική μελέτη των ενζυμικών συμπλόκων των αναστολέων απεκάλυψε τη δομική βάση της αναστολής τους.

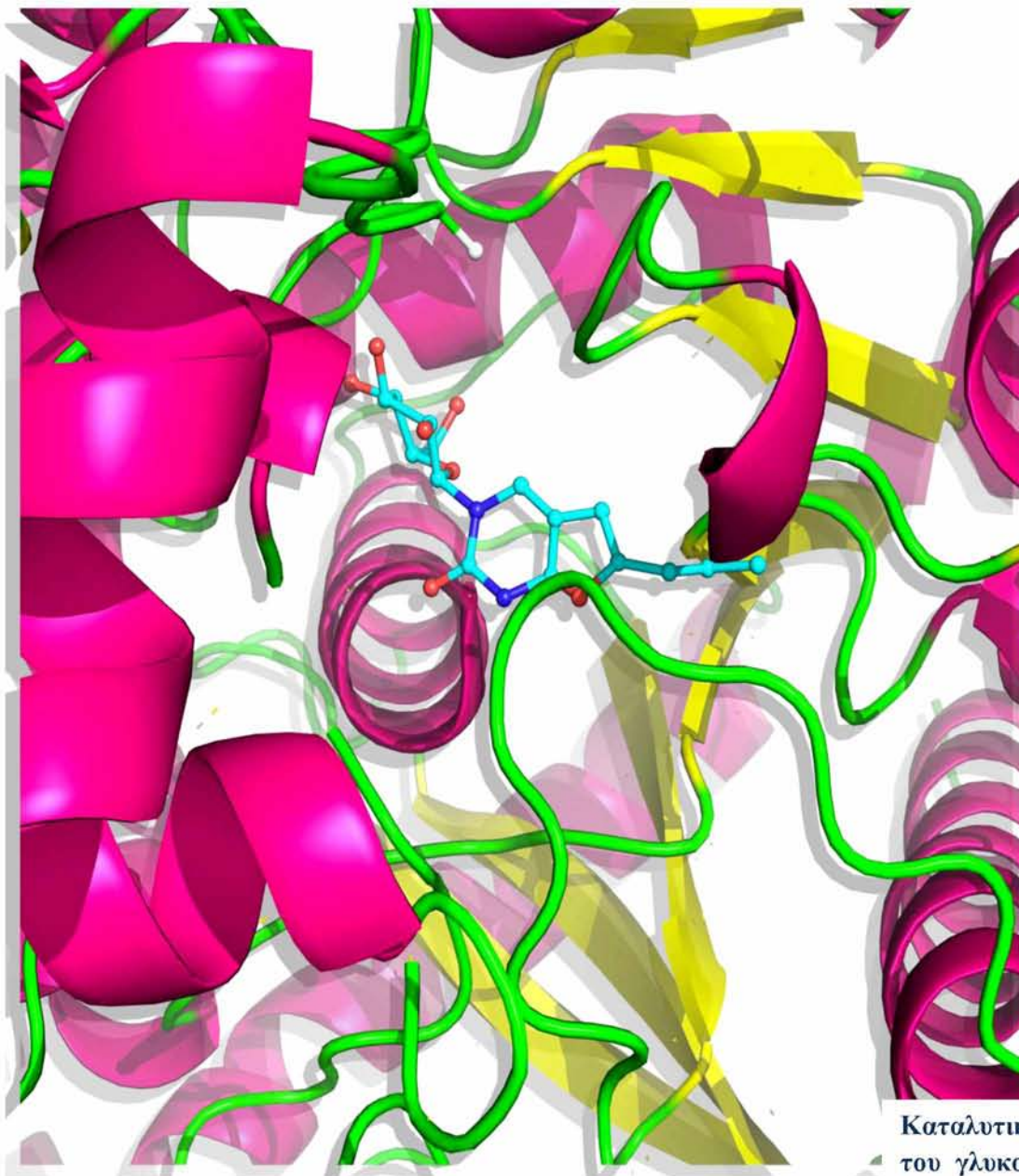
Η πρώτη ομάδα αναστολέων που μελετήθηκε ήταν οι C5-αλογονοϋποκαστεστημένοι γλυκοπυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι έφεραν στη θέση C5 της ουρακίλης ως υποκαταστάτες αλογόνα, με τον ClcClU να είναι ο πλέον βιοδραστικός ($K_i=1,02 \mu\text{M}$). Η επόμενη ομάδα αναστολέων αποτελούνταν από τους C5- αλκυνοϋλ και αλκυλφουρα-

νό[2,3-d] πυριμιδινό- γλυκοπυρανονουκλεοζίτες στους οποίους τα αλογόνα στη θέση C5 της ουρακίλης αντικαταστάθηκαν από υδρόφοβες ομάδες διαφορετικού μεγέθους και μήκους με στόχο τα νέα μόρια να αλληλεπιδράσουν με αμινοξικά κατάλοιπα μιας υδρόφοβης περιοχής του καταλυτικού κέντρου, την περιοχή της β-εσοχής. Τα αποτελέσματα της σύνδεσης τους ανέδειξαν τη σημαντικότητα της ομάδας η οποία ενώνει τη γλυκοπυρανόζη με έναν υποκαταστάτη R. Έτσι, στις επόμενες ομάδες αναστολέων που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ομάδες συνδέτη με στόχο οι υποκαταστάτες R να αλληλεπιδράσουν με ακόμα περισσότερο αμινοξικά κατάλοιπα της β-εσοχής. Μελετήθηκαν μια ομάδα N-ακυλ-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμινών που έφερε την ομάδα -NHCO- ως συνδέτη και επιλεγμένες ομάδες υποκαταστατών, που προέκυψαν μετά από υπολογιστική διαλογή 1888 ενώσεων της βάσης δεδομένων ZINC. Στη συνέχεια, οι πλέον βιοδραστικοί αναστολείς αυτής της ομάδας χρησιμοποιήθηκαν ως ικρίωμα για το σχεδιασμό και τη μελέτη μιας νέας ομάδας αναστολέων, τις N-ακυλ-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρίες όπου ο συνδέτης -NHCO- αντικαταστάθηκε από τον -NHCONHCO-. Τα αποτελέσματα έδειξαν

πως αυτός ο συνδέτης είναι ο πλέον κατάλληλος για την αύξηση της βιοδραστικότητας.

Οι τελευταίες ομάδες αναστολέων που εξετάστηκαν έφεραν ετεροκυκλικούς δακτυλίους ως συνδέτη και υποκαταστάτες διαφορετικού μήκους και μεγέθους. Η μελέτη των C-γλυκοπυρανοζυλο-1,2,4 τριάζολο και 4(5)-αρυλο-2-C-γλυκοπυρανοζυλο-ιμιδάζολο αναστολέων οδήγησε στην ανακάλυψη ιδιαίτερα ισχυρών αναστολέων με σταθερές αναστολής της τάξης των nM. Ο πλέον ισχυρότερος όλων, (BEva349) εμφάνισε σταθερά αναστολής, $K_i = 26$ nM, και αποτελεί τον πλέον ισχυρό αναστολέα του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σήμερα. Η βιοδραστικότητα των τελευταίων αυτών ομάδων εξετάστηκε και στην ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Τα αποτελέσματα επαλήθευσαν την ισχυρή ανασταλτική ισχύ αυτών των αναστολέων και έναντι του φαρμακευτικού στόχου ενώ παράλληλα απέδειξαν την ασφαλή χρήση πειραματικών δεδομένων της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κονίκλους για το σχεδιασμό αναστολέων για το ανθρώπινο ηπατικό ισοένζυμο.

Εισαγωγή



Καταλυτικό κέντρο φωσφορυλάσης του γλυκογόνου: Πρόσδεση αναστολέα στην β-εσοχή του καταλυτικού κέντρο (Kantsadi et al. 2012)

1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές και έχει εξελιχθεί σε μια από τις σημαντικότερες απειλές για την παγκόσμια υγεία (Lorenzo et al. 2010). Στα τέλη του 20^{ου} αιώνα υπήρξε μια δραματική αύξηση των ασθενών που διεγνώσθησαν με σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως. Ο σακχαρώδης διαβήτης χαρακτηρίζεται από χρονίως αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης προσβάλλοντας περίπου 6% του ενήλικου πληθυσμού στις δυτικές κοινωνίες (Moller 2001).

Ο σακχαρώδης διαβήτης έχει μια σειρά από σοβαρές επιπλοκές, όπως χρόνια νεφροπάθεια, καρδιαγγειακή νόσο, βλάβες του αμφιβληστροειδούς χιτώνα, βλάβες των νεφρών, που οδηγούν σε μείωση του προσδόκιμου ορίου ζωής. Οι συνέπειες της νόσου είναι επίσης σοβαρές σε κοινωνικό και οικονομικό επίπεδο μιας και δαπανούνται σημαντικοί πόροι και κονδύλια του συστήματος υγείας στη νοσηλεία των ασθενών, ειδικά των λεγόμενων αναπτυσσόμενων χωρών) (Zimmet et al. 2001).

Η συχνότητα εμφάνισης του σακχαρώδη διαβήτη έχει υπερδιπλασιαστεί τις τελευταί-

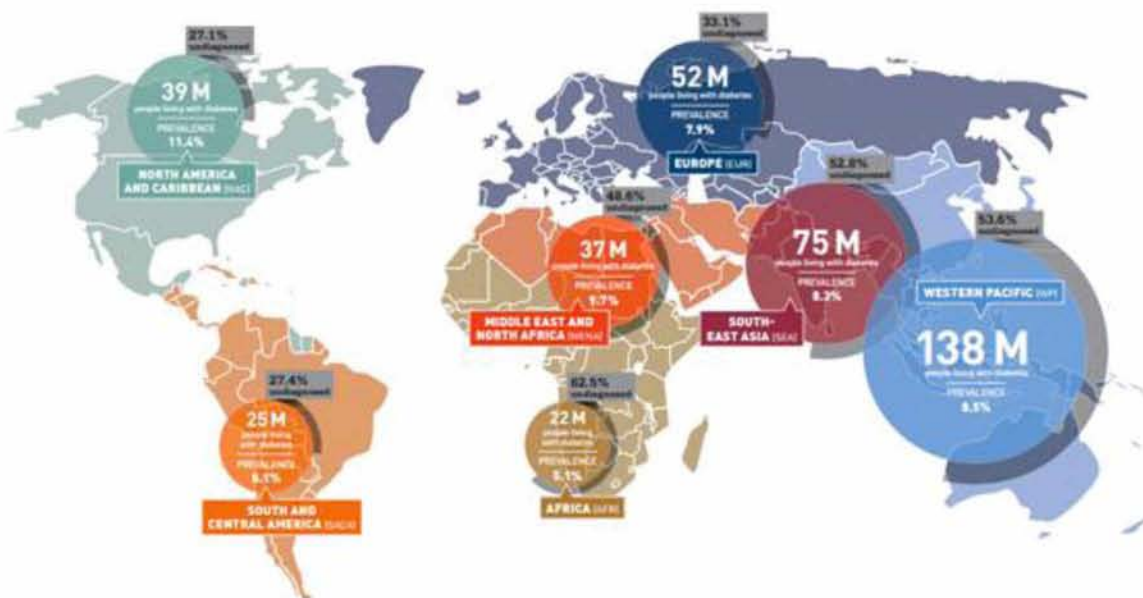
ες τρεις δεκαετίες, και έχει αυξηθεί από 153 (127-182) εκατομμύρια το 1980 σε 387 εκατομμύρια το 2014 σύμφωνα με την Διεθνή Ομοσπονδία για τον Διαβήτη (IDF). Ο αριθμός αυτός αντιπροσωπεύει το 8.3% του παγκόσμιου πληθυσμού (Εικόνα 1.1), ενώ προβλέπεται να αυξηθεί και να φτάσει περίπου τα 500 εκατομμύρια μέχρι το 2035 (IDF Ετήσια Έκθεση 2013). Η μεγαλύτερη αύξηση των ασθενών αναμένεται στις αναπτυσσόμενες χώρες της Αφρικής, της Ασίας και της νότιας Αμερικής. Τα παραπάνω δεδομένα είναι άκρως ανησυχητικά γιατί αποτυπώνουν έναν καλπάζοντα ρυθμό αύξησης των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη καθιστώντας πλέον την ασθένεια μια παγκόσμια επιδημία. Ο διαβήτης, ιδίως στις αναπτυσσόμενες χώρες, οφείλεται κυρίως στην ραγδαία αύξηση της παχυσαρκίας και στην έλλειψη σωματικής δραστηριότητας.

Σύμφωνα με στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ) ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί την 4^η αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες και υπολογίζεται ότι ευθύνεται για το 5% των θανάτων παγκοσμίως κάθε χρόνο. Παράλληλα το 80% των πασχόντων προέρχονται από χώρες με χαμηλό ή μεσαίο εισόδημα.

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. Διαχωρίζεται κυρίως σε δυο τύπους,

το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου I και το Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II.

Στην Ελλάδα το ποσοστό του πληθυσμού που πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη είναι περίπου 10%. Το 80% των ασθενών με διαβήτη τύπου II είναι παχύσαρκοι και σύμφωνα με την επιδημιολογική μελέτη της Ελληνικής Εταιρίας Παχυσαρκίας, το 41% των ανδρών και το 30% των γυναικών είναι υπέρβαροι.



Εικόνα 1.1: Κατανομή των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως (IDF)

1.2 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I (ινσουλινοεξαρτώμενος)

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I ή ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης, χαρακτηρίζεται από την καταστροφή των β-κυττάρων

του παγκρέατος, τα οποία είναι υπεύθυνα για την έκκριση ινσουλίνης. Ο διαβήτης τύπου I θεωρούνταν μια διαταραχή που εμφανιζόταν μόνο σε παιδιά και σε εφήβους, αλλά αυτή η άποψη έχει αλλάξει την τελευταία

δεκαετία και η ηλικία δεν αποτελεί πλέον περιοριστικό παράγοντα για την εμφάνιση των συμπτωμάτων της νόσου.

Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I εμφανίζεται πλήρης έλλειψη ινσουλίνης. Λόγω της ανεπάρκειας ινσουλίνης παρεμποδίζεται η είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα. Το ήπαρ παραμένει σε κατάσταση γλυκονεογένεσης και κετογένεσης ενώ αναστέλλεται η γλυκόλυση. Ο ασθενής είναι άμεσα εξαρτώμενος από την εξωγενή χορήγηση της ώστε να διατηρούνται τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα του σε φυσιολογικά επίπεδα.

Ο υψηλός λόγος γλυκαγόνης/ινσουλίνης στο 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 συγκέντρωση της είναι μεγαλύτερη από εκείνη που μπορεί να επαναρροφηθεί από τα νεφρικά σωληνάκια (Saltiel and Kahn 2001).

1.3 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II (μη ινσουλινοεξαρτώμενος)

Σε αντίθεση με το 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. Ο χαρακτηρισμός

του ως διαβήτης των ενηλίκων, οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση του σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 ετών και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών επηρεάζοντας περίπου το 2-6% των ενηλίκων του Δυτικού κόσμου. Αποτελεί τον πιο κοινό τύπο σακχαρώδη διαβήτη και υπολογίζεται ότι αντιπροσωπεύει το 90% των διαβητικών παγκοσμίως (Zimmet et al. 2001).

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II είναι πιο περίπλοκος και χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης, ελάττωση της ευαισθησίας των κυττάρων σε αυτή (ινσουλινοαντοχή) που έχει ως επακόλουθο τη μη επαρκή δράση της ινσουλίνης (Alberti et al. 2004).

Η ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη, που αποτελεί το πρώτο χαρακτηριστικό της νόσου, αρχικά εξουδετερώνεται σε ένα βαθμό από την αύξηση της παραγωγής ινσουλίνης από τα β- κύτταρα του παγκρέατος (υπερινσουλιναίμια). Στη συνέχεια όμως, το συνδυασμένο φαινόμενο της αντίστασης και της μείωσης της απελευθέρωσης της ινσουλίνης, ελαττώνει τη γλυκόζη που λαμβάνεται και χρησιμοποιείται από το σκελετικό μυ, ενώ εμποδίζει και την καταστολή της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ οδηγώ-

ντας έτσι στην εμφάνιση υπεργλυκαιμίας (αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα) (Bailey 2000).

Οι χαρακτηριστικές χρόνιες επιπτώσεις του δεν οφείλονται μόνο στην υπεργλυκαιμία. Η κατάσταση αυτή συνδυάζεται και με την αντίσταση στην ινσουλίνη η οποία εμπλέκεται στην παθογένεση και άλλων σημαντικών ασθενειών όπως αθηροσκληρωτική καρδιακή νόσος και δυσλιπιδαιμία. Ο διαβήτης επηρεάζει τις αρτηρίες του αίματος και την καρδιά αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα καρδιακών παθήσεων, εμφράγματος και άλλων προβλημάτων, όπως γάγγραινα, που οφείλονται στην κακή κυκλοφορία. Επίσης θεωρείται ως η κύρια αιτία τύφλωσης και νεφρικής ανεπάρκειας των ενηλίκων (Moller 2001).

Η προδιάθεση για εμφάνιση διαβήτη είναι μεν κληρονομική, σπουδαίο ρόλο όμως παίζει και το περιβάλλον καθώς και ο τρόπος ζωής. Η έλλειψη φυσικής άσκησης και η παχυσαρκία φαίνεται ότι επιδρούν σημαντικά στην εκδήλωση της ασθένειας.

Ο Διαβήτης τύπου II 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. Η δυσκολία πρόγνωσης της ασθένειας σε συνδυασμό με την απουσία θεραπείας έχει ως α-

ποτέλεσμα 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 για τον έλεγχο των συμπτωμάτων της ασθένειας περιλαμβάνουν ινσουλίνη, σουλφονουλουρίες, διγουανιδίνες (μετμορφίνη), αναστολείς της α-γλυκοζιτάσης, θειαζολιδινεδιόνες, τα οποία έχουν διαφορετικό τρόπο και στόχο δράσης (Somsak et al. 2008). Οι θεραπείες αυτές στοχεύουν στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, ωστόσο υπάρχουν αρκετές παρενέργειες, ενώ υπάρχει μεγάλος κίνδυνος πρόκλησης υπογλυκαιμίας. Επιπλέον, αυτές οι θεραπευτικές προσεγγίσεις έχουν αποδειχθεί ανεπαρκείς για το 30%-40% των ασθενών (Wagman and Nuss 2001, Murata et al. 2004).

Καθώς οι ήδη υπάρχουσες θεραπευτικές αγωγές για το διαβήτη τύπου II δεν είναι ικανοποιητικές κρίνεται απαραίτητη η εύρεση ενός άλλου δραστικού και ασφαλούς τρόπου ρύθμισης των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Τα τελευταία χρόνια η κατανόηση των βιοχημικών διεργασιών που σχετίζονται με αυτή την μεταβολική διαταραχή οδήγησε σε νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις

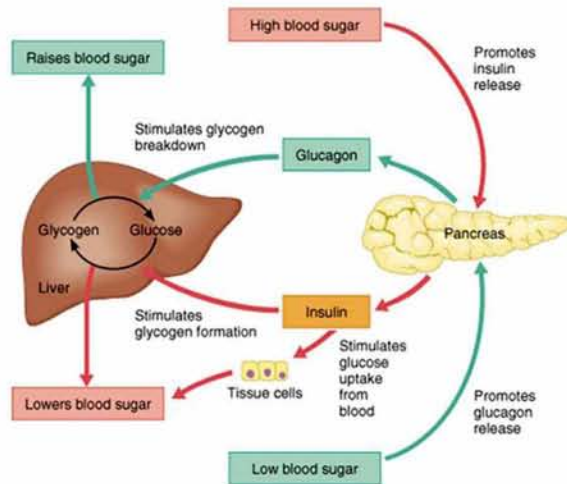
(ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνονται ευαισθητοποιητές ινσουλίνης, ανταγωνιστές του υποδοχέα γλυκαγόνης, αναστολή της παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ, συνδυαστικές θεραπείες) για τον καλύτερο έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου (Rath et al. 2000, Moller 2001, Saltiel and Kahn 2001, Treadway et al. 2001, Staehr et al. 2002, Agius 2007, Tsirkone et al. 2010).

1.4 Μεταβολισμός γλυκόζης σε φυσιολογική και διαβητική κατάσταση

Το ήπαρ είναι το κύριο όργανο που είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για το 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 δραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η συγκέντρωσή της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά τη διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης. Το ήπαρ αποτελεί

τον «αισθητήρα» γλυκόζης στον οργανισμό καθώς ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη.

Δυο είναι οι κυριότεροι ρυθμιστικοί μηχανισμοί ελέγχου της ομοιόστασης της γλυκόζης στον οργανισμό. Ο πρώτος μηχανισμός ενεργοποιείται από την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Περιλαμβάνει μια σειρά από αντιδράσεις οι οποίες πυροδοτούνται από την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης εντός του ηπατοκυττάρου, η οποία βρίσκεται σε ισορροπία με την εξωκυτταρική συγκέντρωση, λόγω της αυξημένης δράσης του μεταφορέα γλυκόζης Glut-2. Ο μεταφορέας απαντάται στο ήπαρ και τα β-κύτταρα του παγκρέατος και είναι υπεύθυνος για την ταχεία μεταφορά της γλυκόζης δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης εντός των κυττάρων του ήπατος όταν η συγκέντρωσή της είναι υψηλή. Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της γλυκοκινάσης από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Εκεί λαμβάνει χώρα η φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη (Glc-6-P) από τη γλυκοκινάση, και με αυτόν τον τρόπο δεσμεύεται εντός των κυττάρων καθώς λόγω των αρνητικών φορτίων της δεν μπορεί να διαχυθεί μέσω της μεμβράνης (Agius 1998).



Εικόνα 1.2: Ρύθμιση της έκκρισης γλυκόζης από ορμονικούς παράγοντες.

Η γλυκοκινάση είναι ένα εξειδικευμένο ισοένζυμο της εξοκινάσης στο ήπαρ το οποίο δεν αναστέλλεται από την 6-φωσφορική γλυκόζη. Η αύξηση στην συγκέντρωση της Glc-6-P προκαλεί αναστολή της δραστηρότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, αναστέλλοντας έτσι τη γλυκογονόλυση και την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιείται η συνθάση του γλυκογόνου και η σύνθεση του γλυκογόνου (Aiston et al. 2003). Η μετατόπιση της γλυκοκινάσης στο κυτταρόπλασμα συνδέεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της 2,6 διφωσφορικής φρουκτόζης, η οποία ενεργοποιεί τη γλυκόλυση και σχηματίζεται με φωσφορυλίωση της 6-φωσφορικής φρουκτόζης από το ένζυμο φωσφοφρουκτοκινάση 2.

Ο δεύτερος μηχανισμός διεγείρεται από ορμονικά σήματα και συγκεκριμένα από την

αύξηση του λόγου ινσουλίνης/ γλυκαγόνου, η οποία προκαλεί την απενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, την ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου και αύξηση της συγκέντρωσης της 2,6 διφωσφορικής φρουκτόζης με συνεπακόλουθη αναστολή στην παραγωγή γλυκόζης και διέγερση της πρόληψης γλυκόζης από τα ηπατικά κύτταρα (Agius 2007).

Η συγκέντρωση της γλυκόζης, κατά την οποία σταματά η γλυκόλυση στο ήπαρ και ξεκινά η γλυκονεογένεση εξαρτάται τόσο από ορμονικούς παράγοντες, όσο και από την έκφραση πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται στο μεταβολισμό και αποκρίνονται στις ανάγκες του οργανισμού σε κατάσταση ασιτίας. Η γλυκόλυση και η γλυκονεογένεση δεν είναι δυο αντίστροφες πορείες. Οι δυο πορείες ελέγχονται και ρυθμίζονται αυστηρά έτσι ώστε να μη λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα σε μεγάλη έκταση μέσα στο ίδιο κύτταρο (Stryer et al. 2002).

Η αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου II σε κατάσταση νηστείας οφείλεται εν μέρη μόνο σε ορμονικές μεταβολές (Basu et al. 2004). Η χρόνια υπεργλυκαιμία στο διαβήτη, οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση των πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται στο μεταβολισμό, γεγονός που επιδεινώνει περαιτέρω την μεταβολική ισορροπία, μια διαδικασία που

συχνά αναφέρεται ως «τοξικότητα γλυκόζης» (Brichard et al. 1993). Παράδειγμα αποτελεί το γεγονός πως η υπεργλυκαιμία προωθεί την έκφραση της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε μια περαιτέρω αύξηση στην παραγωγή γλυκόζης (Massillon et al. 1996) (Εικόνα 1.2).

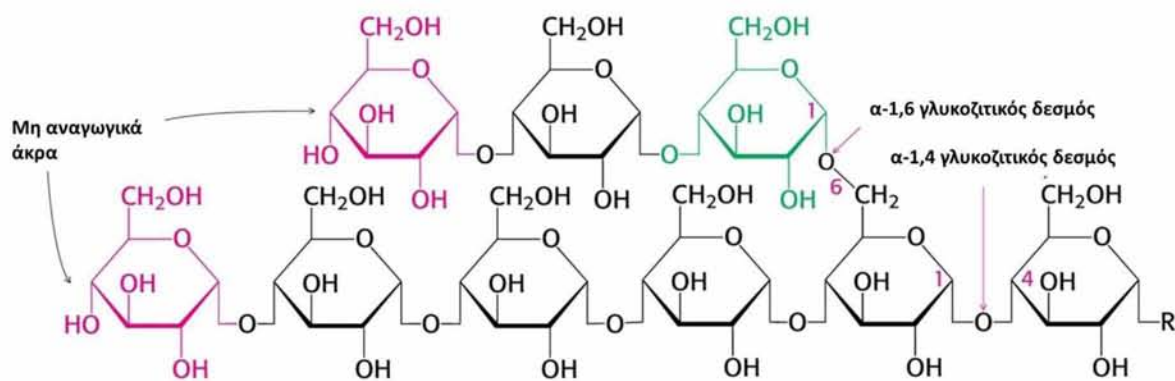
1.5 Μεταβολισμός του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο είναι μια άμεσα κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Είναι ένα μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4. Οι διακλαδώσεις που απαντούν περίπου σε κάθε δέκατο κατάλοιπο σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6 (Εικόνα 1.3) (Stryer et al. 2002).

Οι δυο κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι

υψηλότερη στο ήπαρ παρά στους μύες (10% έναντι 2% κατά βάρος) αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύες λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους (Palm et al. 2013).

Το γλυκογόνο είναι σημαντικό απόθεμα καυσίμων για διάφορους λόγους. Αρχικά, ο ελεγχόμενος μεταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη. Συνεπώς η αποικοδόμηση του γλυκογόνου, ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Επίσης η κινητοποίηση της γλυκόζης από το γλυκογόνο είναι άμεση και επομένως αυτό αποτελεί μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Τέλος σε αντίθεση με τα λιπαρά οξέα, που είναι πολύ σημαντική πηγή ενέργειας, η απελευθερούμενη γλυκόζη μπορεί να προμηθεύει ενέργεια απουσία οξυγόνου και έτσι να τροφοδοτεί με ενέργεια αναερόβιες δραστηριότητες.



Εικόνα 1.3: Δομή του γλυκογόνου. Το κατάλοιπο στο μη αναγωγικό άκρο απεικονίζεται με κόκκινο ενώ το κατάλοιπο στο οποίο αρχίζει μια διακλάδωση με πράσινο. Το υπόλοιπο του μορίου συμβολίζεται με R (Stryer et al. 2002).

Το γλυκογόνο απαντάται στο κυτταρόπλασμα με μορφή κόκκων διαμέτρου 100-400 Å. Η ποικιλία μεγεθών οφείλεται στο ότι τα μόρια δεν έχουν ορισμένο μέγεθος και το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 270.000 μέχρι 100.000.000 Da (Wanson and Drochmans 1968). Οι κόκκοι του γλυκογόνου περιέχουν τα ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεση και την αποικοδόμηση του γλυκογόνου καθώς και μερικά ακόμη ένζυμα που ρυθμίζουν αυτές τις πορείες.

Η σπουδαιότητα τόσο της σύνθεσης όσο και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου φαίνεται από το γεγονός ότι: α) ρυθμίζεται το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα και δημιουργείται μια «δεξαμενή» γλυκόζης για συνεχή μυϊκή δραστηριότητα, β) τόσο η σύνθεση όσο και η αποικοδόμηση γίνονται από διαφορετικές μεταβολικές οδούς πράγμα που αποδεικνύει μια σπουδαία βιοχημική

αρχή (Stalmans et al. 1973) γ) η ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου γίνεται με μηχανισμούς γενικότερης σημασίας - ο ρόλος της κυκλικής AMP στο συντονισμένο έλεγχο της σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου είναι σήμερα γνωστός και αποτελεί πρότυπο για τη δράση των ορμονών σε άλλα συστήματα, δ) ο μηχανισμός της αποικοδόμησης του γλυκογόνου αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αλλοστερικού ελέγχου.

Η ρύθμιση των διεργασιών της αποικοδόμησης και της σύνθεσης του γλυκογόνου είναι αρκετά περίπλοκη. Διάφορα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στον μεταβολισμό του γλυκογόνου αποκρίνονται αλλοστερικά σε μεταβολίτες που σηματοδοτούν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Οι αλλοστερικές αποκρίσεις επιτρέπουν τη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας ώστε να ικανοποι-

εί τις ανάγκες του κυττάρου στο οποίο εκφράζονται τα ένζυμα. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται επίσης από ορμονικά διεγερόμενους καταρράκτες, οι οποίοι οδηγούν σε αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των ενζύμων αλλάζοντας τις κινητικές τους ιδιότητες. Η ορμονική ρύθμιση επιτρέπει στον μεταβολισμό του γλυκογόνου να προσαρμόζεται στις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού (Stryer et al. 2002).

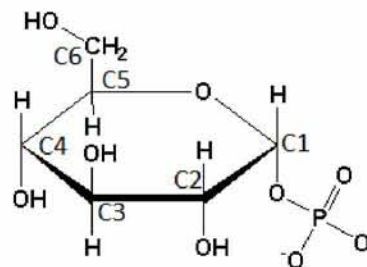
1.5.1 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η μεταβολική οδός της αποικοδόμησης του γλυκογόνου (γλυκογονόλυση) μελετήθηκε αρχικά από τους Carl & Gerty Cori (Cori and Cori 1936) (Carl Cori, βραβείο Nobel 1947) οι οποίοι απέδειξαν ότι το γλυκογόνο διασπάται προς σχηματισμό ενός νέου φωσφορυλιωμένου σακχάρου, την 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P).

Το ένζυμο κλειδί για τον καταβολισμό του γλυκογόνου είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (EC 2.4.1.1.). Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει τη φωσφορολυτική διάσπαση των α-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών με την προσθήκη ορθοφωσφορικών ιόντων προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης (Εικόνα 1.4).

Το ένζυμο καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του C-1

του τελικού καταλοίπου και του C-4 του γειτονικού καταλοίπου στο γλυκογόνο διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν και η διαμόρφωση στον C1 διατηρείται (Εικόνα 1.5). Το γλυκογόνο αποικοδομείται σε περιρισμένη έκταση από τη φωσφορυλάση. Οι α-1,6 γλυκοζιτικοί δεσμοί, στα σημεία διακλάδωσης, δεν διασπώνται από τη φωσφορυλάση. Όταν το ένζυμο φθάσει σε απόσταση 4 μονάδων γλυκόζης από μια α-1,6 διακλάδωση η δράση του σταματά. Η αποικοδόμηση ωστόσο προχωράει γιατί παρεμβαίνουν δυο ακόμα ένζυμα.

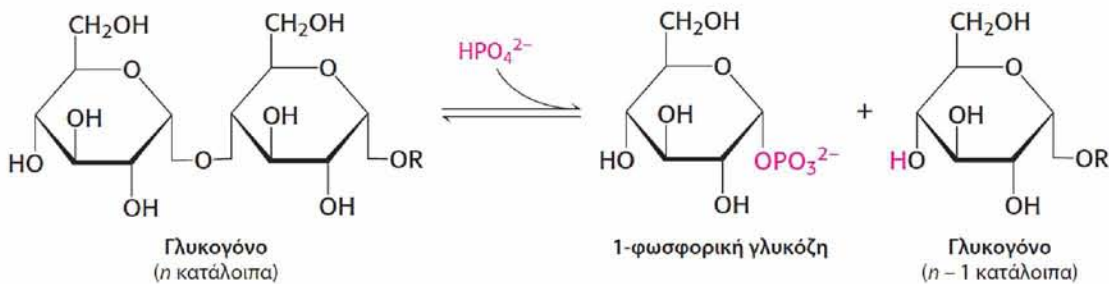
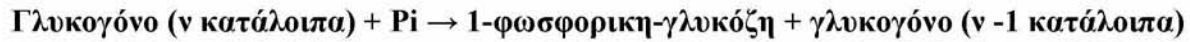


Εικόνα 1.4: Η δομή της 1-φωσφορικής γλυκόζης με την αρίθμηση των ατόμων άνθρακα.

Μια μεταφοράση και μια γλυκοζιδάση δεσμού α-1,6 ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο για να συνεχιστεί η αποικοδόμηση από την φωσφορυλάση. Η μεταφοράση μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη. Αυτή η μεταφορά αφήνει εκτεθειμένο ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6. Η γλυκοζιδάση δεσμού α-1,6 γνωστή ως το ένζυμο αποδιακλάδωσης υδρολύει τον γλυκοζιτικό

δεσμό α-1,6 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης. Αυτό το ελεύθερο μόριο γλυκόζης φωσφορυλιώνεται από το γλυκολιτικό ένζυμο εξοκινάση/ γλυκοκινάση. Έτσι η μεταφοράση

και το ένζυμο αποδιακλάδωσης μετατρέπουν την διακλαδισμένη μορφή σε γραμμική, γεγονός που ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω διάσπαση από τη φωσφορυλάση.



Εικόνα 1.5: Αποικοδόμηση γλυκογόνου (Stryer et al. 2002).

Η αντίδραση που καταλύεται από την 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 τιμή της ΔG° για την αντίδραση είναι μικρή διότι ένας γλυκοζιτικός δεσμός αντικαθίσταται από ένα φωσφοεστερικό δεσμό, ο οποίος έχει περίπου το ίδιο δυναμικό μεταφοράς.

Επειδή το σάκχαρο που προκύπτει από την αντίδραση της φωσφορυλάσης είναι φωσφορυλιωμένο δεν χρειάζεται επιπλέον φωσφορυλίωση για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία, κάτι που θα γινόταν αν το ένζυμο κατέλυε υδρολυτική διάσπαση. Σε

μια τέτοια περίπτωση θα προέκυπτε γλυκόζη η οποία θα χρειαζόταν να φωσφορυλιωθεί, καταναλώνοντας ένα μόριο ATP, για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Επομένως η φωσφορλυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά έναντι της υδρολυτικής διάσπασης. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της 1-φωσφορικής γλυκόζης, σε αντίθεση με τη γλυκόζη, είναι ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες ιονίζεται μέσα στα κύτταρα των μυών και δεν μπορεί να διαχυθεί προς το εξωτερικό του κυττάρου.

Η Glc-1-P που σχηματίζεται κατά την φωσφορλυτική διάσπαση του γλυκογόνου μετατρέπεται σε Glc-6-P με την φωσφογλυ-

κομουτάση η οποία καταλύει τη μετατόπιση της φωσφορικής ομάδας. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας από ένα φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο σερίνης της φωσφογλυκομουτάσης προς την υδροξυλική ομάδα του C-6 της 1-φωσφορικής γλυκόζης (Εικόνα 1.4). Έτσι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο προϊόν, η 1,6-διφωσφορική γλυκόζη. Η φωσφορική ομάδα από τον C-1 της 1,6-διφωσφορικής γλυκόζης μεταπηδά στη συνέχεια στο ίδιο κατάλοιπο της σερίνης με αποτέλεσμα την παραγωγή α-D-6-φωσφορικής γλυκόζης και την αναγέννηση του φωσφοενζύμου. Η α-D-6-φωσφορική γλυκόζη εισέρχεται στη γλυκολυτική πορεία με καθαρό αποτέλεσμα την αποθήκευση ενέργειας.

Η φωσφορυλιωμένη μορφή της γλυκόζης που παράγεται από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου δεν διαχέεται εύκολα έξω από τα κύτταρα. Ενώ λοιπόν στους μυς η τύχη της Glc-6-P, αν δεν μετατραπεί σε γλυκογόνο, είναι να μεταβολιστεί, στο ήπαρ υπάρχει ένα υδρολυτικό ένζυμο, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, η οποία διασπά την Glc-6-P προς σχηματισμό ελεύθερης γλυκόζης και ορθοφωσφορικού ιόντος. Σε αντίθεση με τους φωσφορικούς εστέρες της γλυκόζης που δεν διαχέονται εκτός των κυττάρων, η ελεύθερη γλυκόζη εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος

και από εκεί μεταφέρεται κυρίως στον εγκέφαλο και στους μυς.

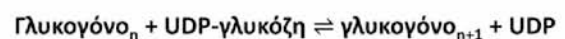
Η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης απουσιάζει από τους περισσότερους ιστούς. Συνεπώς η Glc-6-P διατηρείται στους μυς και στον εγκέφαλο για παραγωγή ATP. Αντίθετα η γλυκόζη δεν αποτελεί κύριο καύσιμο για το ήπαρ.

1.5.2 Σύνθεση γλυκογόνου

Το γλυκογόνο συντίθεται από μια διαφορετική οδό από αυτήν της αποικοδόμησής του, ακολουθώντας μια βασική αρχή της Βιοχημείας ότι οι βιοσυνθετικές και οι αποικοδομητικές οδοί στα βιολογικά συστήματα είναι σχεδόν πάντα ξεχωριστές. Το γλυκογόνο μπορεί να συντεθεί ανεξάρτητα από το πόσο μεγάλη είναι η τιμή του λόγου $[Glc-1-P]/[Pi]$.

Η συνθάση του γλυκογόνου είναι ένα καθοριστικό ρυθμιστικό ένζυμο στη βιοσύνθεση του γλυκογόνου. Η UDP-γλυκόζη, ο δότης γλυκόζης στη βιοσύνθεση του γλυκογόνου, είναι μια ενεργοποιημένη μορφή της γλυκόζης που συντίθεται από Glc-1-P και τριφωσφορική ουριδίνη (UTP) σε μια αντίδραση που καταλύεται από την πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης.

Η συνθάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση:



όπου n ο αριθμός των μορίων γλυκόζης στο μόριο του γλυκογόνου. Από την αντίδραση είναι φανερό ότι προκειμένου να δράσει το ένζυμο χρειάζεται γλυκογόνο. Στην πράξη, ο μηχανισμός της αντίδρασης είναι τέτοιος ώστε το ένζυμο να μεταφέρει γλυκόζη από την UDP-γλυκόζη σε μια αλυσίδα α -1,4 πολυμερούς γλυκόζης με ελάχιστο 4 μονάδες γλυκόζης, δημιουργώντας έναν α -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό.

Η συνθάση του γλυκογόνου προσθέτει κατάλοιπα γλυκόζης όταν η πολυσακχαριτική αλυσίδα περιέχει ήδη περισσότερα από 4 κατάλοιπα. Διαφορετικά, απαιτείται η παρουσία ενός εκκινητή, ένα εναρκτήριο μόριο, πάνω στο οποίο προσθέτονται αλυσίδες ολιγοσακχαριτών με τη δράση της συνθάσης του γλυκογόνου. Αυτή η εναρκτήρια λειτουργία διεκπεραιώνεται από μια πρωτεΐνη την γλυκογονίνη, που αποτελείται από δυο πανομοιότυπες υπομονάδες. Κάθε υπομονάδα της γλυκογονίνης καταλύει την προσθήκη οκτώ μονάδων γλυκόζης ενώ η UDP-γλυκόζη είναι ο δότης στην πορεία αυτογλυκοζυλίωσης. Στο σημείο αυτό η συνθάση του γλυκογόνου αναλαμβάνει να επεκτείνει το μόριο του γλυκογόνου (Gibbons et al. 2002).

Το γλυκογόνο όμως, ως διακλαδισμένο πολυμερές, πέρα από α -1,4 έχει και α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς που απαντώνται

στις διακλαδώσεις και συντίθενται από την άμυλο 1,4 \rightarrow 1,6 τρανσγλυκοζυλίωση, καθώς οι αρμοδιότητες της συνθάσης περιορίζονται μόνο στους α -1,4 δεσμούς. Το ένζυμο διακλάδωσης είναι μεγάλης ακρίβειας και μεταφέρει μια ομάδα δομικών μονάδων γλυκόζης, με τις προϋποθέσεις: (i) να περιλαμβάνει το μη αναγωγικό άκρο, (ii) να προέρχεται από μια αλυσίδα μήκους τουλάχιστον έντεκα μονάδων, (iii) να δημιουργεί διακλάδωση που να απέχει τουλάχιστον τέσσερις μονάδες από την προηγούμενη (Stryer et al. 2002). Το ένζυμο αυτό μεταφέρει τις 6-7 τελευταίες μονάδες γλυκόζης, σαν εξα- ή επτασακχαρίτες, μιας αλυσίδας γλυκογόνου, που επιμηκύνεται στην 6-υδροξυλομάδα μιας μονάδας γλυκόζης στην ίδια ή διαφορετική αλυσίδα. Έτσι δημιουργείται ένας α -1,6 δεσμός και μια νέα διακλάδωση στο γλυκογόνο. Στη συνέχεια, η συνθάση εξακολουθεί να επιμηκύνει τις αλυσίδες μέχρι να φθάσουν σε μήκος 10-12 μονάδων γλυκόζης οπότε επεμβαίνει πάλι το ένζυμο που δημιουργεί διακλαδώσεις.

1.6 Ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου

Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία ελέγχεται με πολλαπλούς αλληλοσυνδεόμενους μηχανισμούς που εμπεριέχουν τη ρύθμιση όλων των προαναφερθέντων ένζυμων είτε με αλ-

λοστερικούς τελεστές οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, είτε με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση ως απόκριση σε ορμονικά σήματα (Bollen et al. 1998, Agius 2010).

1.6.1 Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου

Η γλυκαγόνη και η επινεφρίνη (αδρεναλίνη) είναι δυο ορμόνες οι οποίες διεγείρουν την αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Η επινεφρίνη διεγείρει σε μεγάλο βαθμό την αποικοδόμηση του γλυκογόνου στους μυς και σε μικρότερη έκταση στο ήπαρ. Το ήπαρ είναι περισσότερο ευαίσθητο στη γλυκαγόνη, μια ορμόνη η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα του παγκρέατος όταν η συγκέντρωση του σακχάρου στο αίμα είναι χαμηλή. Φυσιολογικά η γλυκαγόνη υποδηλώνει την κατάσταση αστίας (Bollen et al. 1998). Ο καταρράκτης μεταγωγής σήματος ρυθμίζεται συνολικά από μια πορεία αντιδράσεων (Εικόνα 1.6).

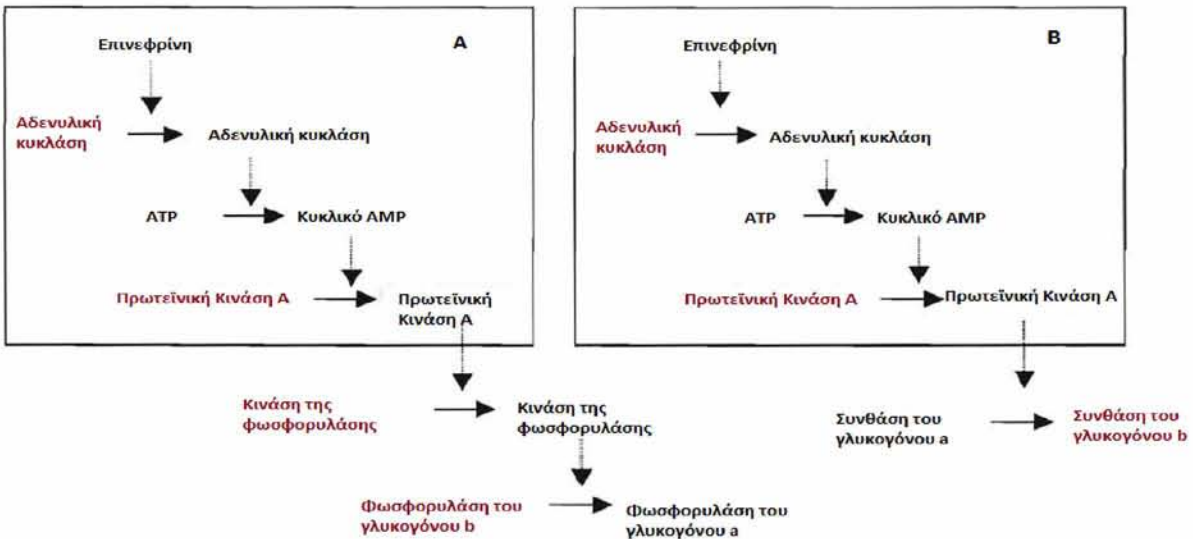
1. Η επινεφρίνη και η γλυκαγόνη προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη των μυϊκών και ηπατικών

κυττάρων αντίστοιχα. Η επινεφρίνη προσδένεται στον αδρενεργικό υποδοχέα β στους μυς, ενώ η γλυκαγόνη προσδένεται στον υποδοχέα της γλυκαγόνης. Η πρόσδεση ενεργοποιεί την υπομονάδα α της πρωτεΐνης Gs που δεσμεύει GTP.

2. Ακολουθεί ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης, μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης η οποία καταλύει το σχηματισμό της κυκλικής AMP (cAMP) από ATP.

3. Η αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση της cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA).

4. Η ενεργός PKA φωσφορυλιώνει την κινάση της φωσφορυλάσης και την καθιστά ενεργό ένζυμο, η οποία στη συνέχεια προκαλεί τη μετατροπή της ανενεργής GPb στην ενεργή μορφή GPa. Επιπλέον η PKA φωσφορυλιώνει τη συνθάση του γλυκογόνου α μετατρέποντας την στην μη δραστική μορφή β εμποδίζοντας έτσι τη σύνθεση του γλυκογόνου. Η φωσφορυλίωση των δύο αυτών ενζύμων αποτελεί τη βάση της συντονισμένης ρύθμισης της σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου.



Εικόνα 1.6: Συντονισμένος ορμονικός έλεγχος μεταβολισμού του γλυκογόνου. (Α) Αποικοδόμηση γλυκογόνου μέσω της ενεργοποίησης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. (Β) Αποικοδόμηση γλυκογόνου μέσω της απενεργοποίησης της συνθάσης του γλυκογόνου. Οι ανενεργές μορφές των ενζύμων παρουσιάζονται με κόκκινο ενώ οι ενεργές μορφές με μαύρο.

1.6.2 Ο ρόλος της ινσουλίνης στο μεταβολισμό του γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι μια διαδικασία η οποία πρέπει να τερματίζεται προκειμένου να προλαμβάνεται η περιττή κατανάλωση γλυκογόνου μετά την ικανοποίηση των ενεργειακών αναγκών. Η γλυκαγόνη είναι μια ορμόνη η οποία δίνει το αρχικό έναυσμα για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου σε περιόδους ασιτίας. Όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι υψηλά, η ινσουλίνη διεγείρει τη σύνθεση του γλυκογόνου μέσα από μια πορεία (Εικόνα 1.7) η οποία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (PP1). Το ένζυμο πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) είναι

ένα ακόμα ένζυμο το οποίο παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου καθώς η υδρόλυση των φωσφορυλιωμένων καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης των πρωτεϊνών που καταλύεται από την PP1 προκαλεί αλλαγή στην ενζυμική τους δραστηριότητα (Bollen et al. 1998).

- ♦ Το πρώτο βήμα στη δράση της ινσουλίνης είναι η δέσμευση της σε έναν υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας πρωτεϊνικής κινάσης ευαίσθητης στην ινσουλίνη.
- ♦ Η πρωτεϊνική κινάση φωσφορυλιώνει την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) και δημιουργεί τις κατάλληλες προϋποθέσεις για

την δημιουργία ενός συμπλόκου της πρωτεΐνης με το γλυκογόνο.

♦ Η αποφωσφορυλίωση της συνθάσης του γλυκογόνου, της κινάσης της φωσφορυλάσης και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου προάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου και εμποδίζει την αποικοδόμησή του.

1.6.3. Ο ρόλος της γλυκόζης στο μεταβολισμό του γλυκογόνου

Η ινσουλίνη αποτελεί το πρωταρχικό σήμα για τη σύνθεση του γλυκογόνου. Παρόλα αυτά στο ήπαρ η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται και από άλλους μη ορμονικούς μηχανισμούς, όπως είναι η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση γλυκόζης και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη. Η ποσότητα της ενεργούς ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου α (GPa) μειώνεται ταχύτατα όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα είναι αυξημένη. Μετά από μια περίοδο νηστείας, το ποσό της συνθάσης γλυκογόνου α αυξάνεται με αποτέλεσμα τη σύνθεση του γλυκογόνου (Εικόνα 1.7). Στην πραγματικότητα η GPa είναι ο «αισθητήρας» της γλυκόζης στα ηπατικά κύτταρα. Η σύνδεση της γλυκόζης στη GPa μετατοπίζει την αλλοστερική της ισορροπία από την ενεργό μορφή R (relaxed) στην ανενεργό T

(tight). Αυτή η αλλαγή στη στερεοδιάταξη της, καθιστά τη φωσφορική ομάδα της σερίνης 14 ένα εύκολα προσβάσιμο υπόστρωμα για την PP1, η οποία δεσμεύεται ισχυρά στην GPa αλλά δρα καταλυτικά μόνο όταν η γλυκόζη επάγει την μετάβαση στη διαμόρφωση T. Η GPb σε αντίθεση με τη GPa δεν συνδέεται με τη PP1, με αποτέλεσμα η μετατροπή της GPa σε GPb να συνεπάγεται την απελευθέρωση της PP1.

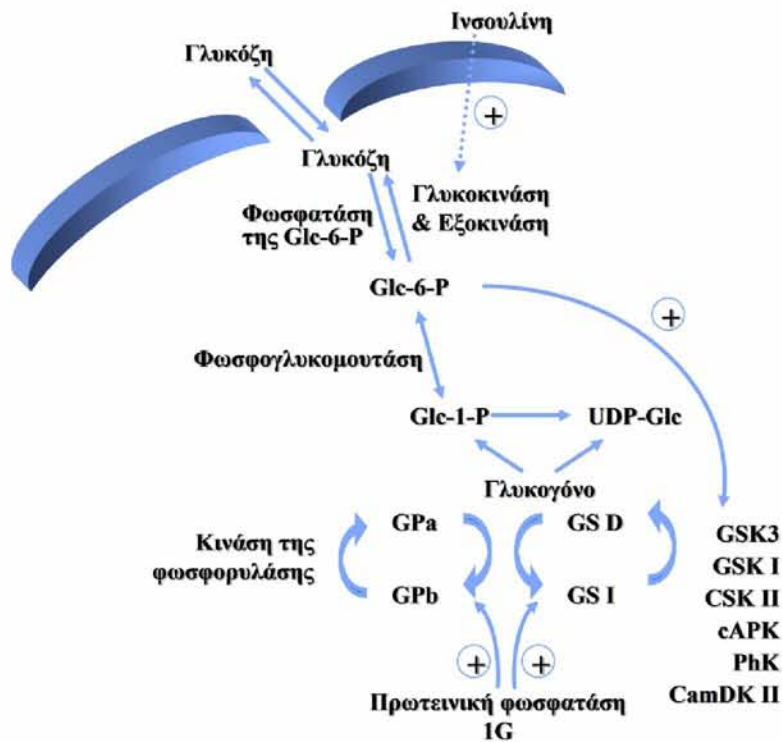
Η ελεύθερη φωσφατάση αποφωσφορλιώνει την GPa και τη συνθάση I του γλυκογόνου, οδηγώντας στην απενεργοποίηση της αποικοδόμησης και την ενεργοποίηση της σύνθεσης του γλυκογόνου (Bollen et al. 1998).

1.6.4 Αλλοστερικός έλεγχος του μεταβολισμού του γλυκογόνου

Οι ταχύτητες και των δύο αντιδράσεων (σύνθεση και διάσπαση του γλυκογόνου) υπόκεινται σε αλλοστερικό έλεγχο από διάφορους τροποποιητές. Η ανενεργός συνθάση του γλυκογόνου b μπορεί να ενεργοποιηθεί από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή Glc-6-P ενώ αναστέλλεται ισχυρά από την αύξηση της συγκέντρωσης της UDP-Glc, που λαμβάνει χώρα όταν τα διαθέσιμα ποσά της γλυκόζης και της ATP είναι περιορισμένα.

Από την άλλη πλευρά, η ανενεργός φωσφορυλάση του γλυκογόνου b (GPb) ενεργοποιείται από την AMP ή ανάλογα της όπως η IMP και παρεμποδίζεται από τις ATP, ADP, Glc-6-P, UDP-Glc, πουρίνες όπως η καφεΐνη και την α-D-γλυκόζη. *In vitro* έχει βρεθεί ότι ενεργοποίηση του ενζύμου μπο-

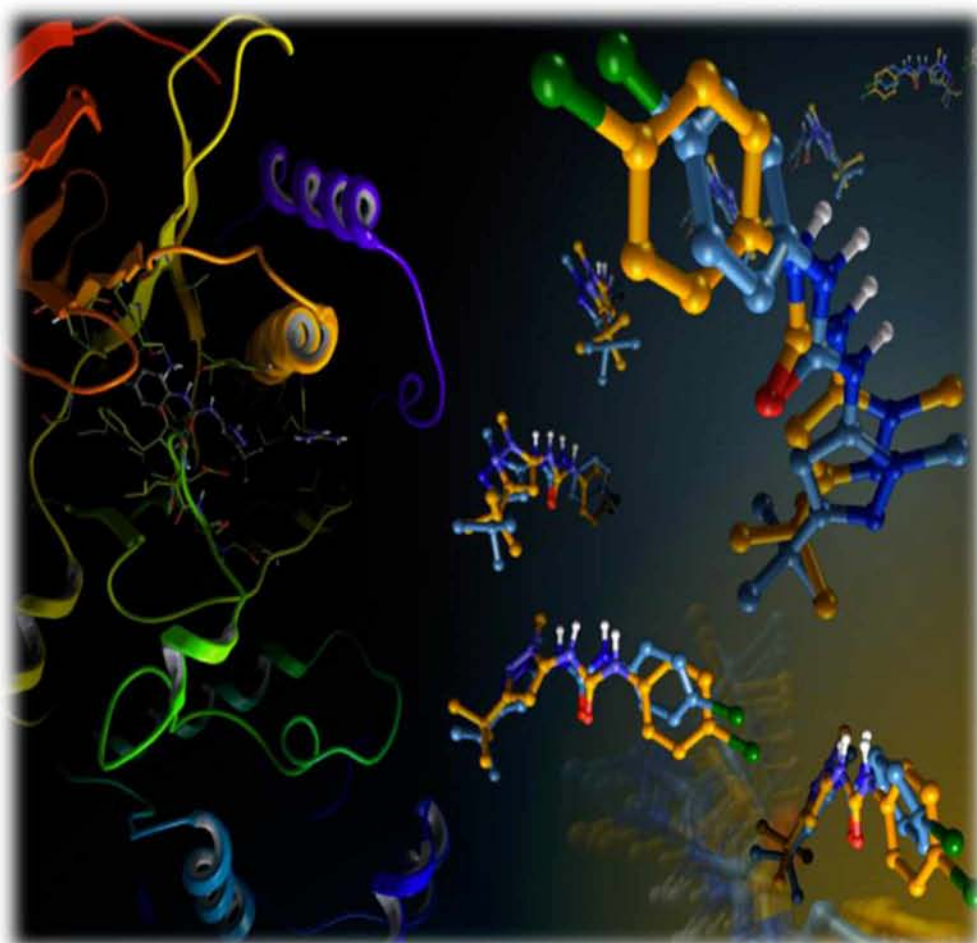
ρεί να επιτευχθεί επίσης παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ανιοντικών υποστρωμάτων και αρκετών ανιόντων (Engers and Madsen 1968) καθώς και από ορισμένους οργανικούς διαλύτες, όπως το DMSO (Tsitsanou et al. 1999)



Εικόνα 1.7: Ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο ήπαρ από την ινσουλίνη και τη γλυκόζη (Οικονομακός 2002).

Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων

Σάρωση βιβλιοθηκών μικρών μορίων για την εύρεση οδηγών ενώσεων με βάση των δομή των πρωτεϊνών (Schrodinger 2015)



2. Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων

2.1 Εισαγωγή

Ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων είναι ένα ραγδαία αναπτυσσόμενο ερευνητικό πεδίο, στο οποίο έχουν επιτευχθεί πολλές και σημαντικές επιτυχίες τα τελευταία χρόνια.

Στις αρχές της δεκαετίας του '80 η δυνατότητα σχεδιασμού φαρμάκων με βάση τη δομή των πρωτεϊνών-στόχων ήταν ένας δύσκολος στόχος. Τα πρώτα εγχειρήματα ξεκίνησαν στα μέσα της δεκαετίας του '80 ενώ στις αρχές της δεκαετίας του '90 έγιναν οι πρώτες δημοσιεύσεις (Erickson et al. 1990, Roberts et al. 1990). Στις μέρες μας, παρόλο ότι υπάρχουν ακόμα περιθώρια βελτίωσης της διαδικασίας, ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων έχει γίνει πλέον ένα αναπόσπαστο κομμάτι τόσο της έρευνας φαρμακοβιομηχανιών για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων (Mountain 2003) όσο και των ακαδημαϊκών εργαστηρίων.

Η ολοκλήρωση του προσδιορισμού της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project), η ανάπτυξη των κλάδων της πρωτεομικής, της δομικής γονιδιωματικής και της βιοπληροφορικής προ-

σέφεραν μια μεγάλη δυναμική στον κατευθυνόμενο με βάση τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων ο οποίος σήμερα αποτελεί μια επιτυχημένη μεθοδολογική προσέγγιση για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων.

Η επιστημονική κοινότητα με την βοήθεια της βιοπληροφορικής ανακαλύπτει συνεχώς νέους φαρμακευτικούς στόχους για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Στη συνέχεια, τα γονίδια αυτών των στόχων κλωνοποιούνται, ακολουθεί η ετερόλογη έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών και η απομόνωσή τους για την κρυστάλλωση. Η τεχνολογική και επιστημονική πρόοδος των τελευταίων χρόνων στα προαναφερθέντα στάδια μείωσε θεαματικά το χρόνο που χρειάζεται πλέον για τον προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών.

Η πρόοδος των τελευταίων χρόνων στην κρυσταλλογραφία μέσω τεχνικών όπως, η αυτοματοποίηση σε όλα τα επίπεδα που οδηγεί σε υψηλής απόδοσης κρυσταλλογραφικές αναλύσεις, η υψηλής έντασης συγχροτρονική ακτινοβολία και οι νέες προσεγγίσεις προσδιορισμού των φάσεων έχουν μειώσει αισθητά το χρόνο που χρειάζεται για

τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών δομών. Ο προσδιορισμός δομών με μεθόδους πυρηνικής μαγνητικής φασματοσκοπίας (NMR) έχει επίσης γνωρίσει σημαντική πρόοδο τα τελευταία χρόνια (βελτιστοποίηση μαγνητών και ανιχνευτών, αυτοματοποίηση στην ταυτοποίηση) (Bailey-Kellogg et al. 2000, Oezguen et al. 2002, Zheng et al. 2003) με αποτέλεσμα τον προσδιορισμό όλο και μεγαλύτερων πρωτεϊνικών δομών (Pervushin et al. 1997). Οι ταχύτεροι υπολογιστές και η δυνατότητα ύπαρξης δικτύων σχετικά χαμηλού κόστους υπολογιστών έχουν επίσης αυξήσει την ταχύτητα με την οποία μπορούν να ανιχνευθούν και να αξιολογηθούν *in silico* πρόδρομες ενώσεις (drug leads).

Ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων έχει τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα όταν αποτελεί κομμάτι της διαδικασίας της ανακάλυψης πρόδρομων ενώσεων (drug leads). Μια ανασκόπηση του J. Antel (Antel 1999) αναφέρει ότι ο συνδυασμός της χημείας και του κατευθυνόμενου από την δομή σχεδιασμού φαρμάκων μπορεί να οδηγήσει στην παράλληλη σύνθεση «εστιασμένων βιβλιοθηκών» ενώσεων (focused compound libraries). Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων χρησιμοποιείται και στην ανακάλυψη πρόδρομων φαρμακευτικών ενώσεων (drug leads), οι

οποίες αν και δεν αποτελούν φαρμακευτικό προϊόν, έχουν ωστόσο κατ' ελάχιστο συγγένεια της τάξεως του μM για το στόχο (Verlinde and Hol 1994). Πολλά χρόνια έρευνας και ανάπτυξης απαιτούνται για την μετατροπή μια πρόδρομης ένωσης τελικά σε ένα προϊόν έτοιμο για κλινικές μελέτες ώστε να διαπιστωθεί αν είναι δραστικό και αποτελεσματικό για τον ανθρώπινο οργανισμό (Εικόνα 2.1).

2.2 Επιλογή στόχου για την ανάπτυξη φαρμάκου

Η επιλογή του φαρμακευτικού στόχου γίνεται κυρίως με βάση τη βιολογική και βιοχημική του λειτουργία. Ιδανικό στόχο για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων αποτελεί ένα μακρομόριο του οποίου η δράση συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση της ασθένειας και το οποίο προσδίδει ένα μικρό μόριο προκειμένου να πραγματοποιήσει τη λειτουργία του. Το μόριο -στόχος συνήθως έχει ένα τουλάχιστον κέντρο σύνδεσης, ώστε μικρά συνθετικά μόρια να μπορούν να ανταγωνιστούν το φυσικό προσδέτη στο κέντρο σύνδεσης, με στόχο να ρυθμίσουν τη λειτουργία του μορίου-στόχου. Για τον λόγο αυτό οι πρωτεΐνες αποτελούν από τους καλύτερους στόχους για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Για παράδειγμα, έχουν βρεθεί μικρά μόρια τα οποία

αλλάζουν την λειτουργία των υποδοχέων που συνδέονται οι G-πρωτεΐνες (GPCRs) τα οποία αντιπροσωπεύουν τουλάχιστον το 25% των εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων (Hopkins and Groom 2002). Το 22% των διαθέσιμων φαρμάκων μέχρι σήμερα είναι μικρά μόρια τα οποία ρυθμίζουν τη λειτουργία καναλιών ιόντων, πρωτεασών, κινασών και υποδοχέων πυρηνικών ορμονών.

Ο στόχος στην ανάπτυξη φαρμάκων ενάντια σε ανθρώπινες πρωτεΐνες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω είναι η αλλαγή στη λειτουργία τους. Για το λόγο αυτό ο πρωτεϊνικός στόχος θα πρέπει να είναι σημαντικός και μοναδικός. Κανένα άλλο μονοπάτι ή πρωτεΐνη δεν θα πρέπει να μπορεί να αντικαταστήσει τη δράση της πρωτεΐνης-στόχου. Επίσης, θα πρέπει να είναι δυνατή η αναστολή της δράσης του στόχου από την πρόσδεση ενός μορίου- αναστολέα. Για το λόγο αυτό τα ένζυμα αποτελούν εξαιρετικούς στόχους για την ανάπτυξη φαρμάκων καθώς μπορούν να σχεδιαστούν αναστολείς οι οποίοι να προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο τους.

2.3 Προσδιορισμός της δομής πρωτεΐνης - στόχου

Αφού γίνει η επιλογή του κατάλληλου στόχου, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε ακριβείς δομικές πληροφορίες για το μόριο

της πρωτεΐνης, ώστε να είναι δυνατός ο σχεδιασμός νέων εν δυνάμει φαρμάκων. Η πλέον βασική μέθοδος προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι οι προσδιοριζόμενες δομές έχουν υψηλή ευκρίνεια, γεγονός που παρέχει σημαντικές δομικές πληροφορίες για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων. Έτσι, παρέχονται π.χ. σημαντικές πληροφορίες για το δίκτυο των μορίων ύδατος της πρωτεΐνης, γεγονός με ιδιαίτερη σημασία στο σχεδιασμό φαρμάκων. Τυπικά, δομές οι οποίες έχουν προσδιοριστεί σε ευκρίνεια μεγαλύτερη από 2.5 Å μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τους σκοπούς του σχεδιασμού φαρμάκων καθώς παρέχουν αρκετές πληροφορίες για το μόριο στόχο. Τέλος, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανεξάρτητα από το μέγεθος της πρωτεΐνης (από μερικά αμινοξέα έως και 998 kDa) (Nissen et al. 2000).

Αφού ολοκληρωθεί ο προσδιορισμός της δομής της πρωτεΐνης, το επόμενο βήμα είναι η ταυτοποίηση ενός πιθανού κέντρου σύνδεσης. Ιδανικά, το κέντρο σύνδεσης θα πρέπει να είναι μια εσοχή (pocket) στην οποία να υπάρχουν εν δυνάμει δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου και να διαθέτει μερικά υδρόφοβα χαρακτηριστικά. Το υπό μελέτη κέντρο σύνδεσης μπορεί να είναι το ενεργό

κέντρο, στην περίπτωση των ενζύμων, ένα ρυθμιστικό κέντρο απαραίτητο για τον μηχανισμό του μορίου ή ένα κέντρο αλληλεπίδρασης (assembly site) με κάποιο άλλο μακρομόριο (Anderson 2003).

Κατά την ανάλυση της τρισδιάστατης δομής των μακρομορίων εκτιμώνται τα πιθανά κέντρα σύνδεσης (κοιλότητες) τόσο στο εσωτερικό όσο και στην επιφάνεια του μορίου, η ύπαρξη δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων *Van der Waals*, όσο και η ικανότητα πρόσβασης στα κέντρα σύνδεσης του μορίου (Blundell et al. 2002).

2.4 Προσδιορισμός πρόδρομων ενώσεων

Ο προσδιορισμός της δομής και του κέντρου σύνδεσης της πρωτεΐνης- στόχου είναι μόνο το πρώτο βήμα για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων. Το επόμενο βήμα είναι η ανάπτυξη πρόδρομων ενώσεων. Ο όρος πρόδρομη ένωση ή ένωση οδηγός χρησιμοποιείται για ενώσεις οι οποίες προσδένονται στην υπό μελέτη πρωτεΐνη αλλά συνήθως παρουσιάζουν ασθενή συγγένεια, τοξικότητα, ή έλλειψη σταθερότητας. Παρόλα αυτά αποτελούν σημαντικό σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη μορίων με βελτιωμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες.

Υπάρχουν αρκετές προσεγγίσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσ-

διορισμό ενός ή περισσότερων μικρών μορίων με τις επιθυμητές ιδιότητες έναντι της πρωτεΐνης- στόχου. Η σάρωση υψηλής απόδοσης (high-throughput screening) βιβλιοθηκών, μέσω της συνδυαστικής χημείας, κατά την οποία χιλιάδες ενώσεις ελέγχονται για βιοχημική δράση, αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο στον προσδιορισμό πρόδρομων ενώσεων. Η σάρωση «εστιασμένων βιβλιοθηκών» και «βιβλιοθηκών μικρών μορίων» χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια (Kumar et al. 2012).

2.5 Αξιολόγηση και βελτιστοποίηση των πρόδρομων φαρμακευτικών ενώσεων

Οι ενώσεις που προσδιορίζονται όπως αναφέρθηκε παραπάνω διαθέτουν συνήθως μόνο ελάχιστες από τις επιθυμητές ιδιότητες ενός τελικού φαρμάκου. Για το λόγο αυτό απαιτείται η βελτιστοποίηση της ένωσης οδηγού (lead optimization) ώστε να αποκτήσει το μόριο ικανοποιητικό βαθμό συγγένειας, εκλεκτικότητας, έλλειψη τοξικότητας, κατάλληλη βιοδιαθεσιμότητα, σταθερότητα, διαλυτότητα, κ.α (Verlinde and Hol 1994).

Πρόδρομες ενώσεις (leads) (με συγγένεια της τάξεως των μM ή και καλύτερες) που πρώτα έχουν αξιολογηθεί με υπολογιστικές μεθόδους μπορούν να βελτιστοποιηθούν σε αυτό το στάδιο προκειμένου να αυ-

ξηθεί η βιοδραστικότητα τους για την πρωτεΐνη στόχο.

Οι οδηγοί επίσης αξιολογούνται σε σχέση με τη βιοδιαθεσιμότητα τους χρησιμοποιώντας τον «κανόνα των 5 του Lipinski» (Lipinski rules of five) (Lipinski et al. 1997). Καθιστώντας άκαμπτη την πρόδρομη ένωση είναι δυνατό να οδηγηθούμε σε χαμηλότερη τιμή της σταθεράς σύνδεσης. Αυτό επιτυγχάνεται από τη μείωση της εντροπίας διαμόρφωσης στην ελεύθερη κατάσταση. Έτσι, προσεγγίζεται μια πιθανά πολύ χαμηλή εντροπία διαμόρφωσης στην κατάσταση του συμπλόκου. Ο Veber και οι συνεργάτες του (Veber et al. 2002) εκτίμησαν ότι όταν ο αριθμός των δεσμών με δυνατότητα περιστροφής είναι μικρότερος από 10 τότε αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα της ένωσης. Άλλοι παράγοντες που εξετάζονται είναι η χημική και μεταβολική σταθερότητα, καθώς και η ευκολία στη σύνθεση έτσι ώστε ένας υποψήφιος αναστολέας να προχωρήσει στο στάδιο της βιοχημικής αξιολόγησης *in vitro* (Anderson 2003).

Στα επόμενα στάδια γίνεται ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου πρωτεΐνης-αναστολέα με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Με τη δομική μελέτη του συμπλόκου μπορούν να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – αναστολέα έτσι ώστε να προκύψουν στοι-

χεία που θα κατευθύνουν περαιτέρω το σχεδιασμό. Τέτοια στοιχεία είναι η ταυτοποίηση των τμημάτων του μορίου που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη καθώς και η φύση και ο αριθμός των αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*, γέφυρες άλατος, ιοντικές αλληλεπιδράσεις, κ.α.). Η δομική μελέτη είναι απαραίτητη μιας και αρκετές πρόδρομες ενώσεις που έχουν ανακαλυφθεί μέσα από υπολογιστικές μεθόδους έχει αναφερθεί να εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην προβλεπόμενη και την πραγματική μορφή σύνδεσης. Επιπλέον η κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου υποδεικνύει τις δομικές αλλαγές που υφίσταται η πρωτεΐνη αλλά και το ίδιο το μόριο του προσδέτη κατά τη σύνδεση του στο ενεργό της κέντρο.

Με βάση τις πληροφορίες αυτές τροποποίηση των αναστολέων με προσθήκη νέων ομάδων είτε με μετάθεση των ήδη υπαρχόντων σε άλλες θέσεις πάνω στην κύρια αλυσίδα της ένωσης είτε με αφαίρεση μερικών ομάδων μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων πιο βιοδραστικών μορίων με διαφορετικά φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά (Anderson 2003).

Ορισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά που πρέπει να φέρουν οι εν δυνάμει αναστολείς

και πρέπει να ληφθούν υπόψη στο σχεδιασμό τους είναι τα ακόλουθα:

- Απαιτείται όσο το δυνατόν καλύτερη στερεοειδική συμπληρωματικότητα με το μόριο-στόχο.
- Το εσωτερικό του μοριακού συμπλόκου θα πρέπει να περιλαμβάνει αρκετές υδρόφοβες επιφάνειες ώστε να επιτυγχάνεται ισχυρή σύνδεση.
- Το πρωτεϊνικό μόριο μετά τη σύνδεση του αναστολέα θα πρέπει να βρεθεί σε μια χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση έχοντας αποκτήσει πιο σταθερή διαμόρφωση.

Τουλάχιστον τέσσερα συμπληρωματικά κριτήρια πρέπει να ληφθούν υπόψη στον κύκλο σχεδιασμού αναστολέων:

- Η χημική σταθερότητα
- Η επαρκής διαλυτότητα τους σε υδατικά διαλύματα για τα κινητικά πειράματα αναστολής και για τις δομικές μελέτες.
- Η ευκολία στη σύνθεση, εξασφαλίζοντας την αποφυγή χειρόμορφων κέντρων και αναστολέων χωρίς προοπτικές βελτίωσης (π.χ. ενώσεις που συνθετικά δεν υπόκεινται εύκολα σε πολλές τροποποιήσεις).
- Η επιδεκτικότητα τροποποίησης αν αυτό κριθεί αναγκαίο.

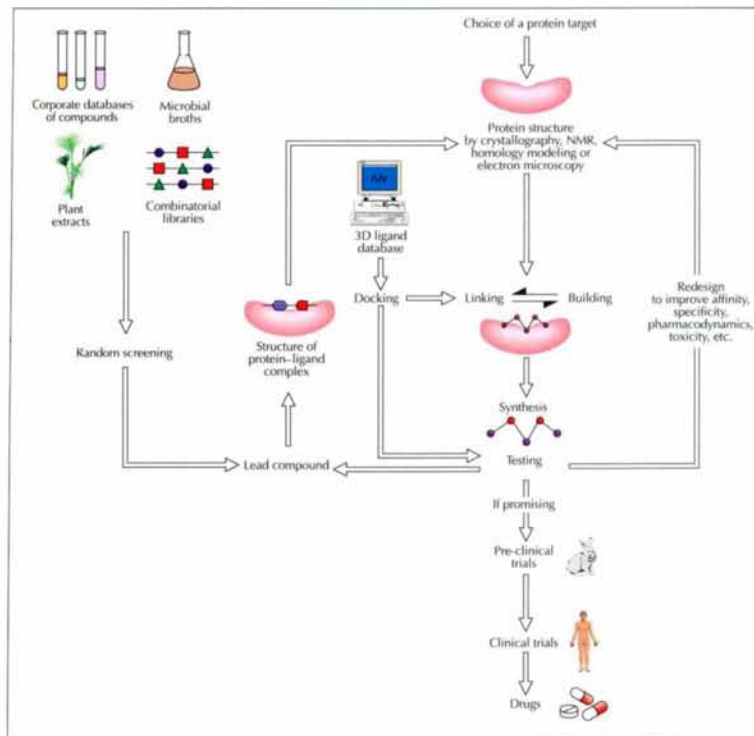
Αναλυτικότερα, το τελευταίο κριτήριο είναι απαραίτητο στο σχεδιασμό φαρμάκων ιδιαίτερα όταν ο μακρομοριακός στόχος στον οποίο απευθύνεται το εν δυνάμει φάρ-

μακο έχει τη δυνατότητα να υποστεί μεταλλάξεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα αντιβιοτικά τα οποία χάνουν σταδιακά την ευαισθησία τους έναντι παθογόνων παραγόντων με την πάροδο του χρόνου.

Μετά από την ανακάλυψη ενός αναστολέα μέσω πειραμάτων *in vitro*, ακολουθεί η *in vivo* φάση, η οποία περιλαμβάνει τον προκλινικό έλεγχο με εργαστηριακές μελέτες σε πειραματόζωα και τέλος οι κλινικές φάσεις σε ανθρώπους.

Είναι προφανές ότι ακόμα και αναστολείς που συνδέονται πολύ ισχυρά δεν είναι απαραίτητα αποτελεσματικά και ασφαλή φάρμακα. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα όχι μόνο μπορούν να φτάσουν στην πρωτεΐνη στόχο, περνώντας μέσω αρκετών μεμβρανών αλλά επίσης δεν αποβάλλονται πολύ γρήγορα από τον ανθρώπινο οργανισμό, δεν έχουν σημαντικές παρενέργειες, μπορούν να παρασκευαστούν σε μεγάλες ποσότητες με υψηλή καθαρότητα, έχουν καλή βιοδιαθεσιμότητα, μικρή τοξικότητα κ.α.

Τα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία επιτρέπεται σήμερα η χορήγηση μιας νέας ένωσης σε μεγάλους πληθυσμούς είναι αρκετά αυστηρά και αυτός είναι ο κύριος λόγος στον οποίο αποδίδεται η αποτυχία πολλών ενώσεων να φτάσουν στα φαρμακεία. Σήμερα, είναι αδύνατον με υπολογιστικές μεθόδους να προ-



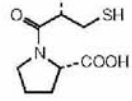
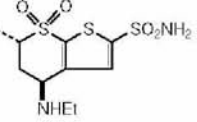
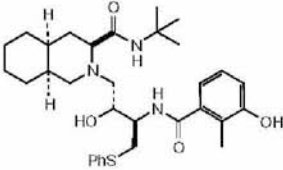
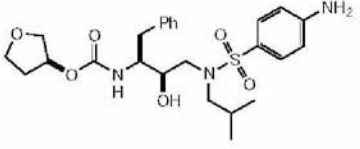
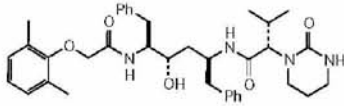
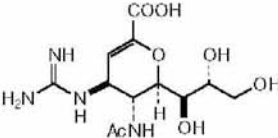
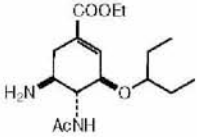
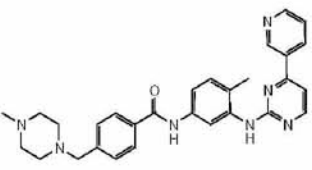
Εικόνα 2.1: Τα στάδια που ακολουθούνται στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων (Verlinde and Hol 1994)

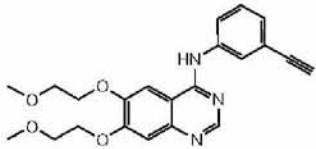
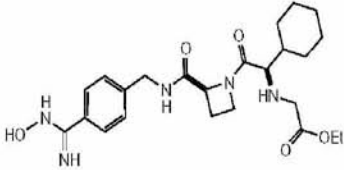
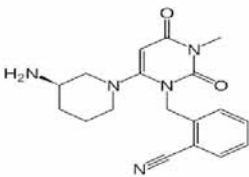
βλεφθεί με επιτυχία ο τρόπος με τον οποίο μια νέα ένωση μπορεί να αλλάξει τη λεπτή ισορροπία όλων των μεταβολικών οδών καθώς και αυτών που ευθύνονται για τη μετάδοση διαφόρων σημάτων στο ανθρώπινο σώμα, όση φαρμακολογική και τοξικολογική γνώση και αν επενδυθεί στην παρασκευή της (Verlinde and Hol 1994). Σήμερα διατίθενται

στην αγορά αρκετά φάρμακα τα οποία είναι προϊόν του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων (Πίνακας 2.1). Στον πίνακα παρουσιάζονται μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα φαρμάκων που αναπτύχθηκαν μέσω αυτής της προσέγγισης ενώ όλο και περισσότερες ενώσεις βρίσκονται στο στάδιο των κλινικών δοκιμών τα τελευταία χρόνια.

Πίνακας 2.1: Φάρμακα που έχουν προκύψει από τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων

Όνομα	Χημική δομή	Πρωτεΐνη-στόχος	Ασθένεια	Ημερομηνία κυκλοφορίας	Φαρμακευτική Εταιρεία

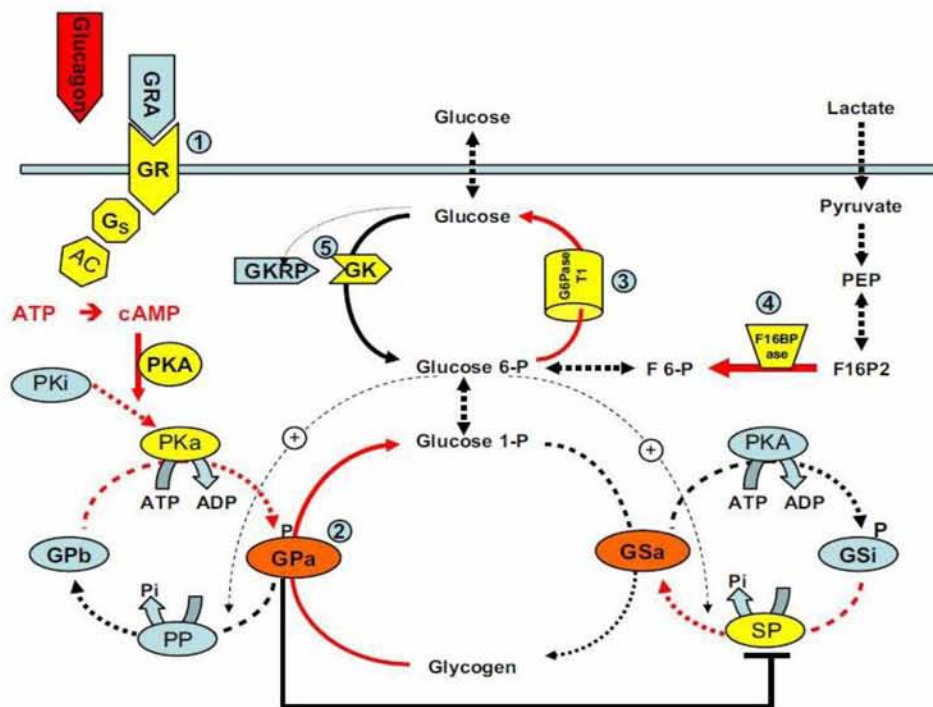
				ας στην αγορά	
Capoten		Αγγειοτενσίνη-ένζυμο μετατροπής	Υπέρταση	1981	Bristol-Myers Squibb
Trusopt		Καρβονική ανυδράση	Γλαύκωμα	1995	Merck
Viracept		HIV πρωτεάση	HIV/AIDS	1999	Agouron (Pfizer) and Lilly
Agenerase		HIV πρωτεάση	HIV/AIDS	1999	Vertex and GSK
Aluviran		HIV πρωτεάση	HIV/AIDS	2000	Abbott
Relenza		Νευραμινιδάση	Γρίπη	1999	Monash University and GlaxoSmithKline
Tamiflu		Νευραμινιδάση	Γρίπη	1999	Gilead and Roche
Gleevec		BCR-ABL	Χρόνια μυελική λευχαιμία	2001	Novartis

Tarceva		EGFR	Καρκίνος του πνεύμονα	2004	Osi and Genentech
Exanta		Θρομβίνη	Φλεβικά φρομβοεμβολιτικά περιστατικά	2004	AstraZeneca
Nesina		Διπεπτιδυλοπεπτιδάση 4	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II	2008	Takeda Pharmaceutical Company Limited

2.6 Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II

Λόγω της έλλειψης κατάλληλης θεραπείας αλλά και των παρενεργειών που προκαλούν πολλές από αυτές υπάρχει ένα συνεχές και έντονο ενδιαφέρον για ανακάλυψη νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων (Jones 2012). Διάφορες φαρμακευτικές εταιρείες έχουν προγράμματα που σχετίζονται με α-

νακάλυψη φαρμάκων που απευθύνονται σε νέους, κυρίως ηπατικούς στόχους. Μεταξύ άλλων περιλαμβάνονται ο υποδοχέας της γλυκαγόνης (GR), ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών, η φωσφατάση της Glc-6-P, τα ένζυμα της γλυκονεογένεσης ή της γλυκογονόλυσης, και η γλυκοκινάση (Agius 2007). Παρακάτω αναλύονται κάποιες από τις θεραπευτικές προσεγγίσεις ενώ η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως φαρμακευτικός στόχος θα αναλυθεί στην επόμενη ενότητα.



Εικόνα 2.2: Ηπατικοί στόχοι για αντι-υπεργλυκαιμικά φάρμακα **1** Ο υποδοχέας της γλυκαγόνης (GR): Η πρόσδεση της γλυκαγόνης στον υποδοχέα της ενεργοποιεί την αδευλική κυκλάση (AC) με σύζευξη του Gs. Η cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) η οποία με τη σειρά της μετατρέπει την κινάση της φωσφορυλάσης (PK) από μια μη ενεργή (i) σε μια ενεργή (a) κατάσταση. Η PK ενεργοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) μετατρέποντας μέσω φωσφορυλίωσης την μη ενεργή μορφή (GPb) στην ενεργή μορφή (GPa). Η αντίθετη διαδικασία καταλύεται από την φωσφατάση της φωσφορυλάσης (PP). **2** Η GPa καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου σε Glc-1-P και είναι επίσης ισχυρός αναστολέας της φωσφατάσης της συνθάσης του γλυκογόνου (GSP) η οποία μετατρέπει τη συνθάση του γλυκογόνου (GS) από τη λιγότερο ενεργή (i) στην πιο ενεργή (a) μορφή. Η Glc-1-P που σχηματίζεται από την γλυκογονόλυση μετατρέπεται σε Glc-6-P και έπειτα σε γλυκόζη μέσω της φωσφατάσης της Glc-6-P **3** Η γλυκονογένεση από το λακτικό και άλλες πρόπυλο-καρβονικές ενώσεις αποτελεί μια εναλλακτική πηγή 6-φωσφορικής γλυκόζης. **4** Η φωσφατάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης (F16BPase) καταλύει την προτελευταία αντίδραση στη γλυκονογένεση δίνοντας Glc-6-P. **5** Σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, προκαλείται ενεργοποίηση της γλυκοκινάσης (GK) μέσω διάσπασης της ανασταλτικής της πρωτεΐνης (GKRP). Η GK καταλύει τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε Glc-6-P. Η Glc-6-P είναι ένα πρόδρομο μόριο της σύνθεσης του γλυκογόνου, ενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου και απενεργοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου προωθώντας την αποφωσφορυλίωση της GSi και της GPa (Agius 2007).

Αναστολείς της φωσφατάσης της Glc-6-P

Η αναστολή των ενζύμων που εμπλέκονται στη γλυκονογένεση ή/και στη γλυκογονόλυση αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση για την καταστολή της παραγωγής γλυκόζης και τη μείωση των επιπέδων της στο αίμα. Η φωσφατάση της Glc-6-P (G6Pase) καταλύει το τελικό βήμα στην πα-

ραγωγή ελεύθερης γλυκόζης τόσο κατά την γλυκονογένεση όσο και στη γλυκογονόλυση και θεωρείται ένας πιθανός στόχος για την ανακάλυψη νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων (McCormack et al. 2001, Westergaard et al. 2002).

Η φωσφατάση της Glc-6-P βρίσκεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και η μεταφορά του υποστρώματος της από το κυτταρόπλα-

σμα στο ενδοπλασματικό δίκτυο καταλύεται από μια μετατοπάση (TI). Έχουν βρεθεί ισχυροί αναστολείς που στοχεύουν στην καταλυτική υπομονάδα της G6Pase αλλά και στην μετατοπάση (TI) και οι οποίοι μειώνουν την παραγωγή γλυκόζης (Parker et al. 1998, Westergaard et al. 1999). Ωστόσο επειδή η G6Pase καταλύει το τελικό βήμα και στα δυο μεταβολικά μονοπάτια, που έχουν συμπληρωματικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης, ισχυροί αναστολείς είτε της καταλυτικής υπομονάδας της G6Pase είτε της μετατοπάσης ενέχουν υψηλό κίνδυνο για πρόκληση οξείας υπογλυκαιμίας.

Εκτός από τον καταλυτικό ρόλο που έχει η φωσφατάση Glc-6-P, έχει και ένα ρυθμιστικό ρόλο, τη ρύθμιση της συγκέντρωσης της εντός του κυττάρου. Η Glc-6-P εκτός από αλλοστερικός τροποποιητής (Aiston et al. 2003) έχει και ένα ρυθμιστικό ρόλο στη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη γλυκόλυση και τη λιπογένεση. Κατά συνέπεια ένα ακόμα σημαντικό πρόβλημα με αναστολείς της G6Pase είναι πως μπορούν να προκαλέσουν συσσώρευση της Glc-6-P (Bandsma et al. 2001). Αναστολή της G6Pase αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα mRNA διαφόρων γονιδίων, όπως του μεταφορέα Glut-2, της σύνθεσης του γλυκογόνου, της κίνησης του πυ-

ροσταφυλικού, της καρβοξυλάσης του ακέτυλο-CoA και της συνθάσης των λιπαρών οξέων (van Dijk et al. 2001). Η επαγωγή της έκφρασης γλυκολιτικών ενζύμων αλλά και ενζύμων που συμμετέχουν στη λιπογένεση δημιουργεί μια ισχυρή προδιάθεση για λιπώδες ήπαρ, ειδικά σε παθολογικές καταστάσεις που προϋπάρχει αντίσταση στην ινσουλίνη (Agius 2007).

Αναστολείς της φωσφατάσης της 1,6 διφωσφορικής φρουκτόζης (F16BPase)

Δεν είναι σήμερα ξεκάθαρο αν η γλυκογονόλυση ή η γλυκονεογένεση συμβάλλουν στην αύξηση της παραγωγής γλυκόζης στο διαβήτη τύπου II. Οι δραστηκότητες ενζύμων της γλυκονεογένεσης, όπως της καρβοξυκινάσης του φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικού και της φωσφατάσης της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης οι οποίες ρυθμίζονται από την γλυκαγόνη και την ινσουλίνη, είναι αυξημένες στον διαβήτη τύπου II και για αυτόν τον λόγο θεωρούνται φαρμακευτικοί στόχοι (Wajngot et al. 2001, van Poelje et al. 2006).

Η F16BPase υπερεκφράζεται στο ήπαρ και τους νεφρούς και καταλύει την αποφωσφορυλίωση της 1,6 διφωσφορικής φρουκτόζης σε 6-φωσφορική φρουκτόζη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε Glc-6-P (από την ισομεράση της φωσφογλυκόζης). Η

δραστηριότητα του ενζύμου ελέγχεται από δυο φυσικούς αναστολείς, την AMP και τη 2,6 -διφωσφορική φρουκτόζη που προσδένονται στο αλλοστερικό και καταλυτικό κέντρο, αντίστοιχα. Αναστολείς που έχουν βρεθεί για το ένζυμο αυτό είναι κυρίως ενώσεις που μεταβολίζονται στο ήπαρ σε ανάλογα AMP (Vincent et al. 1996), ή ενώσεις που μιμούνται την AMP (AMP-mimetic). Οι τελευταίες αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα ενώσεων που προσδένονται σε ένα νέο αλλοστερικό κέντρο που βρίσκεται μεταξύ των υπομονάδων του ενζύμου (Wright et al. 2002, Choe et al. 2003). Μια επιπλοκή της αναστολής της γλυκονεογένεσης μέσω αναστολέων της F16BPase είναι η εκδήλωση υπογλυκαιμίας καθώς, η αναστολή της γλυκονεογένεσης συνδέεται με την ταυτόχρονη αντισταθμιστική διέγερση της γλυκογονόλυσης (Erion et al. 2005).

Ενεργοποιητές της γλυκοκινάσης (GKAS)

Μια εναλλακτική στρατηγική που στοχεύει ένζυμα της γλυκονεογένεσης και της γλυκογονόλυσης, είναι η αύξηση της δραστηριότητας της γλυκοκινάσης, με συνεπακόλουθη αύξηση του μεταβολισμού της γλυκόζης εντός των κυττάρων του ήπατος. Η γλυκοκινάση εκτός από το ήπαρ, εκφράζεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, όπου λειτουργεί ως αισθητήρας γλυκόζης

και ρυθμίζει την έκκριση ινσουλίνης (Matschinsky 2002). Στο ήπαρ η γλυκοκινάση ρυθμίζει το μεταβολισμό της γλυκόζης μέσω της ενεργοποίησης της γλυκόλυσης και της σύνθεσης γλυκογόνου (Agius et al. 1996, Aiston et al. 1999). Κατά συνέπεια, μικρές αλλαγές στη δραστηριότητα του ενζύμου συνδέονται με μεγάλες αλλαγές στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η χρήση της γλυκοκινάσης ως θεραπευτικού στόχου υποστηρίζεται από μελέτες που έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της γλυκοκινάσης, που προκαλούν αύξηση στη συγγένεια του ενζύμου για τη γλυκόζη συνδέονται με μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα, ενώ μεταλλάξεις που προκαλούν μείωση στη συγγένεια ή στην καταλυτική σταθερότητα συνδέονται με την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη (Matschinsky et al. 2006).

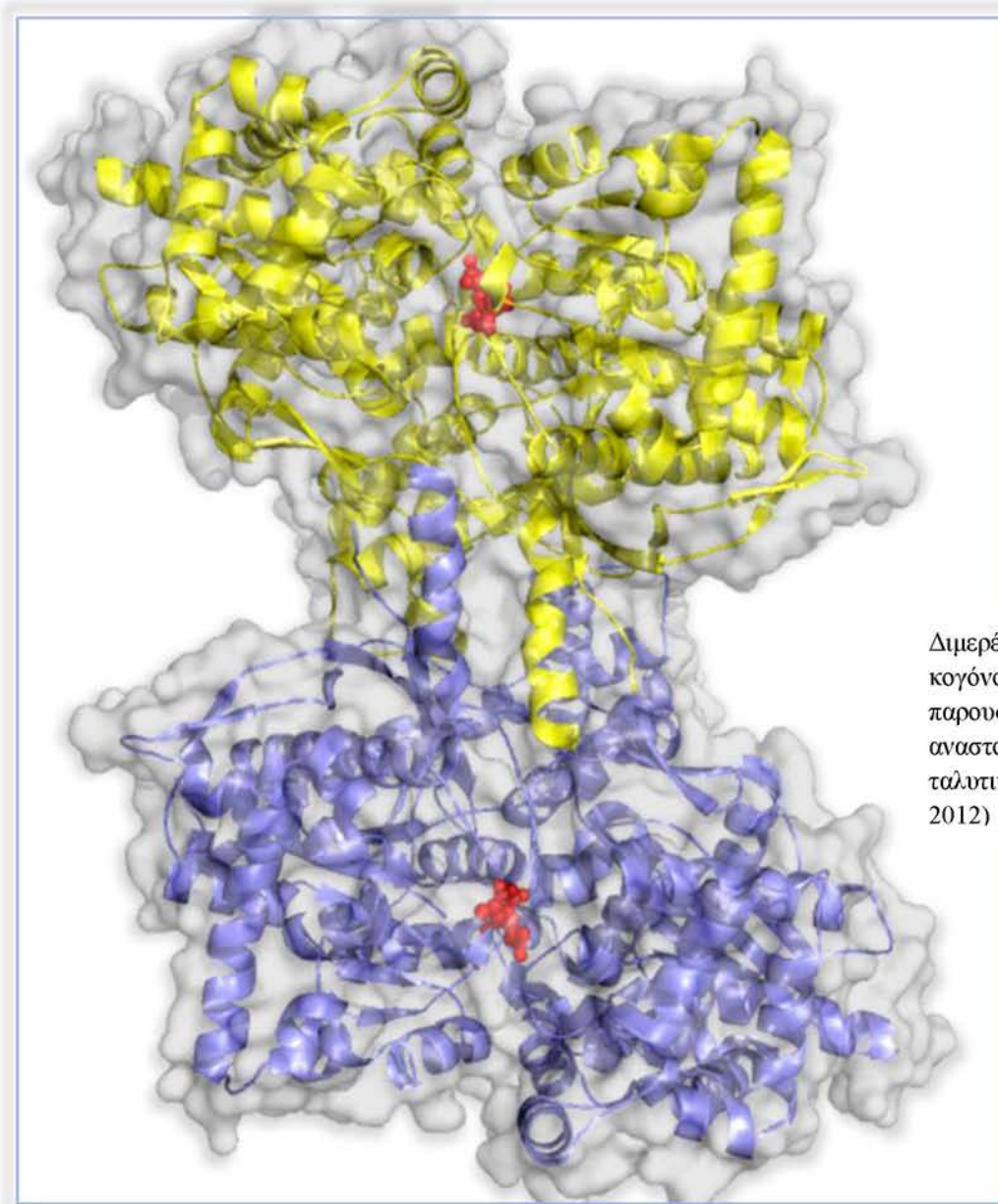
Η ηπατική γλυκοκινάση ρυθμίζεται μέσω της σύνδεσης της σε μια ρυθμιστική πρωτεΐνη 68 kDa (GKRP), η οποία λειτουργεί τόσο ως ανταγωνιστικός αναστολέας για τη γλυκοκινάση αλλά και ως πυρηνικός υποδοχέας για το ένζυμο. Η σύνδεση του ενζύμου στη ρυθμιστική πρωτεΐνη εξαρτάται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης και της 1-φωσφορικής φρουκτόζης. Αύξηση στη συγκέντρωση της γλυκόζης, όπως συμβαίνει στη μεταγευματική κατάσταση, προκαλεί

διάσπαση του συμπλόκου γλυκοκινάσης-ρυθμιστικής πρωτεΐνης και μετατόπιση της γλυκοκινάσης στο κυτταρόπλασμα. Το ίδιο αποτέλεσμα έχει και η 1- φωσφορική φρουκτόζη, η οποία μειώνει τη συγγένεια της ρυθμιστικής πρωτεΐνης για την γλυκοκινάση, και δρα συνεργιστικά με τη γλυκόζη για τη μετατόπιση της γλυκοκινάσης (Agius 1998).

Αρχικές μελέτες προς αυτήν την προσέγγιση έγιναν με σάρωση και διαλογή βιβλιοθηκών μικρομοριακών ενώσεων όπου αναζητήθηκαν ενώσεις που θα μπορούσαν να προκαλέσουν διάσπαση του συμπλόκου της γλυκοκινάσης με τον αναστολέα της GKRP, μιμούμενες την επίδραση της 1-φωσφορικής φρουκτόζης. Παρόλα αυτά οι ενώσεις που βρέθηκαν, ενεργοποιούν την γλυκοκινάση μέσω της αύξησης της συγγένειας της για τη γλυκόζη, ανεξάρτητα από την αλληλεπίδραση με την GKRP (Grimsby

et al. 2003, Brocklehurst et al. 2004). Ερευνητές στις φαρμακευτικές εταιρίες Hoffman La Roche, AstraZeneca, Banyu Pharmaceuticals, και Novartis, έχουν προχωρήσει στο σχεδιασμό αλλά και τη βελτιστοποίηση ενώσεων, που λειτουργούν ως ισχυροί ενεργοποιητές της γλυκοκινάσης αυξάνοντας τη συγγένεια της για τη γλυκόζη, αλλά και τη μετακίνηση της γλυκοκινάσης στο κυτταρόπλασμα όπου λαμβάνει χώρα η φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε Glc-6-P (Agius 2007). Τα πρώτα αποτελέσματα των μελετών για την αποτελεσματικότητα των ενεργοποιητών της γλυκοκινάσης στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα σε ζωικά μοντέλα είναι πολύ ενθαρρυντικά. Ένα βασικό ωστόσο ερώτημα είναι αν θα έχουν ανεπιθύμητες παρενέργειες κατά τη διάρκεια χρόνιας χρήσης. Σήμερα είναι σε εξέλιξη κλινικές μελέτες σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II για πολλές από αυτές τις ενώσεις (Agius 2014).

Φωσφορυλάση του γλυκογόνου



Διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Το ενζυμικό σύμπλεγμα που παρουσιάζεται εδώ είναι παρουσία αναστολέα που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο. (Kantsadi et al. 2012)

3. Η Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (E.C 2.4.1.1) αποτελεί το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, καθώς όπως αναφέρθηκε καταλύει την φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου προς απόδοση Glc-1-P. Η αντίδραση αυτή μελετήθηκε αρχικά από τους Carl και Gerty Cori, οι οποίοι απομόνωσαν τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου για πρώτη φορά (Cori and Cori 1936). Η ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο ήπαρ έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης που εξασφαλίζει τις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις των μυών σε περιόδους μυϊκής συστολής και την ενέργεια στην καρδιά και τον εγκέφαλο σε μεγάλες περιόδους ανοξίας.

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 ενώ 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 απελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της Glc-6-P. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει τα επίπεδα γλυκόζης και την απελευθέρωση γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος.

3.1 Γενική περιγραφή του ενζύμου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kD (841 αμινοξέα μυϊκή GP, 846 αμινοξέα ηπατική GP, 862 αμινοξέα GP εγκεφάλου) και από το συνένζυμο φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 με ομοιοπολικό δεσμό (βάση Schiff) σε κάθε υπομονάδα. Η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για τη δραστηριότητα του ενζύμου. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ό,τι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B₆ (Helmreich and Klein 1980). Η κάθε

υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως το καταλυτικό κέντρο, το αλλοστερικό κέντρο αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπάρχει σε δυο αλληλομετατροπόμενες μορφές, τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου b (GPb), που έχει χαμηλή δραστηριότητα και χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα, και τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου a (GPa) η οποία έχει υψηλή δραστηριότητα και υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα. Σε περιόδους ηρεμίας η φωσφορυλάση βρίσκεται κυρίως στη μορφή b ενώ στην a βρίσκεται περίπου το 10% του συνολικού ενζύμου. Η κύρια οδός για τη φυσιολογική ενεργοποίηση ή την αναστολή της δράσης του ενζύμου περιλαμβάνει τη μετατροπή της φωσφορυλάσης b σε φωσφορυλάση a με φωσφορυλίωση της Ser-14 από μια ειδική κινάση, την κινάση της φωσφορυλάσης (η δράση της ελέγχεται επίσης από ορμονικά σήματα) ή τη μετατροπή της φωσφορυλάσης a σε b με την αποφωσφορυλίωση της Ser-14 από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1), αντίστοιχα (Cohen 1973, Cohen 1983, Cohen 1983). Η φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης b και η μετατροπή της σε a έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP, αν και η δραστηριότητα του μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω (10%) παρου-

σία AMP (Leonidas et al. 1990). Η φωσφορυλάση a έχει μεγαλύτερη συγγένεια για την AMP (100 φορές) σε σχέση με την φωσφορυλάση b αλλά μικρότερη συγγένεια για ATP, ADP και την G-6-P (Fletterick and Madsen 1980, Dombradi 1981). Κατά τη διάρκεια της φωσφορυλίωσης ή της αποφωσφορυλίωσης σχηματίζεται ένα υβρίδιο ab που εμφανίζει ενδιάμεσες ενζυμικές ιδιότητες (Vereb et al. 1987).

Η κατάσταση πολυμερισμού της φωσφορυλάσης περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Cori & Madsen (1956) (Cori and Madsen 1956) οι οποίοι βρήκαν ότι το μοριακό βάρος της GPa είναι διπλάσιο της GPb. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι *in vitro* η GPb είναι ένα διμερές που αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες, ενώ η GPa είναι ένα τετραμερές. Η σύνδεση του γλυκογόνου προκαλεί τη διάσταση των τετραμερών σε διμερή (Wang et al. 1965). Η GPb τετραμερίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις παρουσία AMP, ενώ η GPa διμερίζεται παρουσία γλυκογόνου και γλυκόζης (Helmreich et al. 1967). Ο τετραμερισμός φαίνεται ότι είναι ένα μοναδικό χαρακτηριστικό του μυϊκού ενζύμου αφού τα διμερή της φωσφορυλάσης από ήπαρ, πατάτα και *E. coli* δεν συνδέονται ώστε να σχηματίσουν τετραμερή. *In vivo* τα καταλυτικώς ενεργά μόρια του ενζύμου είναι τα διμερή. Τα τετραμερή χαρακτηρίζο-

νται από μικρή συγγένεια για το γλυκογόνο και έχουν μικρότερη δραστικότητα σε σχέση με τα διμερή (Leonidas et al. 1992). Αντίθετα, το μονομερές φαίνεται ότι βρίσκεται σε μια καταλυτικώς ανενεργή πρωτεϊνική διαμόρφωση.

3.2 Αλλοστερικές ιδιότητες φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Σε πολλά ολιγομερή ένζυμα παρατηρείται το φαινόμενο της *συνεργατικότητας*, κατά το οποίο όταν ένα ένζυμο έχει περισσότερα του ενός κέντρα σύνδεσης για κάποιο υπόστρωμα ή αλλοστερικό τροποποιητή, η σύνδεση ενός μορίου μεταβάλλει τη συγγένεια του ενζύμου για τα υπόλοιπα μόρια. Η δραστικότητα των αλλοστερικών ενζύμων μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορους τροποποιητές οι οποίοι δεν έχουν κάποια άμεση αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα ή τα προϊόντα των αντιδράσεων. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ενζύμου-αλλοστερικού τροποποιητή 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).

Η φωσφορυλάση είναι ένα κλασικό παράδειγμα πρωτεΐνης της οποίας οι ιδιότητες

ρυθμίζονται με αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις. Ιστορικά, είναι η δεύτερη στη σειρά πρωτεΐνη θηλαστικών μετά την αιμοσφαιρίνη, που δράση της βρέθηκε να ρυθμίζεται από αλλοστερικούς τροποποιητές, ενώσεις δηλαδή που διαφέρουν από το υπόστρωμα (π.χ. AMP, Glc-6-P και γλυκόζη).

Οι αλλοστερικές ιδιότητες μπορούν να εξηγηθούν με βάση το μοντέλο των Monod-Wyman-Changeaux ή MWC (Monod et al. 1965) για τις αλλοστερικές πρωτεΐνες. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, που αναφέρεται και ως εναρμονισμένο, το ένζυμο υπάρχει σε δύο πρωτεϊνικές διαμορφώσεις στο διάλυμα, την T (tight) και την R (relaxed), που βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους η οποία καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά $L=[T]/([R])$.

Η κύρια ιδέα του μοντέλου είναι πως η διευθέτηση των υπομονάδων είναι τέτοια που να προσδίδει ένα στοιχείο συμμετρίας στο μόριο. Η συμμετρία διατηρείται κατά τη μετάπτωση από τη μια διαμόρφωση στην άλλη. Η T διαμόρφωση έχει μικρή συγγένεια για τα υποστρώματα και τους αλλοστερικούς τροποποιητές και υψηλή συγγένεια για τους αναστολείς. Η R διαμόρφωση έχει μεγάλη συγγένεια για τα υποστρώματα, τους ενεργοποιητές και χαμηλή συγγένεια για τους αναστολείς της T διαμόρφωσης (Monod et al. 1965).

Κάθε μια από τις δύο μορφές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ κυρίως δυο τεταρτοταγών πρωτεϊνικών διαμορφώσεων, μιας ενεργού χαλαρής διαμόρφωσης R και μιας πολύ λιγότερο ενεργού τεταμένης διαμόρφωσης T. Η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί τη διαμόρφωση R και η σταθερά L κυμαίνεται μεταξύ 3-13, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί τη διαμόρφωση T και η αλλοστερική σταθερά L έχει τιμή 3000 (Madsen 1986). Έτσι, η μετάβαση από την T στην R διαμόρφωση είναι πιο εύκολη στην περίπτωση της GP_a γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγγένειάς της για την AMP κατά 100 φορές περίπου (Helmreich et al. 1967) και τη μείωση της συγγένειας σύνδεσής για την ATP, την ADP και την Glc-6-P (Madsen 1986).

Από προηγούμενες μελέτες στη φωσφορυλάση έχουν παρατηρηθεί θετικά ομοτροπικά συνεργατικά φαινόμενα (αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ίδιων τροποποιητών) και θετικά και αρνητικά ετεροτροπικά φαινόμενα (αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών τροποποιητών) τα οποία μπορούν να ερμηνευθούν σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο όπου οι T και R αποτελούν τις δύο ακραίες πρωτεϊνικές διαμορφώσεις ενός ευρέως φάσματος διαμορφώσεων (Fletterick and

Madsen 1980, Johnson et al. 1989, Oikonomakos et al. 1992).

Η ανενεργός διαμόρφωση T ευνοείται από τη σύνδεση της ATP, της Glc-6-P, της γλυκόζης και πουρινικών αναστολέων όπως η καφεΐνη ενώ η διαμόρφωση R σταθεροποιείται από την AMP και ανάλογα της (IMP) καθώς και από διάφορα υποστρώματα και ανάλογά τους (Glc-1,2-P, UDP-Glc) (Wang et al. 1965, Helmreich et al. 1967, Arikki and Fukui 1975, Kasvinsky et al. 1978, Kasvinsky et al. 1978, Melpidou and Oikonomakos 1983).

Πιο συγκεκριμένα, η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στη διαμόρφωση R. Η σύνδεση της AMP προσδίδει στη μυϊκή GP_b δραστηριότητα που είναι ίση περίπου με το 80% της δραστηριότητας της GP_a. Αυτός ο μηχανισμός είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς η GP_b μπορεί να συμμετάσχει στη γλυκογονόλυση όταν τα επίπεδα της AMP είναι αυξημένα κατά τη διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνίζομενος την AMP, ευνοώντας έτσι τη διαμόρφωση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από τη διαμόρφωση T στη διαμόρφωση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Κά-

τω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα των AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της Glc-6-P στους μυς εξασφαλίζει την παραμονή της Glc-6-P που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για το μετασχηματισμό του σε ενέργεια.

Στο διάλυμα, η φωσφορυλάση b έχει πολύ μικρή δραστηριότητα και είναι απαραίτητη η παρουσία ενός ενεργοποιητή, που σταθεροποιεί τη διαμόρφωση R (π.χ. AMP) για να εμφανίσει αξιόλογη δραστηριότητα. Η φωσφορυλάση a είναι δραστική και δεν απαιτεί την παρουσία τέτοιου ενεργοποιητή παρόλο που η προσθήκη AMP προκαλεί μια αύξηση 10-20% της δραστηριότητας της. Η φωσφορυλάση b παρουσία AMP και η φωσφορυλάση a παρουσιάζουν παρόμοιες δραστηριότητες, έτσι ακόμα και σε συγκεντρώσεις κορεσμού για την AMP η φωσφορυλάση b έχει μόνο 7-25% των μορίων της στη διαμόρφωση R. Κατά τη μετάπτωση του ενζύμου από τη διαμόρφωση T στην R δημιουργούνται τετραμερή ως συνάρτηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, του pH, της ιονικής ισχύος και της θερμοκρασίας (Dombradi 1981). Έτσι η φωσφορυλάση a βρίσκεται ως τετραμερές ακόμα και σε χαμηλές ενζυμικές συγκεντρώσεις, ενώ η φωσφο-

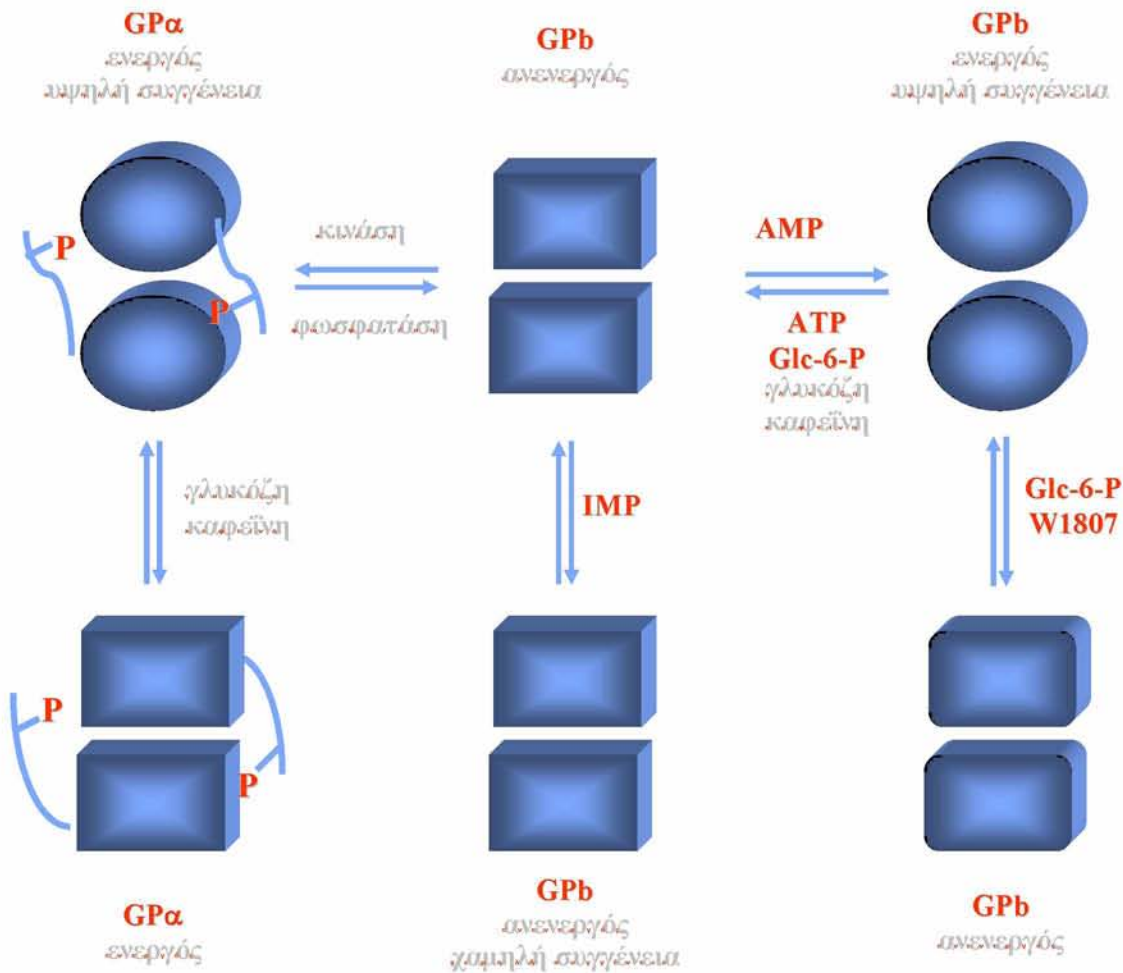
ρυλάση b, σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις, όταν ενεργοποιείται σχηματίζει τετραμερή.

Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και από αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, στο κέντρο αναστολής και στο αλλοστερικό κέντρο. Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, ο φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και μετατόπιση της ισορροπίας προς τη λιγότερο δραστική διαμόρφωση T (καλύτερο υπόστρωμα για την PP1), ευνοώντας έτσι τη μετατροπή της a σε b. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) παρεμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο μετατοπίζοντας έτσι την ισορροπία προς τη διαμόρφωση T. Τέλος, στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η Glc-6-P προκαλώντας μετατόπιση προς τη διαμόρφωση T, η AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς τη διαμόρφωση R και η ATP που απλά ανταγωνίζεται την AMP.

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιόσταση της γλυκόζης. Σε αντίθεση με το ένζυμο των

μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α, αλλά όχι η β παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από τη διαμόρφωση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από τη δια-

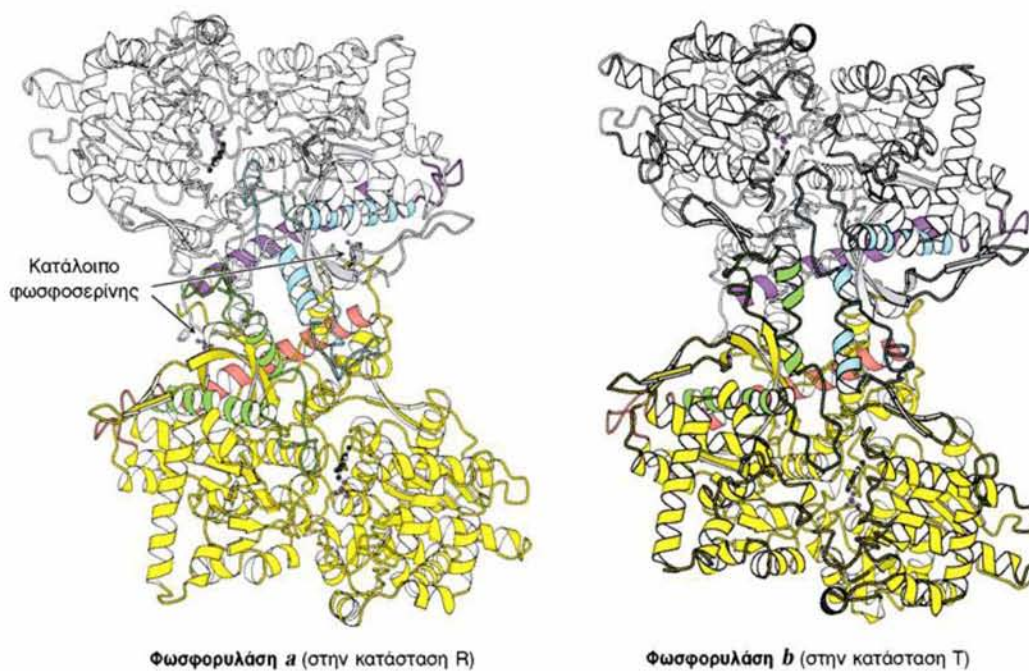
μόρφωση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο (Stryer et al. 2002).



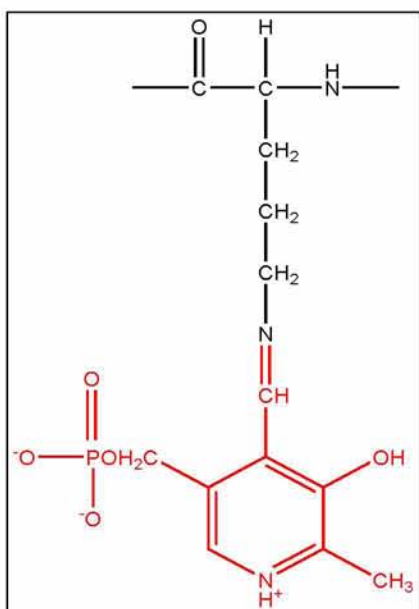
Εικόνα 3.1: Απλοποιημένη αναπαράσταση της αλλοστερικής ενεργοποίησης και της φωσφορυλίωσης της GP. Οι διαμορφώσεις T, T' και R παριστάνονται με τετράγωνα, στρογγυλοποιημένα τετράγωνα και κύκλους αντίστοιχα (Tsitsanou et al. 1999)

Η μετάβαση από τη διαμόρφωση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στη διαμόρφωση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση a) συνδέεται με δομικές μεταβολές στις α -έλικες, οι οποίες μετακινούν ένα βρόχο έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η διαμόρφωση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στη διαμόρφωση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό ιόν είναι καλά οργανωμένη. (Εικόνα 3.2)

Τα αλλοστερικά ένζυμα συχνά εμφανίζουν σιγμοειδείς καμπύλες στις γραφικές παραστάσεις της ταχύτητας της αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος παρά ορθογώνιες υπερβολές που υπαγορεύονται από την εξίσωση Michaelis-Menten. Η σιγμοειδής καμπύλη μπορεί να αναπαρασταθεί ως μια σύνθεση δύο καμπυλών Michaelis-Menten, μια που αντιστοιχεί στη διαμόρφωση T και μια που αντιστοιχεί στη διαμόρφωση R. Μια αύξηση στη συγκέντρωση του υποστρώματος ευνοεί τη μετάβαση από την καμπύλη της διαμόρφωσης T στην καμπύλη της R.



Εικόνα 3.2: Η φωσφορυλάση a είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή διαμόρφωση R. Η μια υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση 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 διαμόρφωση T (Stryer et al. 2002).



Εικόνα 3.3: Σχηματισμός βάσης Schiff μεταξύ της PLP (κόκκινοι χαρακτήρες) και της Lys680 (μαύροι χαρακτήρες).

3.3 Ρόλος της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP)

Η φωσφορυλάση περιέχει ένα μόριο PLP (Baranowski et al. 1957) που συνδέεται με την πλευρική αλυσίδα της Lys680 προς σχηματισμό βάσης του Schiff. Η παρουσία του συνενζύμου είναι απαραίτητη για την κατάλυση. Η απομάκρυνση του με τη χρησιμοποίηση μετουσιωτικών αντιδραστηρίων οδηγεί σε πλήρη αδρανοποίηση του ενζύμου. Όμως, η επώαση του αποενζύμου με PLP οδηγεί σε επαναφορά των δομικών και ενζυμικών του ιδιοτήτων (Shaltiel et al. 1966). Οι μελέτες στη φωσφορυλάση με ενζυμικά παράγωγα στα οποία η PLP είχε α-

ντικατασταθεί από δομικά της ανάλογα έδειξαν πως οι ομάδες στις θέσεις 1, 2, 3, 4, και 6 δεν είναι απαραίτητες στην κατάλυση και πως μόνο η 5'-φωσφορική ομάδα είναι απαραίτητη στο μηχανισμό κατάλυσης (Oikonomakos et al. 1992).

Η PLP βρίσκεται στο κέντρο του ενζυμικού μορίου, 15 Å από την επιφάνεια, στο σημείο που συναντώνται οι δυο αυτόνομες επικράτειες 1 και 2 του μονομερούς και είναι πολύ κοντά στο κέντρο σύνδεσης των υποστρωμάτων.

Παρόλο που δεν υπάρχουν αμφιβολίες ότι η αντίδραση προχωρά μέσω της διάσπασης του α-C1-O1 γλυκοζιτικού δεσμού και ότι διατηρείται η α διαμόρφωση στον C1 σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, υπάρχουν ακόμη σημεία του μηχανισμού που δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως.

Διάφορες μελέτες οδήγησαν κυρίως στη διατύπωση προτάσεων για το ρόλο της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP στον καταλυτικό μηχανισμό. Οι προτάσεις προτείνουν άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του υποστρώματος των ορθοφωσφορικών ιόντων και της 5'-φωσφορικής ομάδας.

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 ιόν, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων. Το ορθοφωσφορικό ιόν (με τη μορφή HPO_4^{2-}) δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας γλυκόζης από την αλυσίδα του 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, με την επακόλουθη επιστροφή ενός πρωτονίου στη φωσφορική πυριδοξάλη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό (για την αποφυγή της υδρολυτικής διάσπασης) από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορικής διάσπασης (Stryer et al. 2002).

3.4 Δομικά χαρακτηριστικά φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Τα δομικά χαρακτηριστικά του ενζύμου έχουν καθοριστεί μετά από τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής της α και β φωσφορυλάσης τόσο στη διαμόρφωση T όσο και στην R.

Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της μυϊκής GPb κονίκλων (rmGPb) αναπτύσσονται σε συνθήκες που ευνοούν τη διαμόρφωση T παρουσία IMP και Mg^{+2} ή σπερμίνης σε χαμηλή ιοντική ισχύ (Johnson et al. 1974, Oikonomakos et al. 1985). Η IMP, που είναι

ασθενής ενεργοποιητής του ενζύμου, συνδέεται στο αλλοστερικό κέντρο χωρίς όμως να προκαλεί αύξηση της συγγένειας για το υπόστρωμα. Οι κρύσταλλοι αυτοί ανήκουν στην ομάδα συμμετρίας χώρου $P4_32_12$ και έχουν διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας $a=b=128.5 \text{ \AA}$ και $c=116.3 \text{ \AA}$ (Oikonomakos et al. 1988).

Κρύσταλλοι της rmGPb στη διαμόρφωση R αναπτύσσονται παρουσία 1.0 M θειϊκού αμμωνίου (Barford and Johnson 1989) που είναι ενεργοποιητής του ενζύμου (Fasold et al. 1972, Madsen et al. 1972). Οι κρύσταλλοι είναι μονοκλινείς, ανήκουν στην ομάδα χώρου $P2_1$ και έχουν διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας $a=119.0 \text{ \AA}$ $b=190.0 \text{ \AA}$ $c=88.2 \text{ \AA}$ και $\beta=109.35^\circ$ (Barford and Johnson 1989).

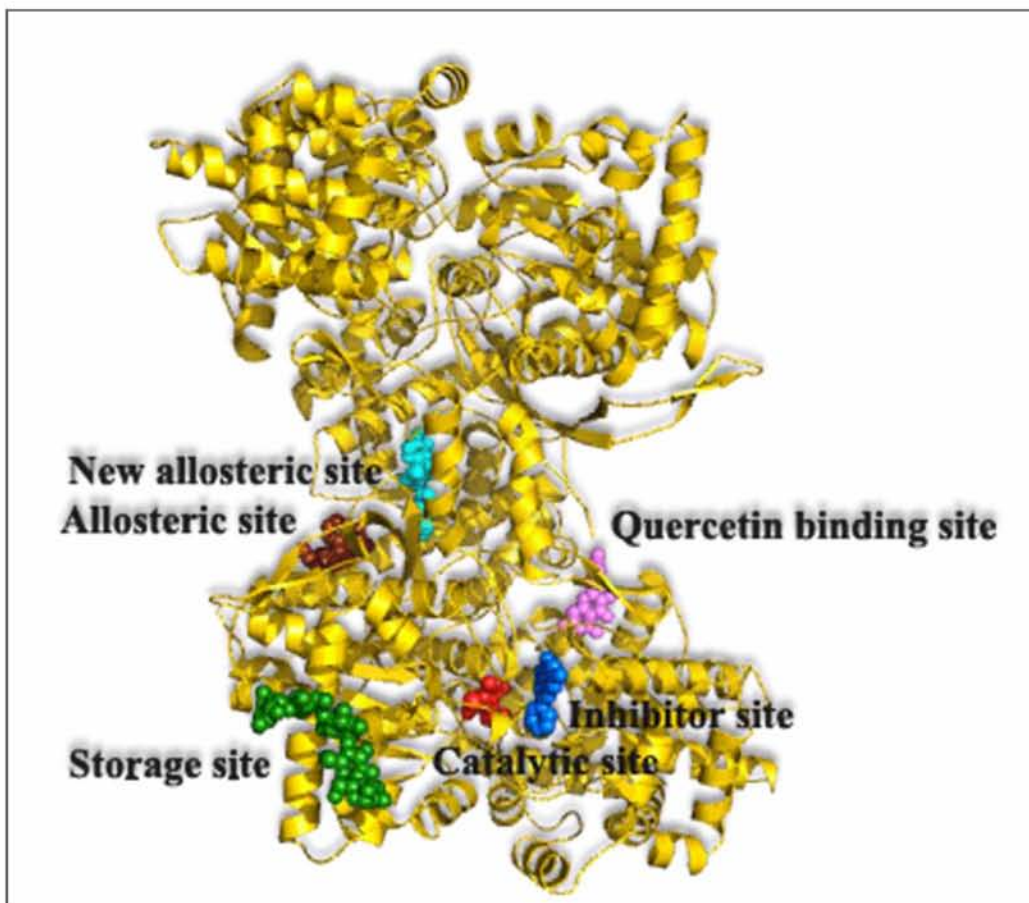
Η κρυσταλλική δομή της GPb στη διαμόρφωση T προσδιορίστηκε σε ευκρίνεια 1.9 \AA (Acharya et al. 1991) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της "ισόμορφης αντικατάστασης" (Blundell and Johnson 1976). Ο προσδιορισμός της δομής του ενζύμου στη διαμόρφωση R, σε ευκρίνεια 2.9 \AA (Barford and Johnson 1989) έγινε με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης (Blundell and Johnson 1976) χρησιμοποιώντας ως πρότυπο το μονομερές της GPb στη διαμόρφωση T. Παρόμοια, η φωσφορυλάση α κρυσταλλώθηκε παρουσία γλυκόζης στο ίδιο κρυσταλλικό

σύστημα όπως και η φωσφορυλάση b (Fletterick et al. 1976). Οι δομές και των δύο ενζυμικών μορφών (a και b) τόσο στη διαμόρφωση T όσο και στην R είναι παρόμοιες σε γενικές γραμμές.

Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60 X 60 X 55 Å. Η GP είναι μια πρωτεΐνη α/β (Levitt and Chothia 1976) και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-πτυχωτές επιφάνειες (20%), δυο έλικες 3_{10} μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια έλικα π μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια επικράτεια 95 αμινοξέων (153-248) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 111 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. Υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων βοηθώντας στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης (Oikonomakos

et al. 1992). Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (cap) και πύργος (tower) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόχος 280s (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18). Τα δέκα πρώτα αμινοξέα του N-τελικού άκρου και τα τρία πρώτα του C-τελικού δεν είναι εντοπισμένα στην κρυσταλλική δομή και φαίνεται πως είναι αρκετά ευκίνητα. Βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν επίσης την ύπαρξη επτά κέντρων σύνδεσης (Εικόνα 3.4):

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14
- Αλλοστερικό κέντρο
- Καταλυτικό κέντρο
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου)
- Κέντρο αναστολής
- Νέο αλλοστερικό κέντρο
- Κέντρο σύνδεσης κερσετίνης



Εικόνα 3.4: Σχηματική αναπαράσταση του διμερούς μορίου της GPb, όπου παρουσιάζονται και τα κέντρα σύνδεσης

3.5 Κέντρα σύνδεσης ως στόχοι του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες της GP οδήγησαν στην ταυτοποίηση επτά κέντρων σύνδεσης τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι για τον σχεδιασμό αναστολέων της GP. Εξαιτίας του κεντρικού ρόλου του ενζύμου στο μεταβολισμό του γλυκογόνου, θεωρείται ένας από τους πιο βασικούς μοριακούς στόχους για το σχεδια-

σμό και την ανάπτυξη εν δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων (Rath et al. 2000, Treadway et al. 2001, Oikonomakos 2002, Oikonomakos and Somsak 2008, Agius 2010). Οι προσπάθειες για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό αναστολέων διευκολύνεται από τη διαθεσιμότητα ενός μεγάλου αριθμού (περισσότερα από 200) συμπλόκων πρωτεΐνης- αναστολέων που έχουν προσδιοριστεί σε υψηλή ευκρίνεια και έχουν κατατεθεί στην PDB (Protein Data Bank). Οι δομές αυτές έχουν προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, ε-

ντούτοις έχουν αξιοποιηθεί και μέθοδοι φασματοσκοπίας NMR για τη μελέτη της πρόσδεσης μικρών μορίων στην GP (Krimm et al. 2012).

Η πλειοψηφία των προσπαθειών σχεδιασμού αποτελεσματικών αναστολέων για τη GP στοχεύουν κυρίως στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, όπου προσδέεται και ο φυσικός αναστολέας του ενζύμου, α-D-γλυκόζη. Ουσιαστικά η γνώση των τρισδιάστατων δομών των συμπλόκων αποκαλύπτει τις αλληλεπιδράσεις που είναι κρίσιμες για την αναγνώριση και την πρόσδεση του αναστολέα και επιτρέπει μια ορθολογική προσέγγιση στο σχεδιασμό νέων αναστολέων (Hayes and Leonidas 2010, Habash and Taha 2011, Kantsadi et al. 2012, Kumar et al. 2012).

1) Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14

Το κέντρο φωσφορυλίωσης βρίσκεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, αποτελείται από τα αμινοξέα 5-22 (αναφέρεται και ως πεπτιδίο φωσφορυλίωσης) και συγκροτείται κατά την ενεργοποίηση της GPb με φωσφορυλίωση (Sprang et al. 1988). Η φωσφορική ομάδα αλληλεπιδρά με δύο πλευρικές αλυσίδες αργινίνης, της Arg69 και της Arg63' από τη συμμετρική υπομονάδα. Τα θεϊκά ιόντα συνδέονται στο κέντρο της Ser14 και οι αλληλεπιδράσεις τους με την πρωτεΐνη

στην περιοχή του κέντρου αυτού είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της GPb μέσω της αναδιάταξης του N-τελικού άκρου (Leonidas et al. 1991).

Και στις δυο ισομορφές, μυϊκή και ηπατική, το πεπτιδίο φωσφορυλίωσης στην ανενεργή διαμόρφωση T δεν είναι σταθεροποιημένο. Αντιθέτως στην ενεργή διαμόρφωση R των ισοενζύμων το πεπτιδίο φωσφορυλίωσης είναι σταθεροποιημένο και εντοπίζεται στην επιφάνεια του μορίου. Η αποδιάταξη του πεπτιδίου φωσφορυλίωσης του επιτρέπει την αλληλεπίδραση με το καταλυτικό κέντρο της φωσφατάσης PP1. Η αποδιάταξη του πεπτιδίου φωσφορυλίωσης συμβαίνει και όταν το φωσφορυλιωμένο ένζυμο μεταπίπτει στη διαμόρφωση T λόγω αναστολής από κάποιο προσδέτη.

Αυτές οι δομικές μεταβολές μπορούν ίσως να δώσουν μια εξήγηση σε μια σημαντική διαφορά στη ρύθμιση των δυο ισομορφών. Σε αντίθεση με τη μυϊκή ισομορφή η οποία είναι ευαίσθητη στη ρύθμιση από αλλοστερικούς τελεστές, η ηπατική ισομορφή υπόκειται σε έλεγχο μόνο από ορμονικά σήματα ώστε να προωθηθεί η φωσφορυλίωση της Ser14 ενώ αλλοστερικοί τελεστές δεν προκαλούν καμία αλλαγή. Έχουν προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά πολλές ανενεργές διαμορφώσεις της μυϊκής φωσφορυλάσης λόγω της δράσης αλλοστερικών τελεστών,

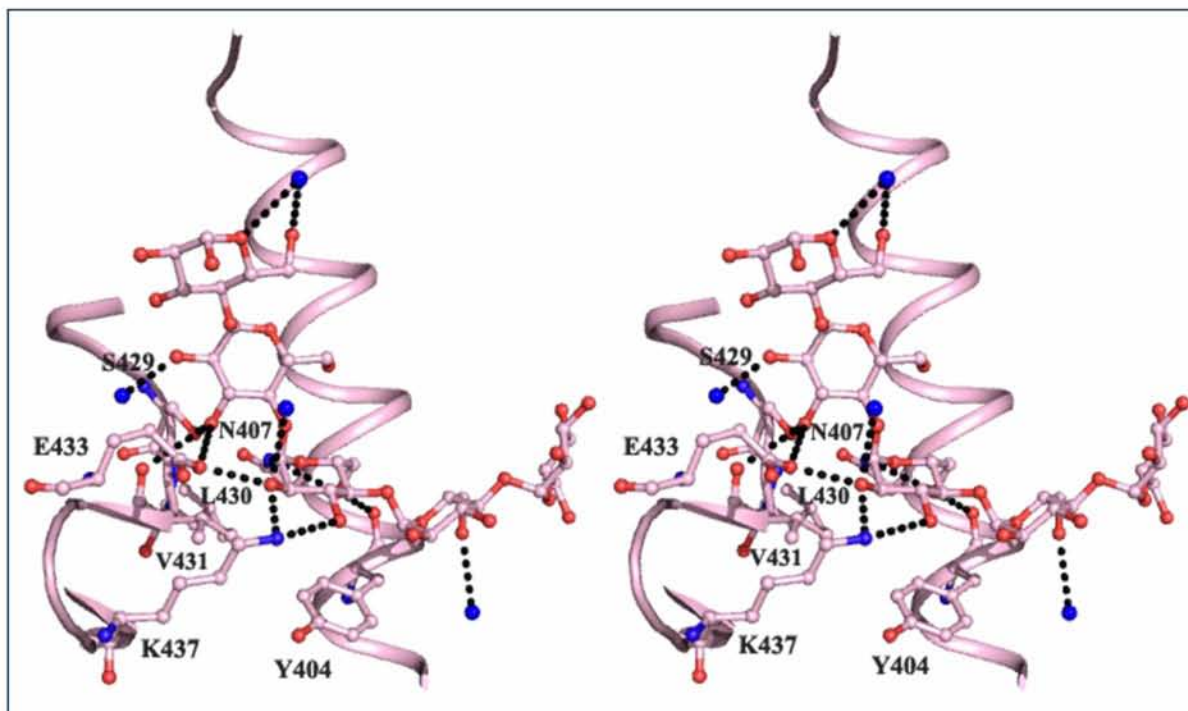
αντίθετα η ηπατική ισομορφή πιθανό να υποθετεί μόνο μια ανενεργή διαμόρφωση η οποία είναι ίδια με την μη-φωσφορυλιωμένη μορφή του ενζύμου (Rath et al. 2000).

2) Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης γλυκογόνου)

Το αποθηκευτικό κέντρο είναι η περιοχή με την οποία η φωσφορυλάση συνδέεται στους κόκκους του γλυκογόνου *in vivo* (Johnson et al. 1988). Εντοπίζεται στην επιφάνεια του μορίου περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο (Weber et al. 1978). Η περιοχή αποτελείται από δυο αριστερόστροφες έλικες (αμινοξέα 396-418 και 420-429) και ένα βρόχο που συνδέει δυο αντιπαράλληλες β-

πτυχωτές επιφάνειες (αμινοξέα 430-432 και 437-411).

Αυτό το κέντρο δεν αποτελεί ιδιαίτερο στόχο για το σχεδιασμό αναστολέων. Εντούτοις, έχει μελετηθεί η σύνδεση της α- ($K_i = 47.1$ mM), β- ($K_i = 14.1$ mM), γ- κυκλοδεξτρίνης ($K_i = 7.4$ mM), της μαλτοπενταόζης (G5) και της μαλτοεπταόζης (G7, $K_i = 1$ mM) (Pinotsis et al. 2003). Η πρόσδεση της G7 παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.5. Η G7 συνδέεται μέσω δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser429, Lys473, Asn407 αλλά και με πολικές αλληλεπιδράσεις μέσω μορίων ύδατος με τα αμινοξέα Gln401, Arg426, Val431, και Gln433.



Εικόνα 3.5: Πρόσδεση της G7 στο αποθηκευτικό κέντρο (PDB ID 1P2B) (Pinotsis et al. 2003, Hayes et al. 2014)

3) Αλλοστερικό κέντρο

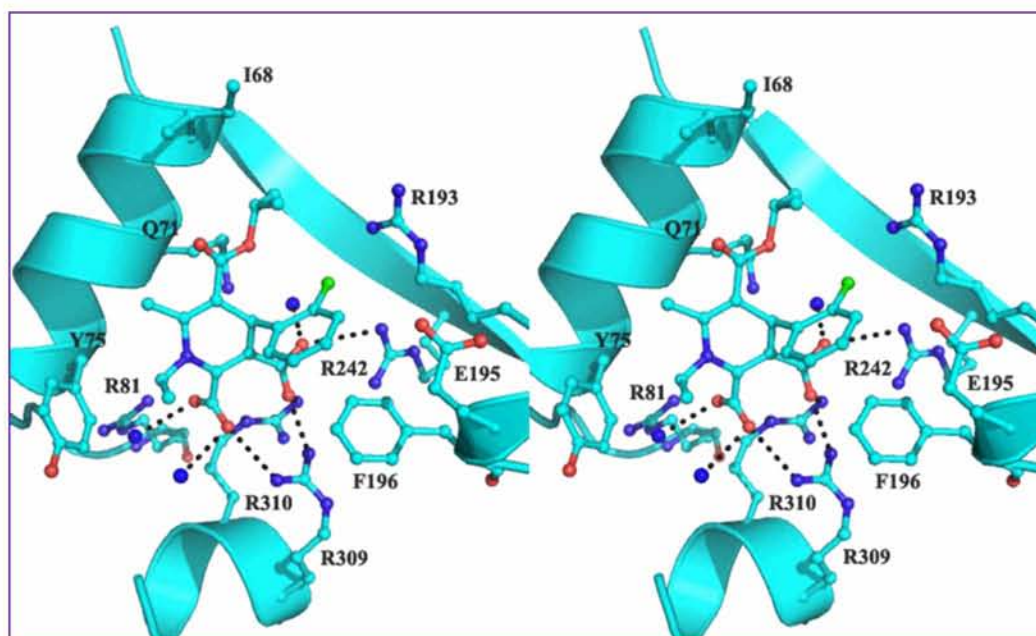
Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å περίπου από τη Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις δυο διαμορφώσεις, T και R, της GP_a και της GP_b (Kasvinsky et al. 1978, Oikonomakos et al. 1988). Δυο α-έλικες (αμινοξέα 47-78 και 289-314) και τέσσερις β-πτυχωτές επιφάνειες (αμινοξέα 153-160, 191-193, 222-232, και 237-247) σχηματίζουν μια εσοχή σχήματος V, η οποία «σφραγίζεται» από την περιοχή cap' της συμμετρικής υπομονάδας (αμινοξέα 36'-47' συμμετρικής υπομονάδας) για να σχηματιστεί το αλλοστερικό κέντρο (Oikonomakos 2002).

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, Glc-1-P, Pi, SO₄²⁻) είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, Glc-6-P, UDP-Glc, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν, NADH) το ένζυμο (Oikonomakos 2002). Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP συνδέεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 (αμινοξέα 47-78 και 289-314 αντίστοιχα) και βρίσκεται κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων. Η

σύνδεση των αναστολέων στο κέντρο αυτό αναστέλλει την δραστηριότητα της GP είτε μέσω ανταγωνισμού με τον φυσιολογικό ενεργοποιητή AMP είτε μέσω σταθεροποίησης της ανενεργής T διαμόρφωσης του ενζύμου.

Ο W1807 είναι ένας από τους πιο βιοδραστικούς αναστολείς που έχουν βρεθεί για την GP μέχρι σήμερα ($K_i=1.6$ nM για την gmGP_b και $K_i=10.8$ nM για την gmGP_a) (Zographos et al. 1997). Συνδέεται ισχυρά στο αλλοστερικό κέντρο μέσω πολικών αλληλεπιδράσεων με αμινοξικά κατάλοιπα, κυρίως όμως μέσω μη πολικών αλληλεπιδράσεων με τους αρωματικούς δακτυλίους πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων του ενζύμου (Εικόνα 3.6).

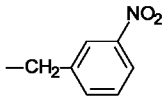
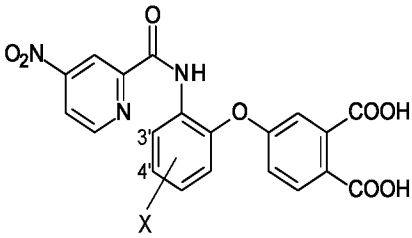
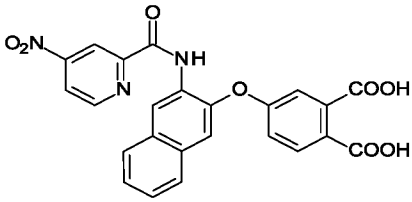
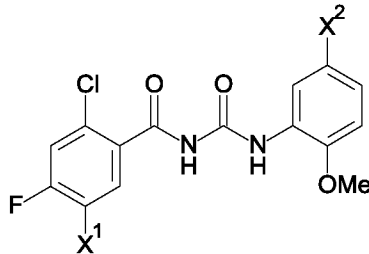
Στο αλλοστερικό κέντρο έχουν επίσης βρεθεί να συνδέονται ισχυρά ενώσεις φυσικής προέλευσης όπως παράγωγα φθαλικού οξέος (Lu et al. 2003), ακυλουρίες (Klabunde et al. 2005, Oikonomakos et al. 2005) και τριτερπενοειδής ενώσεις από εκχυλίσματα φυτών, όπως το ασιατικό και το μασλινικό οξύ (Wen et al. 2008). Στον πίνακα 3.1 παρατίθενται κάποιοι από τους πιο ισχυρούς αναστολείς που έχουν βρεθεί για το αλλοστερικό κέντρο.



Εικόνα 3.6: Η πρόσδεση του W1807 στο αλλοστερικό κέντρο (PDB ID 2AMV) (Hayes et al. 2014)

Πίνακας 3.1: Δομή κάποιων από τους πιο ισχυρούς αναστολείς του αλλοστερικού κέντρου μαζί με τις τιμές IC_{50} (Hayes et al. 2014)

Όνομα	Χημική δομή	IC_{50}	
		hlGPa [nM]	Ηπατοκύτταρα [μM]
Παράγωγα διυδροπυριδινικών διοξέων			
	<p style="text-align: center;">R</p> <hr/> <p>-CH₂CH₃</p> <p>-CH₂-</p> <p>-CH₂-</p>	39(1.6)	2.23 (EC ₅₀)
		2	0.48 (EC ₅₀)
		4	0.27 (EC ₅₀)

		5	0.44 (EC ₅₀)	
Παράγωγα φθαλικού οξέος	 	X <hr/> 3'-F H 4'-F <hr/> 1 3 13 1	 0.3 1 1.8 0.3	
Ακυλοουρίες		X <hr/> X ¹ = H X ² = OH X ¹ = F X ² = NHCONH- Me	 23 53	6.2 0.38

Συγκριτικές δομικές μελέτες όλων των συμπλόκων GP- αναστολέων που δεσμεύονται στο αλλοστερικό κέντρο αποκαλύπτουν έναν αξιοσημείωτο βαθμό ευελιξίας σε αυτήν την περιοχή, η οποία είναι σε θέση να αναγνωρίζει ένα σημαντικό εύρος ενώσεων διαφορετικών δομών. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αποτελούν την πιο σημαντική αιτία για την ισχυρή δραστηριότητα των αναστολέων αυτών (τάξης nM). Η κατανόηση αυτής της διαμορφωτικής ευελιξίας του αλ-

λοστερικού κέντρου, είναι ένα σημαντικό στοιχείο στον σχεδιασμό αναστολέων.

4) Κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής εντοπίζεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου και σε απόσταση 10 Å από αυτό. Είναι μια υδρόφοβη περιοχή που έχει σχετικά μικρή εξειδί-

κευση. Οριοθετείται από τα αμινοξέα Phe285 και Tyr613 των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες διατάσσονται παράλληλα σε απόσταση περίπου 7 Å η μια από την άλλη (Martin et al. 1990). Οι αναστολές προσδένονται στο κέντρο αναστολής μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων της Phe285 και της Tyr613 με τέτοια διάταξη ώστε οι δακτύλιοι να είναι παράλληλοι μεταξύ τους (Εικόνα 3.7). Οι αλληλεπιδράσεις π-π μεταξύ των τριών δακτυλίων αποτελούν την κύρια πηγή της ενέργειας σύνδεσης των ενώσεων αυτών, αφού δεν αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αναστολέων και των αμινοξέων της GP (Oikonomakos 2002). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές σταθεροποιούν τον βρόχο 280s φράζοντας την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο σταθεροποιώντας έτσι την διαμόρφωση T. Οι αναστολές εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστηριότητα παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης (Hayes et al. 2014). Συνεπώς, η δραστηριότητα των αναστολέων θα μπορούσε να ρυθμίζεται από τα επίπεδα γλυκόζης, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο υπογλυκαιμίας.

Στο κέντρο αναστολής έχει βρεθεί ότι προσδένονται εκτός από την AMP, η αδενίνη, η καφεΐνη, νουκλεοζίτες (αδενοσίνη, ινοσίνη), νουκλεοτίδια (IMP, ATP, NADH), φλαβονοειδή και ορισμένες ετεροκυκλικές

ενώσεις (Kasvinsky et al. 1978, Oikonomakos et al. 2000). Όταν η Glc-1-P ή παράγωγα γλυκόζης, συνδεθούν στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου η μετακίνηση του βρόχου 280s οδηγεί τον αρωματικό δακτύλιο της Phe285 σε κάθετη θέση ως προς εκείνον της Tyr613 με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η σύνδεση ενώσεων στο κέντρο αναστολής (Martin et al. 1990).

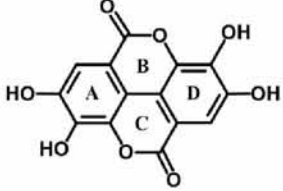
Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί αρκετές ενώσεις οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της GP (Hayes et al. 2014). Τα φλαβονοειδή είναι ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά και είναι η πιο κοινή ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων στην ανθρώπινη διατροφή. Παρόλα αυτά είναι πλέον γνωστό ότι δεν παρουσιάζουν εξειδίκευση στον τρόπο δράσης τους, καθώς διάφορα φλαβονοειδή δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης στην GP (Hayes et al. 2014). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η κερσετίνη (Kantsadi et al. 2014), η οποία θα αναφερθεί παρακάτω. Κάποιες από τις ενώσεις που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι η χρυσίνη ($K_i = 19.01 \mu\text{M}$) και η φλαβοπυριδόλη ($K_i = 1.24 \mu\text{M}$) (Tsitsanou et al. 2013), ενώ πρόσφατα μελετήθηκε η δράση του ελλαγικού ($K_i = 13.4 \mu\text{M}$) και του γαλλικού οξέος ($K_i = 1730 \mu\text{M}$) (Kyriakis et al. 2015). Και οι δυο ενώσεις

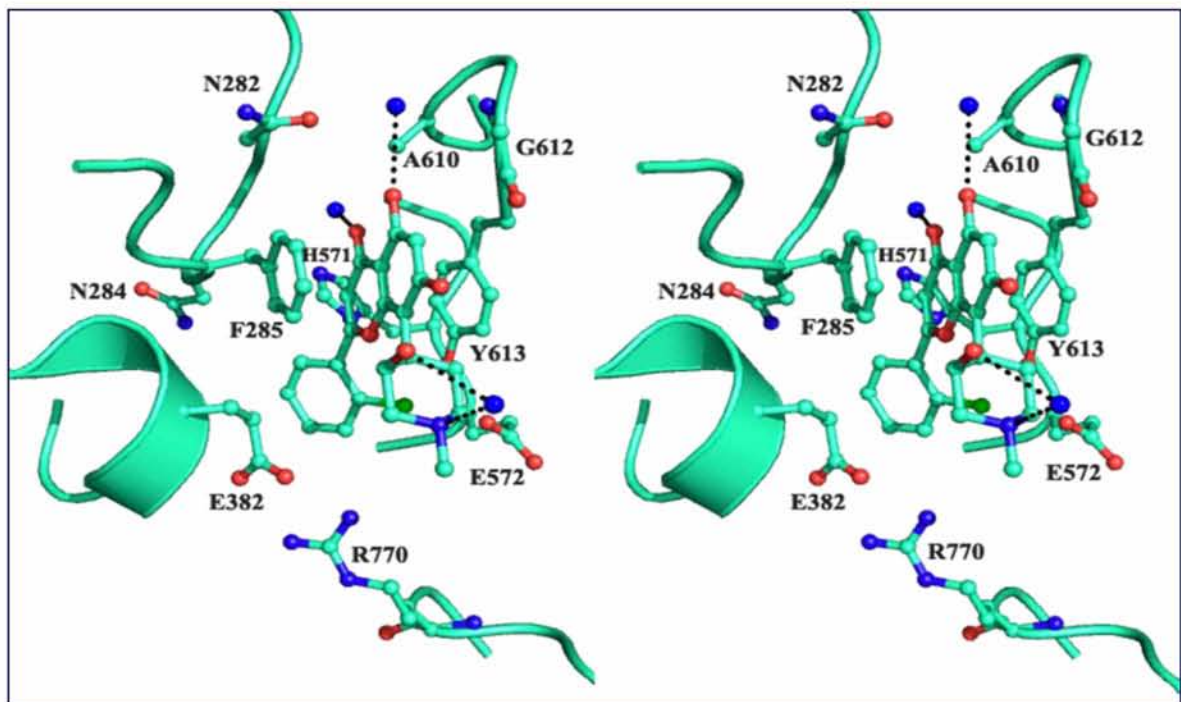
προσδένονται στο κέντρο αναστολής με παρόμοιο τρόπο με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή, ενώ η μελέτη ανέδειξε το ελλαγικό οξύ ως τον πλέον βιοδραστικό αναστολέα φυσικής προέλευσης που προσδένεται στο κέντρο

αναστολής της gmGP (Kyriakis et al. 2015). Στον πίνακα παρακάτω παρουσιάζονται μερικές από τις πιο βιοδραστικές ενώσεις για το κέντρο αναστολής.

Πίνακας 3.2: Μερικοί από τους πιο ισχυρούς αναστολείς του κέντρου αναστολής μαζί με τις τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i).

Όνομα	Χημική Δομή	K_i (μM)
Φλαβοπυριδόλη		1.16 1.24
Χρυσίνη		19.0
Καφεΐνη		130
Γαλλικό οξύ		1730

Ελλαγικό οξύ		13.4
--------------	---	------



Εικόνα 3.7: Πρόσδεση της φλαβοπυριδόλης στο κέντρο αναστολής της GP (PDB ID 1C8K) (Hayes et al. 2014)

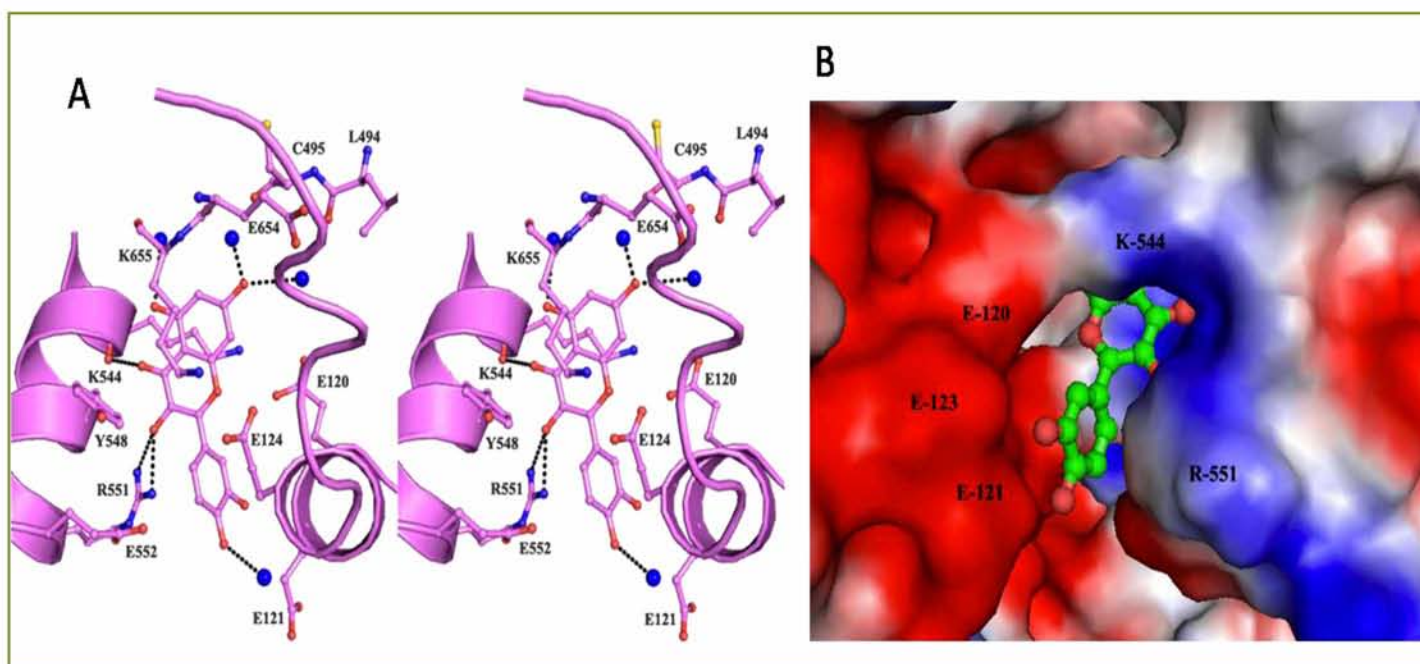
5) Κέντρο πρόσδεσης κερσετίνης

Η κερσετίνη ($IC_{50}= 4.8 \mu\text{M}$, gmGP_a, $IC_{50}=20.9 \mu\text{M}$, gmGP_b) (Jakobs et al. 2006) ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Πρόσφατες κρυσταλλογραφικές μελέτες (Kantsadi et al. 2014) έδειξαν πως προσδένεται σε ένα καινούριο κέντρο σύνδεσης. Το κέντρο αυτό βρίσκεται 15 \AA από το καταλυτικό, 43 \AA από το αλλοστερικό και 32 \AA

από το κέντρο αναστολής. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης είναι μια κοιλότητα, η οποία συγκροτείται από τα αμινοξέα Lys544, Arg551, Lys655, και Tyr548 από τη μια πλευρά και τα αμινοξέα Glu120 και Glu123 από την άλλη πλευρά (Εικόνα 3.8.). Σύγκριση των δομών του συμπλόκου της κερσετίνης με τη gmGP_b και της ελεύθερης

rmGPb στη διαμόρφωση T έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές. Αντιθέτως οι διαφορές με τη δομή της διαμόρφωσης R (PDB ID 3E3L, Leonidas et al unpublished results), ήταν σημαντικές. Η σημαντικότερη διαφορά εντοπίζεται στη διαμόρφωση του βρόχου 548-556, που σχηματίζει την μια πλευρά του κέντρου σύνδεσης της κερσετίνης. Οι διαφορές αυτές έχουν παρατηρηθεί

και κατά τη μετάπτωση από τη διαμόρφωση T στην R (Barford and Johnson 1989). Ως εκ τούτου φαίνεται ότι η πρόσδεση της κερσετίνης προάγει τη λιγότερη δραστική διαμόρφωση T του ενζύμου μέσω σταθεροποίησης του βρόχου 280s στη διαμόρφωση T της rmGPb, παρέχοντας έτσι μια δομική εξήγηση για την ανασταλτική της δράση (Kantsadi et al. 2014).



Εικόνα 3.8: (A) Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει η κερσετίνη μετά την πρόσδεση της με αμινοξέα και μόρια ύδατος της πρωτεΐνης (PDB ID 4MRA). (B) Διάταξη της κερσετίνης στην επιφάνεια της rmGPb. Τα φορτισμένα κατάλοιπα παρουσιάζονται με κόκκινο (αρνητικά φορτισμένα) και κυανό (θετικά φορτισμένα) (Kantsadi et al. 2014)

6) Νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια των δύο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPb που σχηματίζεται από

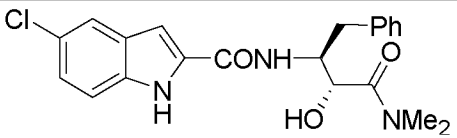
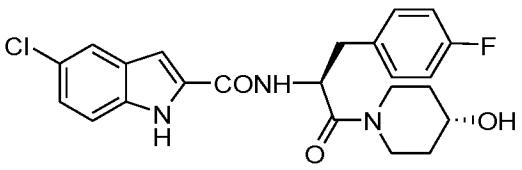
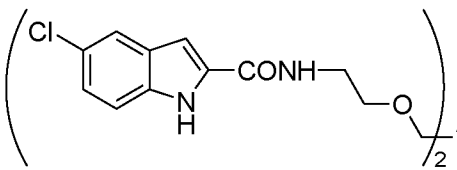
την ένωση των δυο υπομονάδων. Το κέντρο αυτό απέχει 15 Å από το αλλοστερικό, 33 Å από το καταλυτικό και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Η κεντρική κοιλότητα του κέντρου σχηματίζεται στο ένα άκρο του από

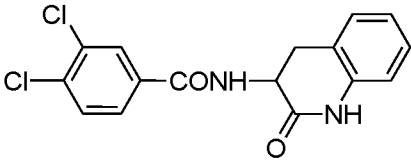
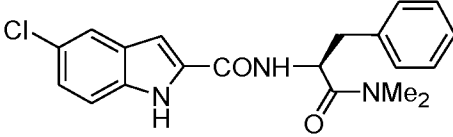
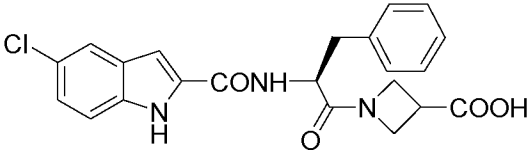
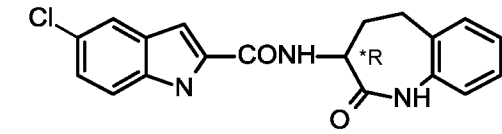
τα αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής του επικαλύμματος και την έλικα α2 (αμινοξέα Arg33, His34, Arg60 και Asp61 και τα αντίστοιχα αμινοξέα της συμμετρικής υπομονάδας) και στο άλλο άκρο από τις έλικες του πύργου α7 (αμινοξέα Asn270, Glu273 και Ser276 και τα αντίστοιχα αμινοξέα της συμμετρικής υπομονάδας). Στη διαμόρφωση T της GPb η κοιλότητα έχει μήκος περίπου 30 Å και ακτίνα από 4 έως 8 Å (Oikonomakos et al. 2000). Τα 18 αμινοξικά κατάλοιπα (9 από κάθε υπομονάδα) τα οποία συγκροτούν το νέο αλλοστερικό κέντρο είναι εξαιρετικά

διατηρημένα στις τρεις ισομορφές της GP (μυς, ήπαρ και εγκέφαλος) του ανθρώπου και του ποντικού (Hudson et al. 1993).

Οι πιο δραστικοί αναστολείς που προσδένονται στο νέο αλλοστερικό κέντρο παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3. Οι αναστολείς που προσδένονται σε αυτό το κέντρο σύνδεσης δρουν ως κλασικοί αλλοστερικοί αναστολείς σταθεροποιώντας την διαμόρφωση T του ενζύμου και εμφανίζουν συνεργατικότητα με άλλους αναστολείς, όπως η γλυκόζη (Oikonomakos et al. 2000, Rath et al. 2000).

Πίνακας 3.3: Οι πιο ισχυροί αναστολείς του νέου αλλοστερικού κέντρου μαζί με τις τιμές IC_{50} για την rmGPa (Hayes et al. 2014)

Χημική Δομή	IC_{50} (μM)
 CP91149	0.13
 CP320626	0.2
 CP526423	0.006

	1.37
	0.082
 CP403700	0.045
	0.099

5) Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται σε μια βαθειά σχισμή στο κέντρο του μονομερούς, μεταξύ των δύο αυτοτελών περιοχών, πολύ κοντά στη φωσφορική πυριδοξάλη και στο C-τελικό άκρο του β-ελάσματος που συμμετέχει στη δημιουργία του κέντρου αναστολής.

Ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων Glc-1-P, Pi και αναλόγων τους όπως UDP-Glc (Weber et al. 1978, Barford et al. 1988). Το κέντρο βρίσκεται σε απόσταση 32 Å από το αλλοστερικό, γεγονός που επιβεβαιώνει τη θεωρία του αλλοστερισμού που προτάθηκε από

τους Monod, Wyman, και Changeaux (Monod et al. 1965) για α) μη άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του υποστρώματος (ή των υποστρωμάτων) και του αλλοστερικού ενεργοποιητή και β) την εμφάνιση του αλλοστερισμού λόγω δομικών μεταπτώσεων που συνεπάγεται η σύνδεση ενός ειδικού τροποποιητή στην πρωτεΐνη.

Η πρόσβαση των υποστρωμάτων από το διάλυμα στο καταλυτικό κέντρο μπορεί να γίνει μόνο μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους περίπου 5 Å και μήκους 12-15 Å, που περιέχει μόρια ύδατος και το οποίο στη διαμόρφωση T φράσσεται από το βρόχο 280s

(αμινοξέα 279-285). Στην είσοδο του καναλιού βρίσκονται δύο υδρόφοβα αμινοξέα, η Phe285 και η Tyr613, τα οποία παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων IMP και AMP σταθεροποιούν την παρεμποδιστική διαμόρφωση του βρόχου 280s με αποτέλεσμα να διατηρείται κλειστό το κανάλι που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο και επομένως το ένζυμο να «παγώνει» στη διαμόρφωση T.

Η μετάβαση από τη διαμόρφωση T στην R τροποποιεί τη διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου κατά δύο τρόπους: α) ανοίγει ένα κανάλι για δίοδο του υποστρώματος καταστρέφοντας το κέντρο αναστολής και β) συγκροτείται το κέντρο αναγνώρισης των ορθοφωσφορικών ιόντων (Barford and Johnson 1989). Αυτές οι μεταβολές αντιπροσωπεύουν το κύριο χαρακτηριστικό της αλλοστερικής μετάπτωσης αφού η συγγένεια του καταλυτικού κέντρου για τα ορθοφωσφορικά ιόντα είναι 15 φορές μεγαλύτερη στη διαμόρφωση R από ότι στην T (Helmreich and Cori 1964, Kastenschmidt et al. 1968). Η παρουσία του κέντρου σύνδεσης των ορθοφωσφορικών ιόντων στη διαμόρφωση R ταυτοποιήθηκε από την ύπαρξη ισχυρής ηλεκτρονιακής πυκνότητας για τα θειικά ιόντα που συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο στην κρυσταλλική δομή της διαμόρφωσης R (Barford and Johnson 1989).

Η μετάπτωση από τη διαμόρφωση T στην R συμβαίνει με την αναδιάταξη του βρόχου 280s ο οποίος μετατοπίζεται για τη διάνοιξη ενός καναλιού. Η αλλαγή αυτή συνοδεύεται από τη μετατόπιση της Arg569 προς το καταλυτικό κέντρο όπου καταλαμβάνει τη θέση του Asp283. Η αντικατάσταση μιας όξινης ομάδας από μια βασική αποτελεί τη βάση για τη δημιουργία του κέντρου σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας (Johnson et al. 1989, Oikonomakos et al. 1994). Τα υπόλοιπα αμινοξέα που συνεισφέρουν στη σύνδεση των ορθοφωσφορικών ιόντων βρίσκονται στη διαμόρφωση R στην ίδια θέση που έχουν και στη διαμόρφωση T. Αυτή η δομική μεταβολή επιτρέπει την πρόσβαση του γλυκογόνου στο καταλυτικό κέντρο και δημιουργεί ένα ευνοϊκό από ηλεκτροστατικής άποψης περιβάλλον για την 5'φωσφορική ομάδα του συνενζύμου PLP. Στη νέα της θέση η Arg569 αλληλεπιδρά με το θειικό ιόν που βρίσκεται στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο με τη σειρά του σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την 5'φωσφορική ομάδα της PLP ενώ ταυτόχρονα αποκλείονται μόρια ύδατος στο καταλυτικό κέντρο. Κρυσταλλογραφικά πειράματα έδειξαν ότι η Arg569 βρίσκεται εγκλωβισμένη στη διαμόρφωση T ενώ είναι εκτεθειμένη στη διαμόρφωση R όπου και αναπτύσσει ένα δεσμό υδρογόνου με τη φωσφορική ο-

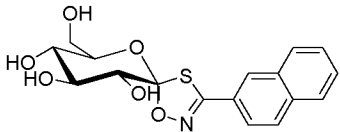
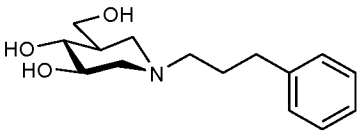
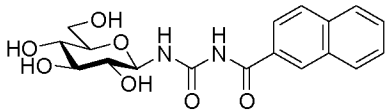
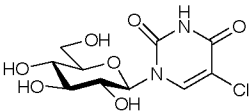
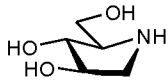
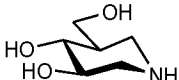
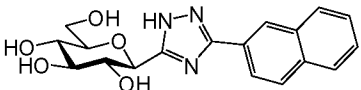
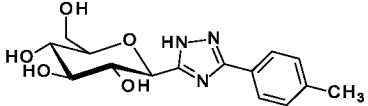
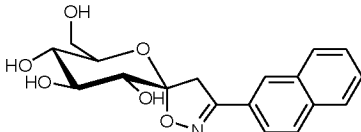
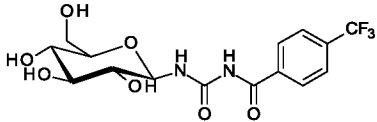
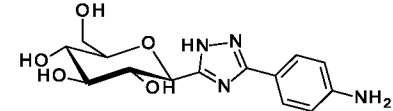
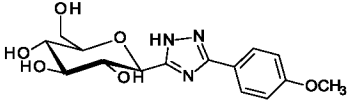
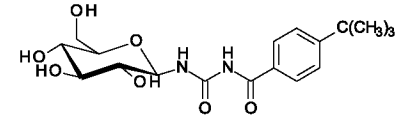
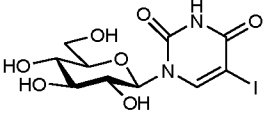
μάδα διαφόρων φωσφορυλιωμένων παραγώγων. Επίσης, στη διαμόρφωση R ο βρόχος 280s είναι αποδιατεταγμένος. Η αποδιάταξη αυτή οδηγεί σε καταστροφή του κέντρου αναστολής καταργώντας έτσι την αναστολή από νουκλεοτίδια (Barford and Johnson 1989, Johnson et al. 1990, Barford et al. 1991, Oikonomakos et al. 2006).

Το καταλυτικό κέντρο της μυϊκής φωσφορυλάσης παρουσιάζει καθολική ομολογία με το αντίστοιχο κέντρο της φωσφορυλάσης της μαλτοδεξτρίνης από *E. coli* γεγονός που επέτρεψε την πραγματοποίηση μιας σειράς πειραμάτων κατευθυνόμενης μεταλλαγμένης ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου στην κατάλυση (Schinzel and Palm 1990, Schinzel 1991, Schinzel and Drucekes 1991). Από τις μελέτες αυτές προέκυψε ότι η Lys568 βοηθάει στο σωστό προσανατολισμό της φωσφορικής ομάδας της PLP αφού η αντικατάσταση της από Ser οδηγεί σε απώλεια της καταλυτικής δράσης του ενζύμου. Επίσης, η Arg569 παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του ενεργού συμπλόκου GP-γλυκογόνου-Pi που οδηγεί στην παραγωγή προϊόντος. Η μετάλλαξη Arg569Gln προκαλεί μείωση κατά 7000 φο-

ρές της V_{max} και μικρή μεταβολή της K_m του ενζύμου. Άλλα αμινοξέα που επηρεάζουν την κατάλυση είναι η Tyr573 που βοηθάει στη σύνδεση της Glc-1-P και στη διατήρηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου στο καταλυτικό κέντρο όπως επίσης και η Lys574 που σταθεροποιεί τη σύνδεση των Pi και συνεισφέρει στη διατήρηση της διάταξης του υποστρώματος ή της PLP στο μεταβατικό στάδιο (Johnson 1992).

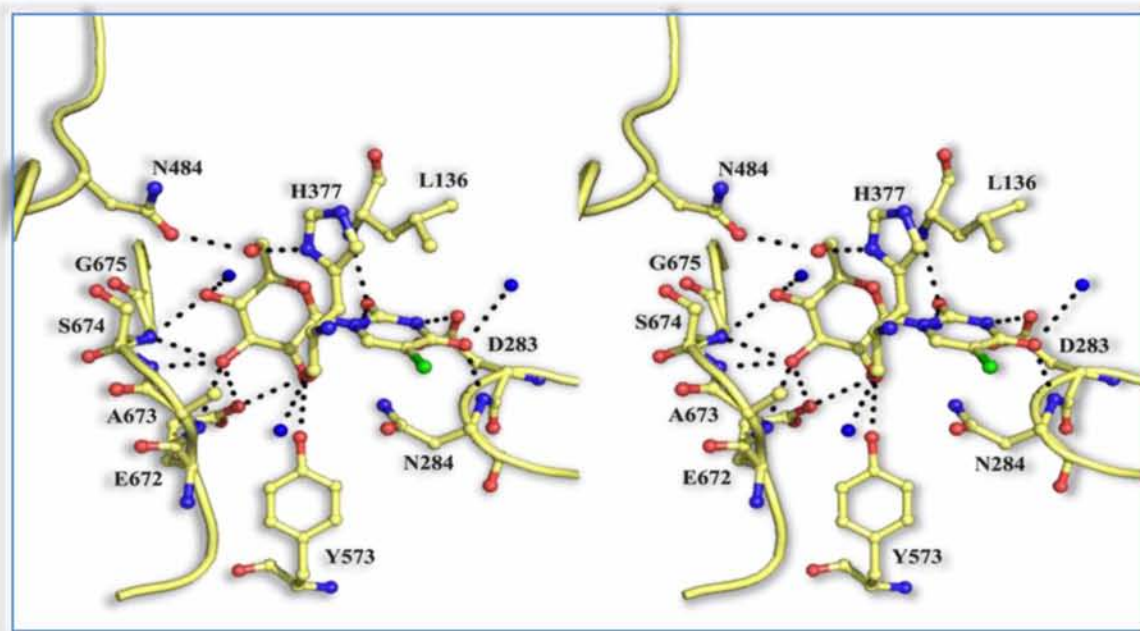
Οι αναστολείς που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο της GP σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s σταθεροποιώντας την ανενεργή διαμόρφωση T του ενζύμου. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος για την ανάπτυξη ανάλογων γλυκόζης με ανασταλτική δράση ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα. Κατά την προηγούμενη δεκαετία μελετήθηκε η σύνδεση περισσότερων από 150 αναστολέων του καταλυτικού κέντρου (Oikonomakos and Somsak 2008, Somsak et al. 2008, Praly and Vidal 2010, Somsak 2011, Kantsadi et al. 2012). Στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται οι πλέον βιοδραστικοί αναστολείς που έχουν βρεθεί για το καταλυτικό κέντρο.

Πίνακας 3.4: Χημική δομή των πλέον ισχυρών αναστολέων του καταλυτικού κέντρου με τις σταθερές αναστολής τους (K_i) (Hayes et al. 2014)

Χημική Δομή	K_i [μM]	Χημική Δομή	K_i [μM]
	0.16		0.84
	0.35		1.02
	0.3		1.21
	0.41		1.7
	0.63		1.8
	0.67		1.9
	0.7		1.94

Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου mGPb-α-D-γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως αφετηρία για το σχεδιασμό αναλόγων γλυκόζης που προσδέονται με μεγάλη συγγένεια στο καταλυτικό κέντρο. Στο σχεδιασμό αυτών των αναστολέων υπάρχει πάντα η

πρόνοια οι αναστολείς κατά τη σύνδεση τους να μιμούνται τις αλληλεπιδράσεις της γλυκόζης που σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s προάγοντας διαμόρφωση T του ενζύμου (Martin et al. 1991).



Εικόνα 3.9: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων της ένωσης GlcCIU (PDB ID 3T3E) στο καταλυτικό κέντρο της mGP (Kantsadi et al. 2012)

Η ηπατική και η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχουν 80% ομολογία ως προς την αμινοξική αλληλουχία (Johnson 1992). Αν και η ηπατική φωσφορυλάση δεν υπόκειται σε αλλοστερικό έλεγχο το καταλυτικό κέντρο και των δυο ισομορφών είναι ταυτόσημο τόσο σε αμινοξική αλληλουχία όσο και αρχιτεκτονική. Έτσι, τα συμπερά-

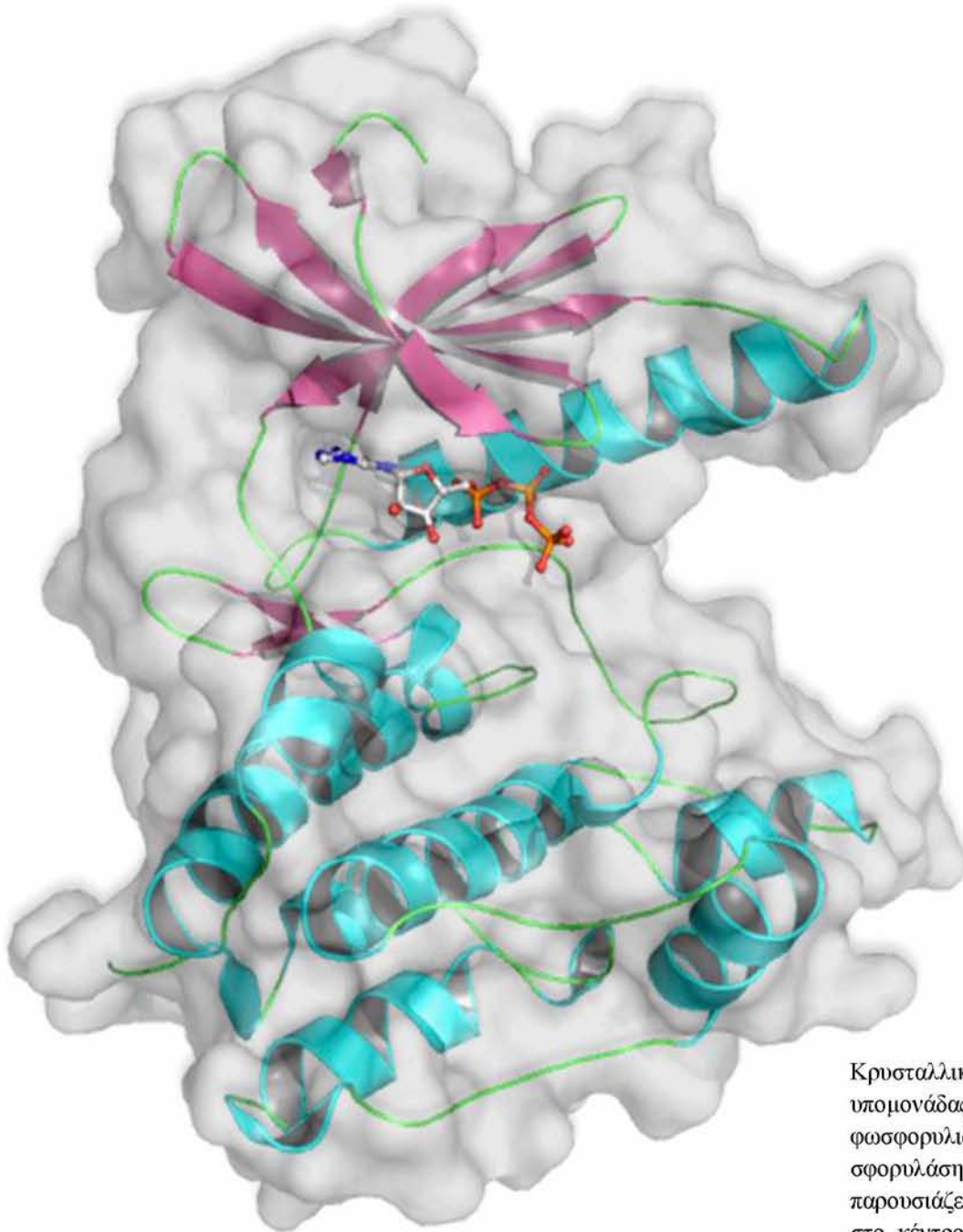
σματα που προκύπτουν από μελέτες πρόσδεσης στο καταλυτικό κέντρο της μυϊκής ισομορφής ισχύουν και για την ηπατική ισομορφή.

Η διαφορά στον τρόπο ρύθμισης των δυο ισομορφών εξυπηρετεί τις ανάγκες του ιστού στον οποίο εκφράζονται και οφείλεται στις δομικές διαφορές στη διεπιφάνεια των

υπομονάδων και όχι στα διαφορετικά αμινοξικά κατάλοιπα των κέντρων σύνδεσης. Στα αμινοξικά κατάλοιπα που σχηματίζουν την διεπιφάνεια υπάρχουν μόνο τρεις διαφορές ανάμεσα στην h1GP και την gmGP. Μεταβολές στο σχετικό προσανατολισμό των υδρόφοβων περιοχών των υπομονάδων και αλλαγές στο δίκτυο των δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων van der Waals μεταξύ των υπομονάδων προκαλούν αναδιάταξη της διεπιφάνειας των υπομονάδων. Αυτή η αναδιάταξη οδηγεί στη δημιουργία του διμερούς της h1GP που διαφέρει από εκείνου της μυϊκής ισομορφής (Rath et al. 2000). Η ύπαρξη των τριών ισομορφών καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη αναστολέων με επιλεκτικότητα για την ηπατική ισομορφή καθώς αυτή είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των επίπεδων γλυκόζης σε φυσιολο-

γικές τιμές. Η επίδραση των αναστολέων στην μυϊκή ισομορφή μπορεί να επιδράσει αρνητικά στο μεταβολισμό των μυών και τη λειτουργική τους ικανότητα (Lerin et al. 2004). Η ύπαρξη ισομορφών με μεγάλη ομολογία μεταξύ τους καθιστά δύσκολη την ανακάλυψη εξειδικευμένων αναστολέων. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο μεταβολισμού φαρμάκων τα οποία χορηγούνται δια στόματος, είναι δυνατόν να επιτευχθεί κατάλληλη δοσολογία του φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στην ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Agius 2007). Επίσης είναι απαραίτητο να μετρήσουμε τις σταθερές αναστολής διαφόρων ενώσεων καθώς η ισομορφή αυτή είναι ο στόχος του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων έναντι του διαβήτη τύπου II.

Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ



Κρυσταλλική δομή της γ -καταλυτικής υπομονάδας της PhK, του ενζύμου που φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκόσου (Στην εικόνα παρουσιάζεται και η πρόσδεση της ATP στο κέντρο σύνδεσης) (PDB ID CODE: 1PHK)

4. Κρυσταλλογραφία ακτίνων X

Η κρυσταλλογραφία ξεκίνησε αρχικά ως η επιστήμη που ασχολιόταν με τη μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων κρυσταλλικών μορφών της ύλης και αποτελούσε κλάδο της γεωλογίας και ειδικότερα της ορυκτολογίας. Ως κρύσταλλος χαρακτηρίζεται οποιοδήποτε στέρεο που παρουσιάζει κανονική γεωμετρική διάταξη των δομικών του στοιχείων. Η ανακάλυψη της περίθλασης ακτίνων X από κρυστάλλους σημείωσε τη γέννηση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, που χρησιμοποιεί τα διαγράμματα περίθλασης για την αποκάλυψη των ατομικών θέσεων σε ένα κρύσταλλο.

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 ευκρίνεια 2.3 Å), ο αριθμός των πρωτεϊνικών δομών που προσδιορίστηκαν με περίθλαση ακτίνων X αυξήθηκε κατά μεγάλο βαθμό με αποτέλεσμα μέχρι σήμερα να έχουν προσδιοριστεί περισσότερες από 8.000 δομές πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων (PDB).

Σήμερα η περίθλαση ακτίνων X αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών αλλά και άλλων μακρομορι-

ακών 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 πολύ μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Ωστόσο το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η δυσκολία στην κρυστάλλωση των μακρομορίων.

4.1 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Υπάρχουν πολλοί λόγοι που καθιστούν την κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης δύσκολη διεργασία. Τα πρωτεϊνικά μόρια είναι πολύ σύνθετα (μεγάλα, ευέλικτα μόρια συχνά αποτελούνται από πολλές υπομονάδες), σχετικά χημικά και φυσικά ασταθή ενώ έχουν δυναμικές ιδιότητες. Κάθε μακρομόριο έχει μοναδικές φυσικές και χημικές ιδιότητες που βασίζονται στη μοναδικότητα της αμινοξικής αλληλουχίας και της τρισδιάστατης δομής του. Οι ιδιότητες τους (π.χ. διαμόρφωση, φορτίο, σχήμα) εξαρτώνται από το περιβάλλον τους και έτσι όταν αυτό μεταβάλλεται μεταβάλλονται και αυτές.

Για να σχηματιστεί ένας κρύσταλλος, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης πρέπει να έχουν κατάλληλη γεω-

μετρική διευθέτηση. Το μέγεθος και η πολυπλοκότητα των πρωτεϊνών αντικατοπτρίζεται στην ικανότητά τους να σχηματίζουν πολλές διαφορετικές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, αλλά μόνο μερικές από αυτές τις επαφές οδηγούν στο σχηματισμό κρυσταλλικού πλέγματος. Επιπλέον, ο σχηματισμός κρυσταλλικού πλέγματος δεν οφείλεται στο μορίο της πρωτεΐνης μόνο, αλλά και στο διάλυμα στο οποίο βρίσκεται. Η ποικιλομορφία των χημικών ομάδων που εμπλέκονται στο σχηματισμό του κρυσταλλικού πλέγματος συνεπάγεται ότι μικρές αλλαγές στο pH, την ιοντική ισχύ ή τη θερμοκρασία μπορούν να επηρεάσουν έντονα την κρυστάλλωση (Durbin and Feher 1996). Δεν είναι ακόμη δυνατό να προβλεφθούν οι συνθήκες που απαιτούνται για να κρυσταλλωθεί μια πρωτεΐνη. Μεταβολές σε μια πειραματική παράμετρο μπορεί ταυτόχρονα να επηρεάσει αρκετές άλλες παραμέτρους. Για παράδειγμα, οι μεταβολές της θερμοκρασίας επηρεάζουν τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης, τα ποσοστά πυρήνωσης και ανάπτυξης κ.α. Επιπροσθέτως, η αλληλεπίδραση των παραμέτρων περιπλέκει ακόμα περισσότερο την ερμηνεία των πειραματικών αποτελεσμάτων. Ως εκ τούτου, η κατανόηση της πολυπλοκότητας των συνθηκών κρυστάλλωσης είναι περιορισμένη και, κατά συνέπεια, η

ανάπτυξη κρυστάλλων πρωτεΐνης συνδυάζει την τέχνη με την επιστήμη.

Για να επιτευχθεί κρυστάλλωση απαραίτητη προϋπόθεση είναι να δημιουργηθεί κατάσταση υπερκορεσμού του πρωτεϊνικού μορίου σε ένα διάλυμα. Η κατάσταση αυτή μπορεί να επιτευχθεί μέσω της προσέγγισης της θερμοδυναμικής ισορροπίας μεταξύ της στερεάς και της υγρής φάσης οπότε και οδηγούμαστε στη δημιουργία είτε κρυσταλλικού είτε άμορφου ιζήματος.

Η κατάσταση υπερκορεσμού επιτυγχάνεται όταν το χημικό δυναμικό του συστατικού i στο διάλυμα γίνει μεγαλύτερο απ' ό τι 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 and Giege 1992).

Η κατάσταση υπερκορεσμού μπορεί να διακριθεί σε δυο στάδια, α) **Μετασταθής κατάσταση**: όπου αναπτύσσονται οι ήδη υπάρχοντες κρύσταλλοι αλλά δεν δημιουρ-

γούνται νέοι πυρήνες κρυστάλλωσης, β) **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).

4.1.1. Στάδια κρυστάλλωσης

Η διαδικασία της κρυστάλλωσης των μορίων αντιπροσωπεύει ένα αντιστρεπτό φαινόμενο ισορροπίας, καθοδηγούμενο από την ελαχιστοποίηση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Τα μόρια χάνουν την ελευθερία περιστροφής και μετακίνησης δημιουργώντας πολλούς νέους και σταθερούς μη-ομοιοπολικούς χημικούς δεσμούς, μειώνοντας την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος. Γενικότερα, για να κρυσταλλωθεί μια ουσία μέσα σε ένα διάλυμα, είναι αναγκαίο να ελαττωθεί η διαλυτότητά της με ελεγχόμενο τρόπο, δηλαδή πρέπει πρώτα να έρθουν τα μόρια σε μια υπέρκορη κατάσταση (supersaturated state). Ο υπερκο-

ρεσμός είναι η κινητήρια δύναμη για την κρυστάλλωση, επηρεάζοντας το ρυθμό πυρήνωσης και ανάπτυξης των κρυστάλλων και για αυτό το λόγο θεωρείται η πιο κρίσιμη παράμετρος. Στο υπέρκορο διάλυμα, το οποίο αποτελεί μια θερμοδυναμικά ασταθή κατάσταση, αποσταθεροποιούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης και του διαλύτη καθιστώντας δυνατό το σχηματισμό κρυστάλλων. Όταν το διάλυμα επανέλθει σε ισορροπία, τα μόρια της πρωτεΐνης καθιζάνουν, είτε με μορφή κρυστάλλων, είτε ως άμορφα ιζήματα. Ο υπερκορεσμός αυτός μπορεί να επιτευχθεί μέσω σταδιακής αφυδάτωσης του διαλύτη και μέσω αλλαγής της διαλυτότητας του βιολογικού μορίου.

Κάτω από τυπικές συνθήκες δημιουργίας κρυστάλλων, οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης- πρωτεΐνης χαρακτηρίζονται από ισχυρές απωστικές δυνάμεις και μικρής εμβέλειας ελκτικές αλληλεπιδράσεις. Οι κρύσταλλοι παρουσιάζουν ένα μεγάλο βαθμό τάξης στο τρισδιάστατο εσωτερικό τους και μια σαφή, αν και όχι απαραίτητα, στοιχειομετρική χημική σύσταση. Η απόδοργάνωση αυτής της τάξης μπορεί να προκαλέσει την απώλεια της κρυσταλλικής ιδιότητας τους υλικού.

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται

κυρίως σε τρία διακριτά στάδια: α) Πυρήνωση, β) Ανάπτυξη πυρήνων και γ) Αναστολή της ανάπτυξης.

α) Πυρήνωση

Σε ένα υπέρκορο 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 όταν ο πυρήνας αποκτήσει ένα κρίσιμο μέγεθος. Προκειμένου, λοιπόν, να επιτευχθεί η ανάπτυξη μιας νέας φάσης στο υπέρκορο διάλυμα το σύστημα πρέπει να υπερκεράσει το ενεργειακό φράγμα, που καλείται ελεύθερη ενέργεια πυρήνωσης (Kam et al. 1978) και ορίζεται ως:

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

όπου

K: η σταθερά Boltzman

T: η θερμοκρασία

r: η ακτίνα του πυρήνα του κρυστάλλου

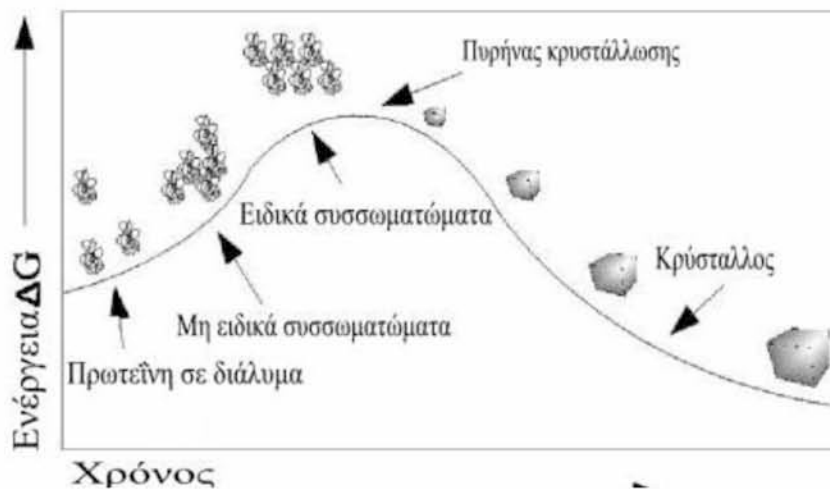
V: ο όγκος ενός μορίου στον κρύσταλλο

β: ο βαθμός υπερκορεσμού

γ: η διαφασική ενέργεια διαλύματος-κρυστάλλου

Για να μπορέσει να υπερκεράσει το ενεργειακό φράγμα και να αναπτυχθεί κρύσταλλος, πρέπει ο βαθμός υπερκορεσμού να είναι αρκετά υψηλός ώστε το εύρος των ενεργειακών διακυμάνσεων να είναι ικανοποιητικό (Mikol and Giege 1992). Από τη στιγμή που θα δημιουργηθεί ο πυρήνας τότε ξεκινά η αυθόρμητη ανάπτυξη του, ενώ μικρότερα συσσωματώματα τείνουν να διαλυτοποιηθούν. Ανάλογα με την κρυσταλλική δομή ο πυρήνας αποτελείται από 10 έως 200 μόρια, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για να σχηματιστεί ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες (Blundell and Johnson 1976).

Η πυρήνωση αποτελεί ίσως το πιο κατανοητό στάδιο της κρυστάλλωσης και η ποιοτική και ποσοτική περιγραφή της μπορεί να γίνει μέσω θερμοδυναμικών εξισώσεων. Σε ένα υπέρκορο διάλυμα η πυρήνωση θεωρείται ως μια αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού συσσωματωμάτων. Δύο συναγωνιστικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στο στάδιο της πυρήνωσης, εκ των οποίων η μια οδηγεί στη δημιουργία κρυσταλλικής δομής, ενώ η άλλη έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άμορφου ιζήματος (Kam et al. 1978).



Εικόνα 4.1: Γράφημα της ελεύθερης ενέργειας σε σχέση με το χρόνο κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης. Υπάρχει ένας ενεργειακός φραγμός που πρέπει να ξεπεραστεί προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι

β) Ανάπτυξη πυρήνων

Μετά την επίτευξη της πυρήνωσης, αρχίζει η διαδικασία ανάπτυξης των κρυστάλλων με επικάλυψη μορίων πρωτεΐνης από το διάλυμα στον πυρήνα, ενώ ταυτόχρονα, μειώνεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση του διαλύματος. Μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης αυτής επιτελείται στην περιοχή κοντά στην επιφάνεια του κρυστάλλου, με αποτέλεσμα νέα μόρια να διαχέονται προς αυτήν και να υπάρχει διαρκής μεταφορά ύλης (Kam et al. 1978).

γ) Αναστολή της ανάπτυξης

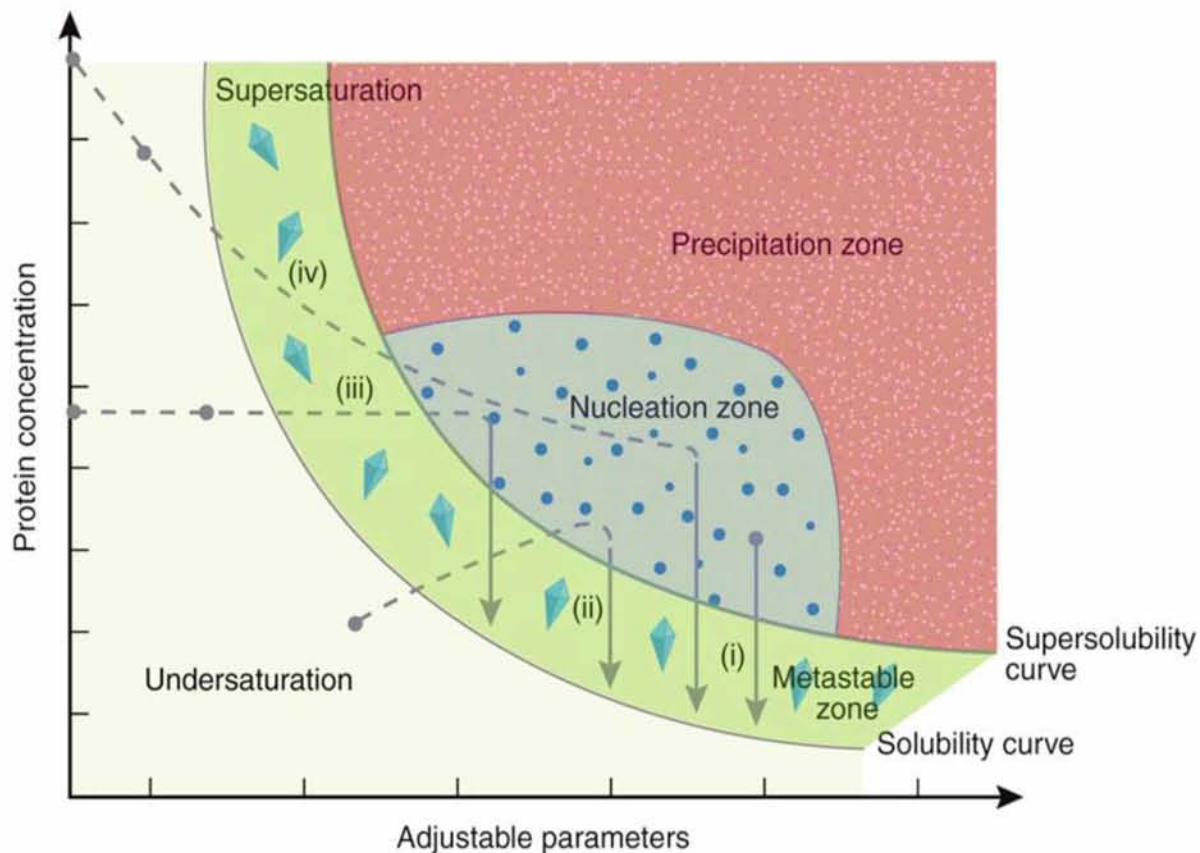
Η ταχύτητα ανάπτυξης καθορίζεται από τη μορφολογία του κρυστάλλου ή από τη διάχυση των πρωτεϊνικών μορίων. Με το δεδομένο ότι τα συστήματα κρυστάλλωσης

είναι συνήθως κλειστά, δηλαδή δεν προστίθεται πρωτεΐνη από εξωτερικούς παράγοντες, η ταχύτητα ανάπτυξης ελαττώνεται με το χρόνο και τελικά μηδενίζεται. Σε σειρά πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι, μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα, η αναστολή της ανάπτυξης δεν ήταν αποτέλεσμα της εξάντλησης της πρωτεΐνης του διαλύματος, αλλά αναστέλλεται εξαιτίας της μεταβολής κάποιων ιδιοτήτων της επιφάνειας του κρυστάλλου. Το φαινόμενο αυτό καλείται «δηλητηρίαση» των επιφανειακών κέντρων σύνδεσης και προκαλείται, είτε λόγω ένα-πόθεσης προσμίξεων στα κέντρα αυτά, είτε λόγω αδρανοποίησης της επιφάνειας των κρυστάλλων (Kam et al. 1978). Η ύπαρξη ξένων σωματιδίων, που λειτουργούν ως κέντρα σύνδεσης, επιταχύνει τη διαδικασία

της πυρήνωσης και γι' αυτό το λόγο, η χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη είναι απαραίτητο να έχει, όσο το δυνατόν, υψηλότερο βαθμό καθαρότητας. Ασφαλώς, όσο γρηγορότερα αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι, τόσο αυξάνει ο αριθμός των πυρήνων, με αποτέλεσμα στο τελικό διάλυμα να υπάρχουν περισσότεροι κρύσταλλοι, μικρότερου όμως μεγέθους.

4.1.2 Διάγραμμα φάσης

Όπως αναφέρθηκε αναγκαία συνθήκη για την ανάπτυξη κρυστάλλων είναι η δημιουργία ενός υπέρκορου διαλύματος πρωτεΐνης. Στα διαγράμματα φάσης η καμπύλη διαλυτότητας (solubility curve) διαχωρίζει την ακόρεστη περιοχή από την υπέρκορη περιοχή. Κάτω από την καμπύλη, η μόνη φάση που μπορεί να υπάρξει είναι η υγρή, κατά συνέπεια εκεί δεν αναπτύσσονται κρύσταλλοι.



Εικόνα 4.2: Στον κατακόρυφο άξονα αναπαριστάται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ενώ στον οριζόντιο οι παράμετροι που συμβάλλουν στην καθίζηση της πρωτεΐνης όπως η θερμοκρασία, το pH, άλατα, οργανικοί διαλύτες και πολυμερή. Το διάγραμμα αποτελείται από τέσσερις περιοχές, την ακόρεστη (*undersaturation*), τη μετασταθή ζώνη (*metastable*), τη ζώνη πυρήνωσης (*nucleation*) και τη ζώνη καθίζησης (*precipitation*). Η καμπύλη διαλυτότητας (*solubility curve*) διαχωρίζει τη ακόρεστη περιοχή από τη μετασταθή ζώνη στην οποία το διάλυμα είναι υπέρκορο και επιτρέπει την κρυσταλλική ανάπτυξη. Στη ζώνη πυρήνωσης δημιουργούνται συσσωματώματα τα οποία αποτελούν πυρήνες των κρυστάλλων που θα σχηματιστούν στη συνέχεια στην μετασταθή περιοχή (Chayen and Saridakis 2008).

Πάνω από την καμπύλη διαλυτότητας και υπό κατάλληλες συνθήκες πιθανόν να αναπτυχθούν κρύσταλλοι. Η ενέργεια του συστήματος σε σταθερές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, παραμένει επίσης σταθερή, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι το ενεργειακό επίπεδο είναι ακριβώς το ίδιο σε όλα τα σημεία του διαλύματος. Υπάρχουν διακυμάνσεις της ενέργειας γύρω από μια κεντρική τιμή και σε περιοχές του διαλύματος όπου ο βαθμός υπερκορεσμού είναι κατάλληλος και η ενέργεια αυξάνεται, ευνοείται η ανάπτυξη κρυστάλλων. Μόρια της διαλυμένης ουσίας σε αυτά τα σημεία του διαλύματος διατάσσονται αυθόρμητα με τρόπο χαρακτηριστικό της νέας φάσης. Οι σχηματισμοί που δημιουργούνται ονομάζονται συσσωματώματα και η δημιουργία τους μειώνει τελικά την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος. Τα συσσωματώματα αποτελούν πυρήνες των κρυστάλλων που επιδιώκουμε να αποκτήσουμε για αυτό και στο διάγραμμα φάσης αναφέρεται ως **ζώνη πυρήνωσης** (nucleation zone ή labile zone).

Τα μόρια θα τοποθετηθούν μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα στις θέσεις όπου οι ελκτικές δυνάμεις είναι μεγαλύτερες. Η ανάπτυξη των κρυστάλλων ευνοείται καθώς με τον τρόπο αυτό, το σύστημα μεταβαίνει σε κατάσταση χαμηλότερης ελεύθερης ενέρ-

γειας, ενώ ο σχηματισμός πολλών νέων χημικών δεσμών δημιουργεί μια υψηλής οργάνωσης εσωτερική δομή. Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται με τη μετάβαση σε χαμηλότερη ζώνη στο διάγραμμα φάσης, εντός των ορίων του υπέρκορου διαλύματος, η οποία ονομάζεται **μετασταθής ζώνη** (metastable zone). Σε αυτή τη ζώνη οι πυρήνες μετασχηματίζονται στους ζητούμενους καλοσχηματισμένους κρυστάλλους. Ωστόσο, η συγκεκριμένη περιοχή δεν ευνοεί την εξ' ολοκλήρου απ' την αρχή ανάπτυξη κρυστάλλων. Μόνο στις περιπτώσεις που ένας ήδη σχηματισμένος πυρήνας βρεθεί στη μετασταθή περιοχή, μπορεί να συνεχίσει να αναπτύσσεται. Γι' αυτό, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα φάσης, η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά τη μετάβαση από την ακόρεστη (ή κορεσμένη) περιοχή στην υπέρκορη και στη συνέχεια πάλι πίσω στην κατάσταση ισορροπίας όπου και θα εμφανιστούν οι κρύσταλλοι. Καθώς οι κρύσταλλοι μεγαλώνουν, η συγκέντρωση της διαλυμένης πρωτεΐνης μειώνεται, με αποτέλεσμα η μετασταθής ζώνη να μετατοπίζεται. Για αυτό κατά τη διαδικασία της κρυστάλλωσης οφείλουμε να επικεντρωθούμε στη συνεχή παρακολούθηση της μετασταθούς ζώνης.

Η τελευταία περιοχή που εμφανίζεται δεξιά, στα διαγράμματα φάσης, είναι η **ζώνη καθίζησης** (*precipitation zone*). Τα μόρια του διαλύματος που αποδεσμεύονται με άτακτο τρόπο από το διάλυμα, βυθίζονται και σχηματίζουν ένα άμορφο ίζημα (Saridakis and Chayen 2003).

Η κρυστάλλωση είναι μια πολυπαραμετρική διαδικασία και κάθε παράγοντας που την επηρεάζει δεν δρα ανεξάρτητα από τους υπόλοιπους. Σκοπός είναι να βρεθούν μια ή περισσότερες ομάδες παραμέτρων οι οποίες είναι κατάλληλες και μεταβάλουν τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης οδηγώντας στο σχηματισμό πυρήνων και κατ' επέκταση κρυστάλλων. Απότομη ελάττωση της διαλυτότητας οδηγεί σε άμορφα ιζήματα καθώς για να αναπτυχθεί ένας κρύσταλλος τα μεμονωμένα μόρια πρέπει να έχουν την ευκαιρία να αποτεθούν κανονικά στην επιφάνεια της ανάπτυξης του κρυστάλλου. Για αυτό η προσέγγιση του σημείου υπερκορεσμού γίνεται με πολύ αργό ρυθμό.

Η υψηλή τάξη των μορίων σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα μειώνει σημαντικά την εντροπία σε σχέση με το διάλυμα. Οι εξωτερικοί βαθμοί περιστροφικής και μεταφορικής ελευθερίας (κίνηση ολόκληρου μορίου) σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα είναι κατά πολύ λιγότεροι από εκείνους στο διάλυμα. Για παράδειγμα δύο μόρια στο διάλυμα έχουν το

καθένα πλήρη μεταφορική και περιστροφική ελευθερία σε τρεις διαστάσεις. Εάν τα δύο μόρια συναθροισθούν, ώστε να *σχηματίσουν τον πυρήνα* ενός κρυσταλλικού πλέγματος οι μετατοπίσεις τους γίνονται απόλυτα συσχετισμένες και οι εξωτερικοί βαθμοί ελευθερίας γίνονται λιγότεροι.

Σ' ένα επόμενο στάδιο, η αύξηση του κρυστάλλου θεωρείται ως προσθήκη μορίων στις ήδη υπάρχουσες επιφάνειες του κρυσταλλικού πλέγματος του πυρήνα. Η απώλεια εντροπίας σε αυτά τα επόμενα βήματα αναμένεται να είναι μικρότερη απ' ότι για το βήμα σχηματισμού του πυρήνα. Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου, επομένως, συμβαίνει σε δύο διακριτά βήματα:

1) ένα βήμα χαμηλής πιθανότητας για την πυρηνοποίηση και

2) ένα βήμα υψηλής πιθανότητας για την αύξηση (ή διάδοση) του μεγέθους του κρυστάλλου. Τα δύο βήματα στην ανάπτυξη κρυστάλλου είναι ανάλογα με τα βήματα στο μοντέλο «φερμουάρ» για τις δομικές μετατοπίσεις στα μακρομόρια.

Επιπλέον παρατηρείται, ότι το στάδιο πυρηνοποίησης απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη. Η απαραίτητη οδηγός δύναμη για την πυρηνοποίηση προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή αρκετά υψηλότερη από την

εγγενή διαλυτότητά τους (υπερκορεσμένη). Η επακόλουθη προσθήκη μορίων στις κρυσταλλικές επιφάνειες λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τον υπερκορεσμό, κοντά στην εγγενή διαλυτότητα. Κατά συνέπεια, η αύξηση είναι μια σειρά βημάτων μικροϊσορροπίας για τα μακρομόρια του διαλύματος που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του κρυσταλλικού πλέγματος.

Η πυρηνοποίηση που αναφέρθηκε παραπάνω είναι το σημαντικότερο από τα δύο βήματα. Εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, ο πυρήνας δεν σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλούς πυρήνες, που θα εξαντλήσουν τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μια πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Πρέπει να υπάρξει μια ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν αρκούντως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παράσχουν υψηλής ευκρίνειας, δεδομένα περίθλασης ακτίνων-Χ. Κατά συνέπεια, το διάλυμα των μακρομορίων πρέπει να συμπυκνωθεί με έναν πολύ καλά ελεγχόμενο τρόπο.

Κάποιοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης είναι: η καθαρότητα του πρωτεϊνικού δια-

λύματος, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, το pH, η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύ, οι διάφοροι προσδέτες, οι μη πολικοί διαλύτες, καθώς και άλλοι παράγοντες καθίζησης (McPherson 1999).

4.1.3 Μέθοδοι κρυστάλλωσης

Για την κρυστάλλωση μακρομορίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές τεχνικές οι οποίες οδηγούν τα μακρομόρια σε κατάσταση υπερκορεσμού. Οι κυριότερες από αυτές είναι: α) η διάχυση ατμών (vapor diffusion) (Μέθοδοι hanging drop –sitting drop), β) μικροσπορά/ μακροσπορά (microseeding-macro seeding), γ) η μέθοδος διαπίδυσης (dialysis) και δ) η στατική μέθοδος batch (Chayen 2004). Οι μέθοδοι αυτοί διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την διαλυτότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος και τον τρόπο με τον οποίο εκτίθεται το διάλυμα αυτό στους παράγοντες καθίζησης.

Στην παρούσα διατριβή θα αναλυθεί μόνον η στατική μέθοδος batch καθώς αυτή είναι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μεθόδους στις οποίες το πρωτεϊνικό διάλυμα μεταβαίνει σταδιακά στην κατάσταση υπερκορεσμού, ώστε να έρθει σε ισορροπία με το περιβάλλον του, στη μέθοδο batch ο υπερκορεσμός επέρχεται άμεσα κατά την ανά-

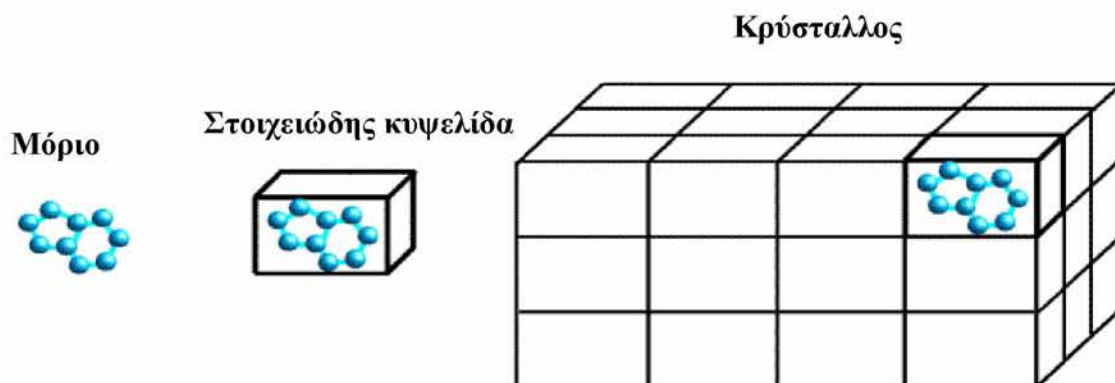
μειξη των διαλυμάτων (Chayen 2004). Στη συγκεκριμένη μέθοδο όλα τα συστατικά και των δύο διαλυμάτων αναμιγνύονται στις τελικές τους συγκεντρώσεις, μέσα σε κλειστό δοχείο. Στη συνέχεια το διάλυμα αφήνεται υπό σταθερές συνθήκες. Κάθε ένας από τους παράγοντες καθίζησης του τελικού διαλύματος συμβάλει σε διαφορετικό βαθμό στη διαδικασία της κρυστάλλωσης και η ταυτόχρονη δράση του συνόλου των παραγόντων οδηγεί στην ταχύτατη δημιουργία κρυσταλλικού ιζήματος. Το διάλυμα, στο διάγραμμα φάσης, μεταβαίνει άμεσα στην μετασταθή περιοχή όπου εμφανίζονται κρύσταλλοι.

Το γεγονός ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων του διαλύματος είναι άμεση σημαίνει ότι κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης οι συνθήκες δε θα μεταβληθούν έντονα. Το γεγονός αυτό, αφενός είναι θετικό γιατί μας επιτρέπει να γνωρίζουμε επακριβώς τις συνθήκες στις οποίες κρυστάλλωθηκε το σύστημα, αφετέρου όμως για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτείται να γνωρίζουμε με αρκετή ακρίβεια τις συνθήκες που είναι κατάλληλες για την ανάπτυξη κρυστάλλων στο συγκεκριμένο σύστημα. Πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί ότι καθώς τα δείγματα δεν εκτίθενται καθόλου στον αέρα κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης, προστατεύονται από τους ρύπους που μπορεί να περιέχει ο αέρας (Chayen 2004).

4.2 Κρύσταλλοι πρωτεϊνών

Τα στοιχεία και οι χημικές ενώσεις εμφανίζονται σε τρεις καταστάσεις, στερεή, υγρή και αέρια. Οι κρύσταλλοι είναι μια φάση της στερεής κατάστασης στην οποία τα μόρια (ή άτομα) που αποτελούν τον κρύσταλλο είναι περιοδικά διευθετημένα στο χώρο (Εικόνα 4.3). Πρέπει να τονιστεί όμως ότι κάθε περιοδική διευθέτηση μορίων δεν συνεπάγεται ότι πρόκειται για κρύσταλλο. Η διάκριση των κρυστάλλων βασίστηκε αρχικά στα εξωτερικά γνωρίσματα των κρυστάλλων και στις ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες που εμφανίζουν. Τα κυριότερα γνωρίσματα των κρυστάλλων είναι η συμμετρία και η περιοδικότητα.

Ο κρύσταλλος δημιουργείται μέσω της επανάληψης με απλή μετάθεση ενός βασικού μοτίβου που έχει το σχήμα ενός παραλληλεπίπεδου το οποίο ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα. Ο κρύσταλλος αποτελείται από όμοιες κυψελίδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και επαναλαμβάνονται στις τρεις διαστάσεις, ώστε να δημιουργούν ένα κανονικό τρισδιάστατο πλέγμα. Αυτό περιορίζει αυτόματα τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας σε ένα παραλληλεπίπεδο, με τέσσερις ακμές ανά μια έδρα και έξι έδρες ανά μοναδιαία κυψελίδα. Ως στοιχειώδης κυψελίδα ορίζεται η μικρότερη στοιχειώδης ομάδα η οποία απαιτείται για να

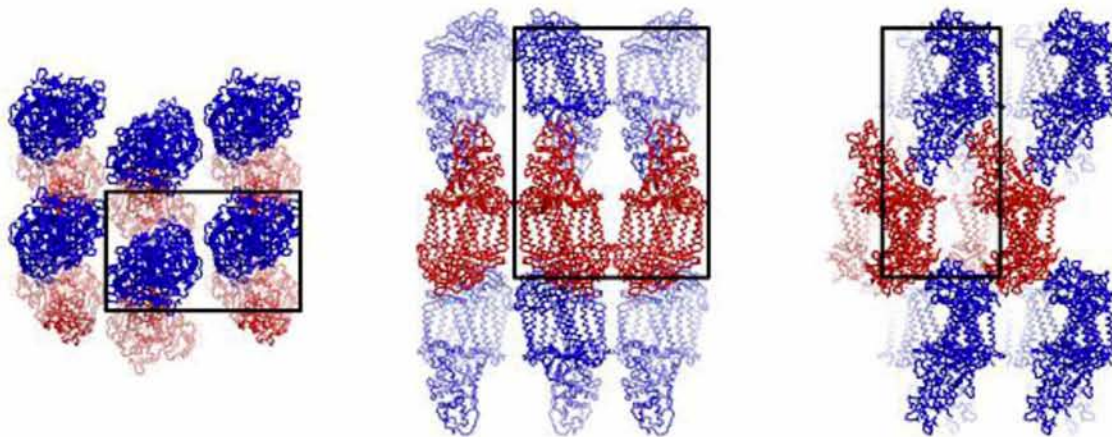


Εικόνα 4.3: Διαδοχικές κυψελίδες (στον τρισδιάστατο χώρο) είναι μεταξύ τους πανομοιότυπες τόσο σε διάστασεις όσο και σε περιεχόμενα και συγκροτούν τον κρύσταλλο

δημιουργηθεί ολόκληρος ο κρύσταλλος με επαναλαμβανόμενη συμμετρία και αντιπροσωπεύει πλήρως την κρυσταλλική δομή. Ασύμμετρη μονάδα θεωρείται η χωρίς εσωτερική συμμετρία μοριακή οντότητα η οποία με την εφαρμογή κατάλληλων τελεστών συμμετρίας δομεί τη στοιχειώδη κυψελίδα και κατά συνέπεια τον κρύσταλλο (Blundell and Johnson 1976).

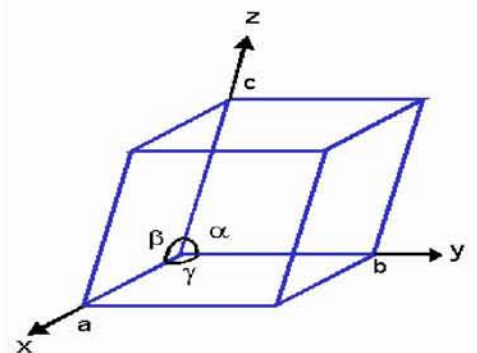
Στην απλούστερη περίπτωση η στοι-

χειώδης κυψελίδα περιέχει ένα μόνο μόριο, συνήθως όμως αποτελείται από δυο ή περισσότερα μόρια συνδεόμενα με κάποιο είδος συμμετρικής διευθέτησης, έτσι ώστε να συμπληρώνουν τον χώρο πιο ικανοποιητικά παρά αν ήταν το καθένα μόνο του (Εικόνα 4.4). Οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων



Εικόνα 4.4: Τρεις ορθοκανονικές όψεις ενός μικρού τμήματος από έναν πρωτεϊνικό κρύσταλλο ο οποίος περιέχει περισσότερα από ένα αντίγραφα της πρωτεΐνης ανά στοιχειώδη κυψελίδα. Οι μαύρες γραμμές δείχνουν τα όρια της στοιχειώδους κυψελίδας, ενώ με μπλε και κόκκινο χρώμα αναπαρίστανται διαφορετικά αντίγραφα της πρωτεΐνης (Γλυκός 2015).

που περιέχεται στη στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος.



Εικόνα 4.5: Στοιχειώδης κυψελίδα με διανύσματα **a**, **b** και **c**. Οι γωνίες ανάμεσα στα διανύσματα είναι οι α , β και γ .

Το μέγεθος και η μορφή της στοιχειώδους κυψελίδας μπορεί να περιγραφεί από τρία διανύσματα **a**, **b** και **c** (Εικόνα 4.5) τα οποία έχουν κοινό σημείο επαφής μια γωνία της κυψελίδας και καλούνται κρυσταλλογραφικοί άξονες. Το σύνολο των διανυσμάτων **a**, **b**, **c** και των γωνιών α , β , γ που σχηματίζουν μεταξύ τους ονομάζονται πλεγματικές παράμετροι και ορίζουν πλήρως τη στοιχειώδη κυψελίδα. Η εσωτερική τάξη και η συμμετρία που υπάρχει σε ατομικό επίπεδο, αντανakλάται και μακροσκοπικά

στη μορφολογία των κρυστάλλων οι οποίοι σχηματίζουν κανονικά γεωμετρικά σχήματα. Τα βασικά είδη συμμετρίας τα οποία απαιτούνται για να περιγράψουν τη συμμετρία των κρυστάλλων είναι: (α) η μετακίνηση (translation), (β) η περιστροφή γύρω από έναν άξονα (στοιχείο: άξονας περιστροφής, rotational axis) και (γ) η ανάκλαση (στοιχείο: επίπεδο-καθρέφτης, mirror-plane). Συνδυασμοί αυτών των στοιχείων παράγουν πολύπλοκότερα στοιχεία συμμετρίας, συμπεριλαμβανομένων των κέντρων συμμετρίας (symmetry centers), οι άξονες βίδας (screw axis) και επίπεδα ολίσθησης (glide planes) (Lattman and Loll 2008).

Υπάρχουν επτά Κρυσταλλικά Συστήματα για την περιγραφή των κρυστάλλων και είναι η βάση για την ταξινόμησή τους. Ανάλογα με τις σχέσεις ανάμεσα στις σταθερές της κυψελίδας, ο κρύσταλλος κατατάσσεται ανάλογα σε ένα από τα παρακάτω συστήματα: Κυβικό, Τετραγωνικό, Ορθορομβικό, Εξαγωνικό, Ρομβοεδρικό (και Τριγωνικό), Μονοκλινές και Τρικλινές. Στον Πίνακα 4.1 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά κάθε συστήματος.

Πίνακας 4.1: Τα επτά κρυσταλλικά συστήματα και τα χαρακτηριστικά τους.

Κρυσταλλικό σύστημα	Χαρακτηριστικά
Κυβικό (Cubic)	$a = b = c$ και $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Τετραγωνικό (Tetragonal)	$a = b \neq c$ και $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Ορθορομβικό (Orthorhombic)	$a \neq b \neq c$ και $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Εξαγωνικό (Hexagonal)	$a = b \neq c$ και $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Ρομβοεδρικό (Rhombohedral)	$a = b = c$ και $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
Τριγωνικό (Trigonal)	
Μονοκλινές (Monoclinic)	$a \neq b \neq c$ και $\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta \neq 90^\circ$
Τρικλινές (Triclinic)	$a \neq b \neq c$ και $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$

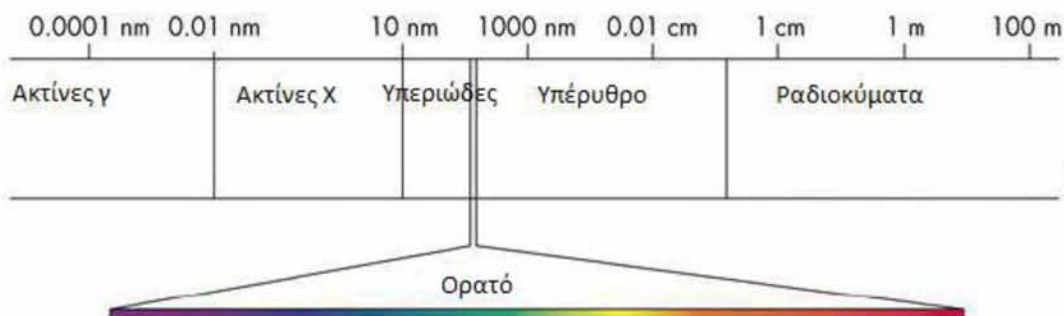
Συνδυάζοντας όλα τα στοιχεία συμμετρίας του τρισδιάστατου χώρου προκύπτουν συνολικά 230 διαφορετικοί συνδυασμοί που ονομάζονται ομάδες χώρου (space groups), έτσι η στοιχειώδης κυψελίδα κάθε κρυστάλλου θα πρέπει να αντιστοιχεί σε ένα από αυτούς τους συνδυασμούς. Ειδικότερα στην περίπτωση των πρωτεϊνικών κρυστάλλων οι συνδυασμοί περιορίζονται σε 65 ομάδες χώρου διότι η χειρόμορφη φύση των πρωτεϊνών (αποτελούνται μονό από L- και όχι D-αμινοξέα) αποκλείει την ύπαρξη αξόνων

συμμετρίας που να είναι ταυτόχρονα και άξονες περιστροφής. Κάθε ομάδα χώρου καθορίζει τον τύπο του κρυσταλλικού πλέγματος και τη συμμετρία της στοιχειώδους κυψελίδας. Τα μήκη και οι γωνίες κυψελίδας καθορίζουν τις παραμέτρους της στοιχειώδους κυψελίδας, και η ομάδα χώρου μαζί με τις παραμέτρους της στοιχειώδους κυψελίδας καθορίζουν τη μορφολογία του κρυστάλλου (Lattman and Loll 2008).

4.3 Ακτινοβολία X και περίθλαση

Όπως και το ορατό φως, μια δέσμη ακτίνων-X είναι ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα το οποίο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός ηλεκτρικού πεδίου και ενός μαγνητικού πεδίου που ταλαντώνονται με σταθερή συχνότητα και πλάτος, κάθετα μεταξύ τους και στη διεύθυνση διάδοσης του κύματος. Παρ'όλα αυτά, το κύμα αυτό συγκρινόμενο με ένα κύμα ορατού φωτός, έχει πολύ πιο μικρό μήκος κύματος. Έτσι, ενώ το φάσμα του ορατού φωτός μπορεί να έχει μήκη κύματος από 4000 - 7000 Å, οι ακτίνες-X έχουν μήκη κύματος από 0,1- 10 Å και καταλαμβάνουν το τμήμα του φάσματος του φωτός ανάμεσα στην υπεριώδη και την ακτινοβολία γ. Οι ιδιότητες που χαρακτηρίζουν πλήρως ένα κύμα είναι το πλά-

τος, η φάση, το μήκος κύματος και η διεύθυνση διάδοσης. Οι ιδιότητες αυτές θα πρέπει να μετρηθούν πειραματικά για κάθε ένα από τα κύματα που σκέδασε ο κρύσταλλος για να μπορέσουμε (με τη βοήθεια της σύνθεσης Fourier) να υπολογίσουμε το μεγεθυμένο είδωλο του πρωτεϊνικού κρυστάλλου. Η μέση απόσταση μεταξύ των ομοιοπολικών συνδεδεμένων ατόμων στα πρωτεϊνικά μόρια είναι περίπου 1,4 Å. Για να επιτύχουμε λοιπόν ατομική ευκρίνεια είναι απαραίτητη ακτινοβολία με μήκος κύματος παραπλήσιο με τέτοιου μήκους αποστάσεις για τον λόγο αυτό η ακτινοβολία X αποτελεί την πιο σημαντική πηγή περίθλασης για την ανάλυση της δομής πρωτεϊνών (Lattman and Loll 2008).



Εικόνα: 4.6 Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας

Η πρόσπτωση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων ακτίνων-X πάνω σε ένα αντι-

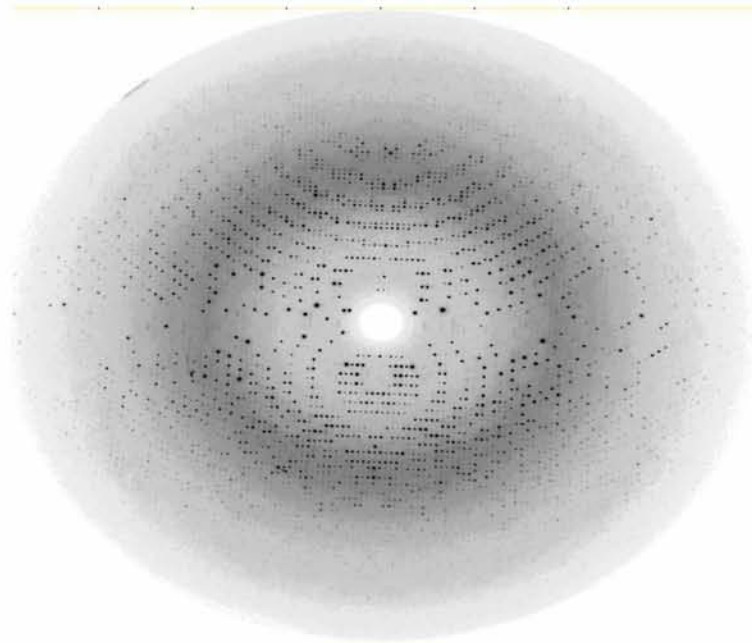
κείμενο (κρύσταλλος) έχει ως αποτέλεσμα την σκέδασή τους από τα ηλεκτρόνια του

αντικειμένου. Το πεδίο (μεταβαλλόμενο και περιοδικό) των ακτίνων-X εξαναγκάζει τα φορτία (ηλεκτρόνια και πρωτόνια) του υλικού να εκτελούν εξαναγκασμένη ταλάντωση. Η συχνότητα με την οποία ταλαντώνονται είναι ίδια με τη συχνότητα των ακτίνων-X, και συνεπώς η ακτινοβολία που δευτερογενώς εκπέμπουν έχει το ίδιο μήκος κύματος (και βεβαίως συχνότητα) με αυτήν της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Ένα ηλεκτρόνιο ενός ατόμου του κρυστάλλου που εκτελεί εξαναγκασμένη ταλάντωση εκπέμπει ακτινοβολία προς όλες τις διευθύνσεις γύρω του (και όχι μόνο προς κάποια συγκεκριμένη διεύθυνση). Επίσης στη σκέδαση από τους κρυστάλλους των ακτίνων-X συνεισφέρουν σχεδόν αποκλειστικά τα ηλεκτρόνια των ατόμων (και όχι οι πυρήνες με τα πρωτόνια τους). Ο λόγος για αυτό είναι ότι τα πρωτόνια έχουν μάζα ~1800 φορές μεγαλύτερη από αυτή των ηλεκτρονίων, συνεπώς το πλάτος της εξαναγκασμένης ταλάντωσης των πρωτονίων είναι πολύ μικρότερο από αυτό των ηλεκτρονίων και άρα η συνεισφορά τους στη σκεδαζόμενη (από τους κρυστάλλους) ακτινοβολία είναι αμελητέα. Με άλλα λόγια, σε ότι

αφορά τη σκέδαση των ακτίνων-X, είναι σαν οι κρύσταλλοι να αποτελούνται μόνο από ηλεκτρόνια. Επειδή οι ακτίνες X ουσιαστικά περιθλώνται από τα ηλεκτρόνια για αυτό και τα περιθλαστικά χαρακτηριστικά μιας στοιχειώδους κυψελίδας εξαρτώνται από την κατανομή των ηλεκτρονίων μέσα στον όγκο της κυψελίδας. Τα κύματα/δέσμες ακτίνων-X τα οποία θα σκεδαστούν από ολόκληρο τον κρύσταλλο προς κάποια συγκεκριμένη κατεύθυνση, γνωστές ως περιθλάσεις (reflections), θα είναι το άθροισμα ή καλύτερα το αποτέλεσμα της ενισχυτικής συμβολής, όλων των κυμάτων από κάθε ηλεκτρόνιο του κρυστάλλου.

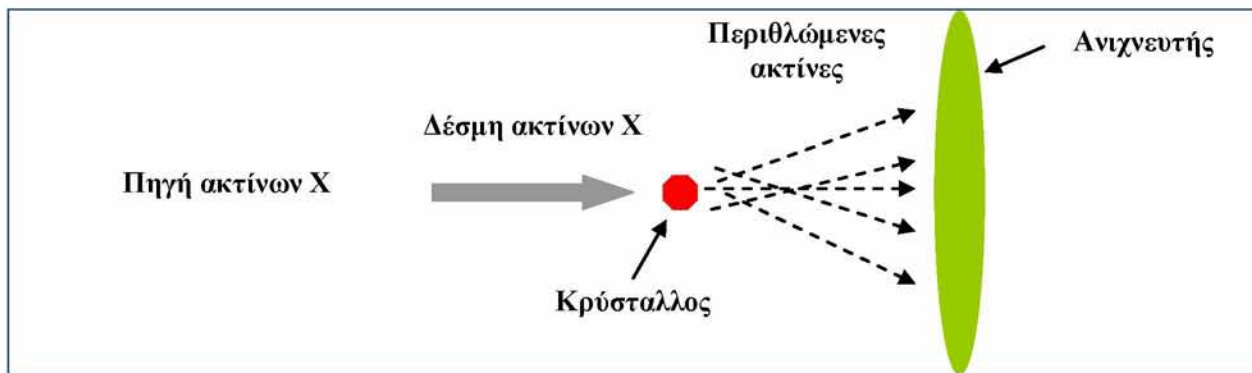
Από την αλληλεπίδραση των ακτίνων-X με το κρυσταλλικό δείγμα προκύπτει το διάγραμμα περίθλασης (ή περιθλασίγραμμα) το οποίο αποτελεί ένα είδος δακτυλικού αποτυπώματος του δείγματος (Γλυκός 2015). Παρακάτω παρουσιάζεται ένα παράδειγμα σκέδασης από πρωτεϊνικό κρύσταλλο όπου όσο πιο έντονη η αμαύρωση, τόσο μεγαλύτερη η ένταση (και το πλάτος) των κυμάτων ακτίνων-X που καταγράφονται από τον ανιχνευτή.



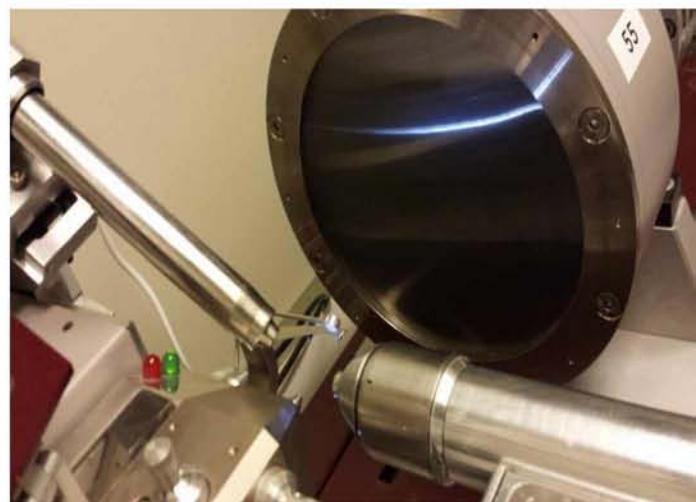
Εικόνα 4.7: Περιθλασίγραμμα που προέκυψε από περίθλαση ακτίνων X κρυστάλλου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b.

Απο τα παραπάνω προκύπτει η σημασία της χρήσης των κρυστάλλων στην τεχνική αυτή. Οι ακτίνες X περιθλώνται ασθενώς από ένα μεμονωμένο άτομο ή μόριο. Η περίθλαση τους όμως από ένα κρύσταλλο αυξάνεται αφού αυτός συνήθως περιέχει 10^{15} με 10^{18} μόρια. Επίσης η ακτινοβολία X η οποία δημιουργεί το περιθλασίγραμμα περιθλάται από όλα τα μόρια του κρυστάλλου, έτσι κάθε ένα μόριο στον κρύσταλλο λαμβάνει μικρότερη δόση ακτινοβολίας με αποτέλεσμα να μειώνεται η καταστροφή του δείγματος (Rhodes 1999).

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιείται για την περίθλαση ακτίνων X από κρυστάλλους περιλαμβάνει την πηγή ακτίνων X, τον πρωτεϊνικό κρύσταλλο και τον ανιχνευτή. Σε πείραμα μονοκρυστάλλου, ο κρύσταλλος είτε συγκρατείται από ένα δειγματοφορέα τύπου βρόχου (*loop*), είτε τοποθετείται μέσα σε κυλινδρικό τριχοειδή σωλήνα (*capillary*) σταθερά μπροστά από τη δέσμη.



Εικόνα 4.8: Απεικόνιση ενός πειράματος κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X



Εικόνα 4.9: Συσκευή κρυσταλλογραφίας ακτίνων X του εργαστηρίου MAX-lab του Lund University (αριστερά) όπου παρουσιάζονται η πηγή ακτίνων X και ο ανιχνευτής (δεξιά)

Ο κρύσταλλος τοποθετείται με κατάλληλο προσανατολισμό σε σχέση με την ακτίνα και τον ανιχνευτή. Όταν η ακτινοβολία X προσπέσει πάνω στον τρισδιάστατο κρύσταλλο, δεν εμφανίζονται όλες οι περιθλάσεις την ίδια στιγμή. Προκειμένου να ανακτήσουμε πληροφορία και για τις τρεις διαστάσεις θα πρέπει επαναληπτικά να περιστρέφουμε τον κρύσταλλο και να καταγράφουμε φάσματα περίθλασης από πολλές διαφορετικές όψεις (προβολές) του κρυ-

στάλλου, προκειμένου να συλλέξουμε ένα πλήρες σύνολο δεδομένων από έναν κρύσταλλο. Με σταδιακή περιστροφή του κρυστάλλου γύρω από άξονα κάθετο στις ακτίνες X, λαμβάνουμε ένα περιθλασίγραμμα ακτίνων X.

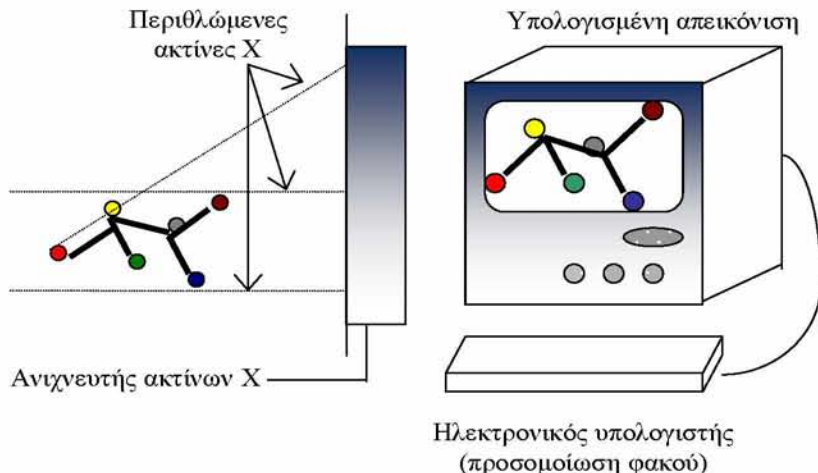
Όταν μια παράλληλη δέσμη ακτίνων X, που περιέχει συνεχές φάσμα μηκών κύματος, προσπέσει πάνω σε ένα κρύσταλλο τότε εμφανίζονται πολύ έντονες περιθλώμενες ακτίνες σε αυστηρά καθορισμένες διευθύν-

σεις που οφείλονται στην ενισχυτική συμβολή των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων (δηλαδή των ακτίνων X) που περιθλάστηκαν από τα ατομικά επίπεδα του κρυστάλλου. Με προσεκτική μελέτη της θέσης και της έντασης των αμαυρώσεων στο περιθλασίγραμμα μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα σχετικά με τις θέσεις των ατόμων στον κρύσταλλο. Η θέση μιας αμαύρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της διεύθυνσης κατά την οποία περιθλάστηκε από τον κρύσταλλο μια συγκεκριμένη ακτίνα. Οι εντάσεις των αμαυρώσεων αποτελούν τα πειραματικά δεδομένα του κρυσταλλογραφικού πειράματος.

Αναφέρθηκαν προηγουμένως οι ιδιότητες εκείνες οι οποίες θα πρέπει να μετρηθούν πειραματικά για κάθε ένα από τα κύματα που σκέδασε ο κρύσταλλος. Επειδή δεν υπάρχουν φακοί για ακτίνες-X, και το μήκος κύματός τους είναι πολύ μικρό (η συχνότητα τους υψηλή) δεν μπορούμε να μετρήσουμε τις φάσεις τους. Η αδυναμία της άμεσης μέτρησης των φάσεων αποτελεί ένα από τα σημαντικά προβλήματα στην κρυσταλλογραφία, γνωστό ως *πρόβλημα της φάσης*. Το μοναδικό που μπορούμε να κάνουμε είναι να συλλέξουμε τα κύματα που σκεδάζει ο κρύσταλλος με τη βοήθεια ενός ανιχνευτή μέσω του οποίου μπορούμε μόνο να μετρήσουμε το πλάτος (ένταση) των κυ-

μάτων. Από τη θέση πρόσπτωσης των κυμάτων στον ανιχνευτή (και δεδομένου ότι γνωρίζουμε τη σχετική θέση κρυστάλλου-ανιχνευτή) μπορούμε να βρούμε τη διεύθυνση των κυμάτων. Οι διευθύνσεις στις οποίες θα δούμε περίθλαση καθορίζονται από τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας, το πλάτος και η φάση των κυμάτων καθορίζεται από την εσωτερική δομή του κρυστάλλου. Επειδή στην περίπτωση των κρυστάλλων η σκέδαση έχει τη μορφή από διακριτές δέσμες (κύματα) ακτίνων-X, η διεύθυνση του κάθε ενός από τα περιθλώμενα (από τον κρύσταλλο) κύματα μπορεί να χαρακτηριστεί με τρεις ακέραιους αριθμούς, τους δείκτες hkl , ή δείκτες Miller (Γλυκός 2015).

Επόμενο βήμα είναι ο προσδιορισμός της εικόνας της πρωτεΐνης από τις παρατηρούμενες εντάσεις. Παρόλο που στη μικροσκοπία ορατού ή στην ηλεκτρονική μικροσκοπία οι περιθλώμενες ακτίνες εστιάζονται από φακούς σχηματίζοντας απευθείας μια εικόνα, φακοί που να εστιάζουν τις ακτίνες X δεν υπάρχουν. Η εικόνα σχηματίζεται χρησιμοποιώντας μια μαθηματική σχέση που ονομάζεται μετασχηματισμός Fourier και θα αναφερθεί παρακάτω. Με τον τρόπο αυτό κάθε αμαύρωση παράγει ένα κύμα ηλεκτρονικής πυκνότητας του οποίου το πλάτος είναι ανάλογο της τετραγωνικής



Εικόνα 4.10: Κρυσταλλογραφικό ανάλογο ενός φακού. Οι ακτίνες X που περιθλώνονται από το αντικείμενο συλλέγονται και μετρώνται από έναν ανιχνευτή. Στη συνέχεια οι μετρήσεις μεταφέρονται σε ένα ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος προσομοιώνει τη δράση ενός φακού προκειμένου να παράγει μια γραφική απεικόνιση του αντικειμένου (Τσιτσάνου 2001).

ρίζας της παρατηρούμενης έντασης. Κάθε κύμα έχει επίσης μια φάση (χρόνος που παρουσιάζει τα μέγιστα και τα ελάχιστα σχετικά με αυτά των άλλων κυμάτων) η οποία καθορίζει ποτέ αυτό ενισχύεται η αναιρείται από τα κύματα που παράγονται από τις άλλες κηλίδες.

4.4 Δείκτες Miller

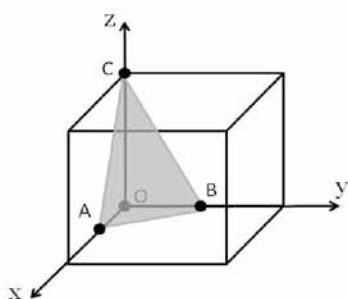
Συχνά γίνεται αναφορά σε συγκεκριμένες κατευθύνσεις μέσα στον κρύσταλλο οι οποίες ενδέχεται να παρουσιάζουν κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Για να γίνει όμως μια τέτοια αναφορά θα πρέπει να ορισθούν και να ονομαστούν με σαφήνεια οι κατευθύνσεις, οι διευθύνσεις και τα επίπεδα μέσα στον κρύσταλλο. Αυτό επιτυγχάνεται με τους κρυσταλλογραφικούς δείκτες. Συγκεκριμένα, μια οικογένεια ισοδύναμων επιπέδων του πλέγματος μπορεί να παρασταθεί

από τρεις αριθμητικές παραμέτρους h , k , ℓ οι οποίες είναι ευρύτερα γνωστές ως δείκτες Miller. Κάθε κρυσταλλογραφικό επίπεδο στον κρύσταλλο μπορεί να χαρακτηριστεί από αυτές τις παραμέτρους. Η σταθερά h δίνει τον αριθμό των επιπέδων στον άξονα x ή αντίστοιχα, τον αριθμό των τμημάτων στα οποία τέμνεται η πλευρά a της στοιχειώδους κυψελίδας από μια οικογένεια επιπέδων. Με την ίδια λογική, οι σταθερές k και ℓ δίνουν τον αριθμό των επιπέδων στους άξονες y και z . Κατά κανόνα, οι δείκτες Miller ορίζουν την κατεύθυνση και τον προσανατολισμό των επιπέδων μέσα σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα. Μπορεί να αναφέρονται σε μια συγκεκριμένη έδρα του κρυστάλλου, μια κατεύθυνση, ένα σύνολο εδρών ή ένα σύνολο κατευθύνσεων. Έστω μια κυψελίδα ορισμένη σε σχετική θέση επάνω σε σύστημα συντεταγμένων xyz , με αρχή συντεταγμένων

το σημείο O. Το κρυσταλλογραφικό επίπεδο ABC ορίζεται ως εξής:

$$h = \frac{a}{x}, k = \frac{b}{y}, l = \frac{c}{z}$$

όπου x, y, z οι συντεταγμένες του επιπέδου ABC ως προς την αρχή των αξόνων, δηλαδή οι συντεταγμένες των σημείων τομής με τους άξονες a, b, c του κρυστάλλου (Blundell and Johnson 1976).



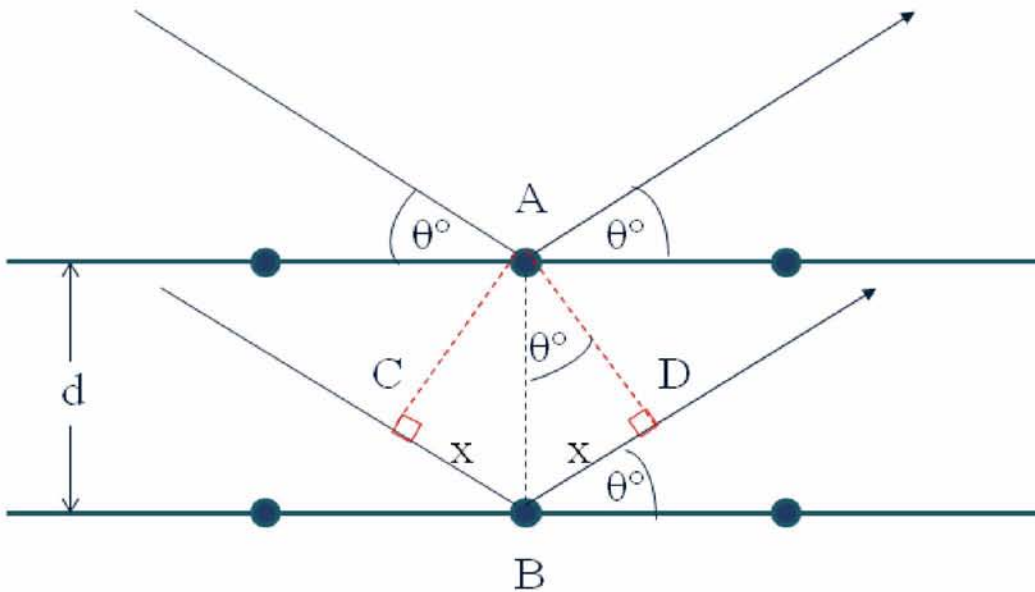
Εικόνα 4.11: Το κρυσταλλογραφικό επίπεδο ABC εντός μιας κυψελίδας του πλέγματος.

Από τα προηγούμενα προκύπτει ότι κάθε οικογένεια κρυσταλλογραφικών επιπέδων με δείκτες Miller (hkl) περιλαμβάνει επίπεδα του πλέγματος που είναι παράλληλα μεταξύ τους και σε σταθερή απόσταση, $d(hkl)$ μεταξύ δύο διαδοχικών επιπέδων. Η απόσταση αυτή είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος, εξαρτάται από το κρυσταλλικό σύστημα και τις διαστάσεις της στοιχειώ-

δους κυψελίδας για αυτό και αποτελεί χαρακτηριστικό μέγεθος (Lattman and Loll 2008).

4.5 Νόμος του Bragg

Το 1912 ο Βρετανός φυσικός William Henry Bragg (1862-1942) μαζί με τον γιό του William Lawrence Bragg (1890-1971), επίσης φυσικό, κατάφεραν να μελετήσουν την κρυσταλλική δομή των ενώσεων με τη βοήθεια των ακτίνων-X και να ανακαλύψουν το νόμο που φέρει το όνομά τους. Υπολόγισαν τις αποστάσεις μεταξύ των διατομικών επιπέδων του κρυστάλλου και ανέλυσαν τη γεωμετρική διευθέτηση των ατόμων στους απλούς κρυστάλλους. Το σημαντικότερο επίτευγμά τους ήταν ότι κατάφεραν να περιγράψουν το φαινόμενο της περίθλασης, συνδέοντας με έναν πολύ απλό νόμο τα πιο σημαντικά μεγέθη του φαινομένου. Ο νόμος αυτός συνδέει το μήκος κύματος λ των ακτίνων-X, με τη γωνία πρόσπτωσης θ πάνω στα διαδοχικά επίπεδα ενός κρυστάλλου καθώς και με την μεταξύ τους απόσταση d .



Εικόνα 4.12: Περίθλαση κύματος από δυο διαδοχικά επίπεδα που απέχουν μεταξύ τους απόσταση d .

Η περίθλαση των ακτίνων-Χ από ένα επίπεδο, είναι δυνατό να περιγραφεί από το νόμο του Bragg ο οποίος διατυπώνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta)$$

όπου n είναι ένας ακέραιος αριθμός, λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, d η απόσταση ανάμεσα στα παράλληλα επίπεδα του πλέγματος και θ η γωνία της περίθλασης.

Έστω δύο παράλληλα κρυσταλλικά επίπεδα με απόσταση d μεταξύ τους. Παράλληλες ακτίνες-Χ μήκους κύματος λ προσπίπτουν με γωνία πρόσπτωσης θ στις θέσεις Α και Β οι οποίες απέχουν επίσης απόσταση d και περιθλώνονται με την ίδια γωνία θ , σύμφωνα με τον νόμο της περίθλασης. Προκειμένου

να παρατηρηθεί έντονα το φαινόμενο της περίθλασης πρέπει τα δύο περιθλώμενα κύματα να συμβάλλουν ενισχυτικά, δηλαδή να παρουσιάζουν την ίδια χρονική στιγμή μέγιστα και ελάχιστα (να είναι σε φάση). Εποικοδομητική συμβολή των εξερχόμενων, από τα επίπεδα, ακτίνων εμφανίζεται όταν η διαφορά διαδρομής μεταξύ διαδοχικών ακτινοβολιών, είναι μηδενική ή ίση με ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος.

Αν η διαφορά διαδρομής είναι ίση με $n \cdot \lambda$, τότε τα κύματα είναι σε φάση, δηλαδή

$$\varphi = 2\pi \cdot n \quad \text{όπου } \varphi \text{ η γωνία φάσης}$$

Στην εικόνα 4.12, ισχύει $CB = BD = x$,

Πρέπει $n \cdot \lambda = 2 \cdot x$ (1), προκειμένου να ισχύει η προϋπόθεση της ενισχυτικής συμβολής.

Ωστόσο, στο τρίγωνο ABD (το οποίο είναι ορθογώνιο) ισχύει: $\sin(\theta) = \frac{BD}{AB} = \frac{x}{d}$

$$\text{Άρα } x = d \cdot \sin(\theta) \quad (2)$$

Ατικαθιστώντας στη σχέση (1) τη σχέση (2) προκύπτει $n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta)$, που αποτελεί τον κύριο όρο για το φαινόμενο της περίθλασης και της λήψης σήματος.

Η εξίσωση αυτή έχει λύσεις για πολλές τιμές του (n), και οι διαδοχικές λύσεις (για $n=1, 2, 3, \dots$ ή $n=-1, -2, -3, \dots$) αντιστοιχούν σε διαδοχικά μεγαλύτερες απόλυτες τιμές του $d \cdot \sin(2\theta)$, και συνεπώς σε διαδοχικά μεγαλύτερες τιμές του $\sin(2\theta)$, και συνεπώς σε διαδοχικά μεγαλύτερες τιμές της γωνίας 2θ .

Οι περιθλάσεις που έχουν μικρό θ (και είναι συνεπώς κοντά στην αρχή των αξόνων, κοντά στην κατεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας) περιέχουν χαμηλής ευκρίνειας πληροφορία, οι περιθλάσεις με μεγάλο θ (προς την περιφέρεια του φάσματος περίθλασης) περιέχουν την πληροφορία υψηλής ευκρίνειας.

Για κάποιες γωνίες πρόσπτωσης θ των εισερχόμενων ακτίνων, στις οποίες τυχαίνει τα κύματα των ακτινοβολιών να μη βρίσκονται σε φάση, επέρχεται καταστρεπτική συμβολή των κυμάτων, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μηδενική ένταση της ακτινοβολίας, ενώ για άλλες γωνίες πρόσπτωσης η

σκεδαζόμενη ακτινοβολία λαμβάνει ενδιάμεσες τιμές μεταξύ της μέγιστης και της ελάχιστης τιμής της έντασης.

Η εξίσωση (συνθήκη περίθλασης) εξαρτάται μόνο από το (d) και περιγράφει τις πιθανές διευθύνσεις που θα παρατηρήσουμε περίθλαση κάτι που εξαρτάται μόνο από τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας, χωρίς να παρέχεται πληροφορία για το πλάτος και τις φάσεις των κυμάτων. Το πλάτος και η φάση του κύματος που τελικά θα βγει από τον κρύσταλλο σε κάποια διεύθυνση (hkl) είναι το άθροισμα (το αποτέλεσμα συμβολής) όλων των κυμάτων από κάθε ηλεκτρόνιο κάθε ατόμου ολόκληρου του κρυστάλλου στη διεύθυνση (hkl) και εξαρτάται από τις σχετικές θέσεις (τη δομή) των ηλεκτρονίων του κρυστάλλου. Άρα το πλάτος και η φάση των κυμάτων καθορίζεται από την εσωτερική δομή του κρυστάλλου (Lattman and Loll 2008).

4.6 Ανάλυση Fourier

Ο παράγοντας δομής (structure factor) F_{hkl} αναπαριστά με πληρότητα (δηλαδή τόσο κατά πλάτος όσο και κατά φάση) το κύμα με διεύθυνση hkl . Το πλάτος και η φάση F_{hkl} του κάθε παράγοντα δομής καθορίζεται από τη δομή του κρυστάλλου. Σε κάθε παράγοντα δομής (σε κάθε περιθλώμενο κύμα) συνεισφέρουν όλα τα ηλεκτρόνια όλων των

ατόμων του κρυστάλλου. Το πλάτος και η φάση του F_{hkl} είναι, λοιπόν, το αποτέλεσμα της συμβολής των κυμάτων που σκέδασαν όλα τα ηλεκτρόνια του κρυστάλλου στη διεύθυνση hkl . Οι διαφορές στα πλάτη και τις φάσεις των διαφορετικών F_{hkl} οφείλονται στο ότι τα κύματα (από όλα τα ηλεκτρόνια του κρυστάλλου) συμβάλλουν με διαφορετικό τρόπο σε διαφορετικές διευθύνσεις.

Οποιαδήποτε περιοδική συνάρτηση, ανεξάρτητα του πόσο πολύπλοκη είναι, μπορεί να εκφραστεί με μια σειρά απλών αρμονικών όρων χρησιμοποιώντας το ανάπτυγμα Fourier. Το ανάπτυγμα σε σειρά, που είναι ένα άθροισμα ημίτονων και συνημίτονων, ονομάζεται σειρά Fourier. Επειδή το φάσμα περίθλασης διακρίνεται για την περιοδικότητα του, χρησιμοποιώντας τη σύνθεση Fourier μπορεί να παραχθεί το κύμα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας.

Η περιθλώμενη ακτίνα για μια ανάκλαση hkl μπορεί να περιγραφεί από τον παράγοντα δομής F που μας επιτρέπει να υπολογίσουμε φάσεις και πλάτη κυμάτων εάν γνωρίζουμε τη συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας ρ . Η εξίσωση του παράγοντα δομής σε μια διάσταση:

$$\vec{F}_h = \int_x \rho(x) e^{2\pi i h x} dx$$

Ο παράγοντας δομής F μπορεί ακόμη να εκφραστεί σαν μια συνεχής άθροιση των ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων σε όλο τον όγκο V της στοιχειώδους κυψελίδας.

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

Κάθε στοιχειώδης όγκος dV της κυψελίδας (και συνεπώς του κρυστάλλου) συνεισφέρει σε κάθε παράγοντα δομής. Η συνεισφορά του κάθε στοιχειώδους όγκου είναι ένα στοιχειώδες κύμα του οποίου το πλάτος είναι η τιμή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο dV και η φάση είναι $2\pi(hx+ky+lz)$ όπου (hkl) οι δείκτες Miller του παράγοντα δομής που εξετάζουμε και (xyz) οι κλασματικές συντεταγμένες του στοιχειώδους όγκου.

Η παραπάνω εξίσωση με μετασχηματισμό Fourier μετατρέπεται στην εξίσωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας.

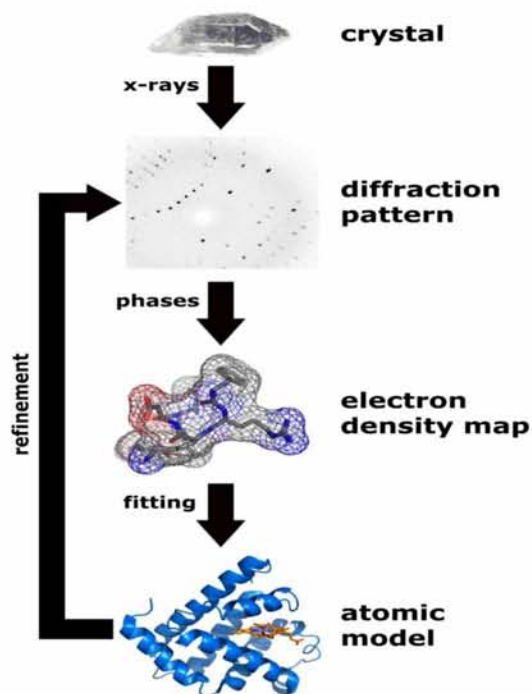
$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} \vec{F}_{hkl} e^{-2\pi i (hx+ky+lz)}$$

Η εξίσωση αποδεικνύει ότι ο προσδιορισμός της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, απαιτεί την κατασκευή της σειράς Fourier των παραγόντων δομής καθώς η τιμή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε κάθε θέση (xyz) της στοιχειώδους κυψελίδας καθορίζεται από

όλους τους παράγοντες δομής. Η εξίσωση αυτή αποτελεί τη βάση της μεθόδου Fourier για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής, διότι επιτρέπει τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε κάθε σημείο της στοιχειώδους κυψελίδας. Ο υπολογισμός της παραπάνω συνάρτησης προϋποθέτει τη γνώση της μορφής και του μεγέθους της κυψελίδας, καθώς, επίσης, και των παραγόντων δομής F_{hkl} , για κάθε μια από τις περιθλάσεις. Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι F_{hkl} γενικώς αποτελούν μιγαδικές ποσότητες, ο πλήρης χαρακτηρισμός τους γίνεται υπολογίζοντας το μέτρο $|F_{hkl}|$ και τη φάση ϕ_{hkl} αυτών.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η φάση δεν μπορεί να υπολογιστεί άμεσα πειραματικά. Η λύση του προβλήματος φάσης ισοδυναμεί με την επίλυση της δομής του κρυστάλλου μέσω της εύρεσης των θέσεων των ατόμων μέσα στη θεμελιώδη κυψελίδα. Ένας αριθμός μεθόδων έχει αναπτυχθεί για την επίλυση του προβλήματος φάσης, οι οποίες χωρίζονται σε άμεσες και έμμεσες. Οι έμμεσες οδηγούν στην επίλυση της δομής βασισόμενες σε κάποιες γνωστές φάσεις, ενώ οι άμεσες ξεκινούν με όλες τις φάσεις άγνωστες. Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται σήμερα για τον προσδιορισμό της φάσης. Στην πρώτη, που ονομάζεται μέθοδος μοριακής αντικατάστασης, χρησιμοποιείται μια ήδη γνωστή δομή είτε του ίδιου

ενζύμου είτε ενός άλλου που εμφανίζει όμως σημαντική ομολογία με το πρώτο. Η δεύτερη μέθοδος της ισόμορφης αντικατάστασης, περιλαμβάνει την αντικατάσταση ενός ατόμου ή μιας ομάδας ατόμων από κάποιο βαρύ άτομο, όπως ο Hg και ο Au, με το οποίο υπάρχει μεγάλη διαφορά στον ατομικό αριθμό. Τα άτομα αυτά εμφανίζουν διαφορές στην περιθλαστική ισχύ τους οι οποίες παρατηρούνται στο περιθλασίγραμμα (Rhodes 1999). Για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής οι μέθοδοι δεν θα αναλυθούν περαιτέρω.



Εικόνα 4.13 : Σχηματική αναπαράσταση του προσδιορισμού της δομής μιας πρωτεΐνης.

Στην εικόνα 4.13 παρουσιάζεται μια σύνοψη του συνόλου των διεργασιών που απαιτούνται για τον προσδιορισμό της δομής

μιας πρωτεΐνης, ξεκινώντας από την κρυστάλλωση και καταλήγοντας στην μοριακή απεικόνιση του μοντέλου.

4.7 Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας

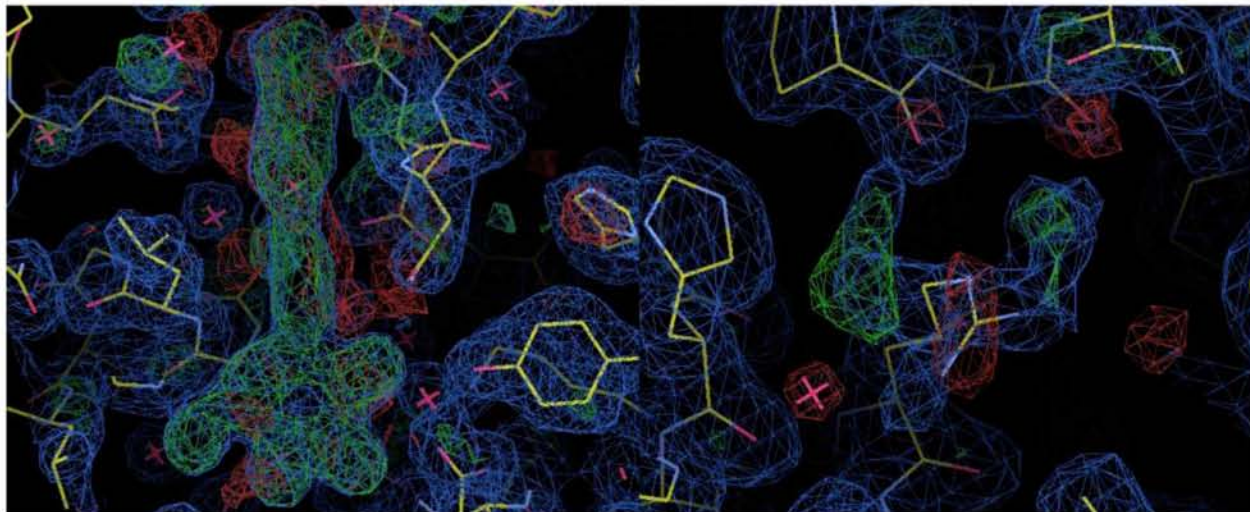
Αφού πραγματοποιηθεί η συλλογή των δεδομένων περίθλασης, η κάθε εικόνα μετατρέπεται με χρήση κατάλληλου λογισμικού σε μια λίστα από δείκτες Miller (hkl) με τις αντίστοιχες εντάσεις και τα σφάλματα των εντάσεων. Το επόμενο βήμα είναι ο συνδυασμός των εικόνων και η συγχώνευση των ισοδύναμων ανακλάσεων (scaling). Το αποτέλεσμα αυτής της επεξεργασίας είναι ένα αρχείο τύπου .mtz που αποτελεί το σύνολο των μοναδικών περιθλάσεων του κρυστάλλου.

Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας μπορεί να υπολογιστεί όπως αναφέρθηκε προηγουμένως από το πλάτος και τις φάσεις του συνόλου των παρατηρούμενων (πειραματικών) περιθλάσεων (F_{obs}) μέσω του μετασχηματισμού της εξίσωσης Fourier. Επειδή οι φάσεις δεν μπορούν να υπολογιστούν πειραματικά πολλές φορές υπολογίζονται χρησιμοποιώντας τη δομή ενός πρωτεϊνικού μοντέλου (F_{calc}). Ένας τέτοιος χάρτης (F_{obs} , F_{calc}) αντιπροσωπεύει μια προσέγγιση της πραγματικής δομής και η ακρίβεια του ε-

ξαρτάται από την ακρίβεια των φάσεων που έχουν χρησιμοποιηθεί.

Ένας άλλος τύπος χάρτη είναι ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, ο οποίος υπολογίζεται από τις διαφορές μεταξύ των παρατηρούμενων (πειραματικών) δομικών παραγόντων (F_o) και των δομικών παραγόντων του μοντέλου (F_c). Ο χάρτης αυτός ($F_o - F_c$) αναπαριστά τις διαφορές μεταξύ της πραγματικής δομής και του μοντέλου. Σε αυτό τον χάρτη τα τμήματα τα οποία υπάρχουν στην δομή αλλά δεν συμπεριλαμβάνονται στο μοντέλο παρουσιάζονται με θετική πυκνότητα, ενώ τα τμήματα τα οποία απουσιάζουν από την δομή και εμφανίζονται στο μοντέλο παρουσιάζονται με αρνητική ηλεκτρονιακή πυκνότητα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.14. Δεν αντιστοιχούν όλες οι κορυφές (θετικές ή αρνητικές) του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε διαφορές μεταξύ του μοντέλου και της πραγματικής πρωτεϊνικής δομής. Μιας και οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας προέρχονται από πειραματικά δεδομένα είναι αρκετά πιθανό να περιέχουν και θόρυβο, ο οποίος οφείλεται σε σφάλματα κατά την μέτρηση. Είναι λοιπόν φρόνιμο να ελέγχουμε κάθε φορά αν μια κορυφή στο χάρτη διαφοράς υποστηρίζεται και από κορυφή στο χάρτη διπλής διαφοράς ($2F_o - F_c$). Σε γενικές γραμμές η ποιότητα ενός χάρτη ηλε-

κτρονιακής πυκνότητας και οι πληροφορίες οι οποίες μπορούν να είναι ορατές από αυτόν εξαρτώνται από την ευκρίνεια των δεδομένων περίθλασης (Wlodawer et al. 2008).



Εικόνα 4.14: Χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας όπου αριστερά παρουσιάζεται θετική ηλεκτρονιακή πυκνότητα (πράσινο πλέγμα) όπου υποδηλώνει την ύπαρξη ενός προσδέτη στη δομή, ο οποίος απουσιάζει από τη δομή του μοντέλου, ενώ δεξιά παρουσιάζεται αρνητική ηλεκτρονιακή πυκνότητα (κόκκινο πλέγμα) όπου η υποδηλώνεται η λανθασμένη διαμόρφωση της πλευρικής αλυσίδα της Arg του μοντέλου. Η πραγματική θέση της πλευρικής αλυσίδα στη δομή υπαγορεύεται από τη θετική ηλεκτρονιακή πυκνότητα (πράσινο πλέγμα).

4.8 Αξιολόγηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η κρυσταλλογραφία βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη σκέδαση της ακτινοβολίας X από τα ηλεκτρόνια των μορίων. Επειδή τα παρόμοια δομικά μοτίβα τα οποία σχηματίζουν τις στοιχειώδεις κυψελίδες επαναλαμβάνονται με μεγάλη περιοδικότητα στο σύνολο του όγκου του κρυστάλλου η σκέδαση της ακτινοβολίας ενισχύεται μόνο προς ορισμένες κατευθύνσεις. Το σχήμα, το μέγεθος και η συμμετρία της στοιχειώδους κυψελί-

δας καθορίζουν την κατεύθυνση της περιθλώμενης ακτινοβολίας ενώ η θέση όλων των ατόμων της κυψελίδας καθορίζει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η στοιχειώδης κυψε-

λίδα τόσο περισσότερες περιθλάσεις μπορούν να παρατηρηθούν. Επιπλέον, η θέση του κάθε ατόμου στην κρυσταλλική δομή επηρεάζει τις εντάσεις όλων των περιθλάσεων και, αντιστρόφως, η ένταση κάθε περιθλάσης εξαρτάται από τις θέσεις όλων των ατόμων στη στοιχειώδη κυψελίδα. Ένα πείραμα περίθλασης ακτίνων X περιλαμβάνει τη μέτρηση της έντασης ενός μεγάλου αριθμού περιθλάσεων. Επειδή η κρυσταλλική δομή έχει συγκεκριμένη συμμετρία, κάποιες περιθλάσεις αναμένεται να είναι ίδιες και να έχουν την ίδια ένταση. Ο αριθμός των με-

τρήσεων για κάθε ξεχωριστή, συμμετρικά μοναδική περίθλαση ονομάζεται πολλαπλότητα (redundancy ή multiplicity). Επειδή κάθε περίθλαση μετράται με ένα βαθμό σφάλματος όσο μεγαλύτερη είναι η πολλαπλότητα τόσο μεγαλύτερη είναι η τελική εκτίμηση για την ένταση κάθε περίθλασης. Η συμφωνία μεταξύ συμμετρικά ισοδύναμων περιθλάσεων οι οποίες συμβάλλουν στην δημιουργία μιας μοναδικής περίθλασης μπορεί να ελεγχθεί με τον παράγοντα R_{merge} που θα αναφερθεί παρακάτω.

Η ποιότητα των κρυσταλλικών δομών είναι άμεσα εξαρτώμενη από την ποιότητα των δεδομένων περίθλασης που συλλέχθηκαν για τον προσδιορισμό τους. Οι πιο σημαντικοί παράμετροι από τους οποίους κρίνεται η ποιότητα των δεδομένων είναι η ευκρίνεια, η πληρότητα των δεδομένων, ο παράγοντας $I/\sigma(I)$ (ή λόγος σήμα/θόρυβος) και ο παράγοντας R_{merge} (Wlodawer et al. 2008).

Ευκρίνεια δεδομένων (Resolution) Ένας σημαντικός παράγοντας για την αξιολόγηση μιας κρυσταλλικής δομής είναι η ευκρίνεια των δεδομένων περίθλασης. Η ευκρίνεια μπορεί να οριστεί ως η μικρότερη απόσταση d που χρησιμοποιείται στη σύνθεση Fourier και αντιπροσωπεύει την απόσταση ανάμεσα σε δυο παράλληλα επίπεδα του κρυστάλλου (επίπεδα Bragg). Αυτός ο

όρος καθορίζει το επίπεδο λεπτομέρειας, ή τη μικρότερη απόσταση μεταξύ δομικών χαρακτηριστικών τα οποία μπορούν να διακριθούν σε ένα χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Όσο υψηλότερη είναι η ευκρίνεια, και συνεπώς όσο μικρότερη η απόσταση d , μπορούν να διακριθούν περισσότερες λεπτομέρειες στην κρυσταλλική δομή καθώς υπάρχουν περισσότερες μοναδικές περιθλάσεις οι οποίες καθορίζουν την κρυσταλλική δομή. Όταν η ευκρίνεια των δεδομένων είναι υψηλή (μικρότερη η απόσταση d) απαιτείται να μετρηθεί ένας μεγάλος αριθμός περιθλάσεων, οποίος μπορεί να υπολογισθεί κατά προσέγγιση από τη σχέση: αριθμός περιθλάσεων = $\frac{5V}{d^3}$

όπου V είναι ο όγκος της στοιχειώδους κυψελίδας και d η ευκρίνεια (Brunger et al. 1998).

Οι όροι χαμηλή, μεσαία, υψηλή και ατομική ευκρίνεια χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν το επίπεδο λεπτομέρειας που διακρίνεται στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Οι πληροφορίες οι οποίες μπορούν να γίνουν διακριτές σε χαμηλή ευκρίνεια είναι λίγες και θεωρείται ότι ευκρίνεια $>5 \text{ \AA}$ είναι αρκετή έτσι ώστε να παρέχει μόνο πληροφορίες σχετικές με το σχήμα του μακρομορίου ειδικά αν στη δομή περιέχονται αρκετές έλικες. Η μεσαία ευκρίνεια

ξεκινάει περίπου από 2,7 Å όπου μπορούν να διακριθούν μόρια ύδατος καθώς το μήκος των δεσμών υδρογόνων τους έχει αυτή την απόσταση. Η υψηλή ευκρίνεια αντιστοιχεί σε απόσταση >2 Å καθώς απόσταση 1,5 Å αντιστοιχεί στο μήκος ενός τυπικού C-C ομοιοπολικού δεσμού στα μακρομόρια. Τέλος ατομική ευκρίνεια επιτυγχάνεται σε 1,2 Å καθώς το μήκος αυτό αντιστοιχεί στη μικρότερη διατομική απόσταση που δεν περιλαμβάνει υδρογόνο (C=O). Άτομα υδρογόνων μπορούν να διακριθούν σε ένα χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας με ευκρίνεια υψηλότερη από 1 Å καθώς ένας ομοιοπολικός δεσμός υδρογόνου έχει μήκος περίπου 0,9-1 Å (Morris and Brice 2003). Η μέγιστη ευκρίνεια καθορίζεται τόσο από την ποιότητα του κρυστάλλου όσο και τα χαρακτηριστικά της πηγής των ακτίνων X.

Παράγοντας $I/\sigma(I)$ Ο παράγοντας αυτός αποτελεί άλλο ένα κριτήριο της ποιότητας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Ο παράγοντας αυτός είναι ο λόγος της έντασης της περίθλασης προς το ποσοστό λάθους με το οποίο μετρήθηκε η ένταση και αποτελεί κριτήριο της ευκρίνειας των δεδομένων. Αν ο λόγος αυτός είναι <2 τότε η ευκρίνεια στην οποία συλλέχτηκαν τα δεδομένα δεν είναι η σωστή καθώς μπορεί να περιέχει πολλά σφάλματα. Αν ο λόγος αυτός είναι

πολύ υψηλότερος από 2 στην απώτερη στοιβάδα ευκρίνειας τότε υποδεικνύει ότι η ευκρίνεια των δεδομένων θα μπορούσε να είναι υψηλότερη (ο κρύσταλλος έχει τη δυνατότητα καλύτερης περίθλασης) αλλά περιορίζεται από την πηγή ακτίνων X (Wlodawer et al. 2008). Το όριο περίθλασης του κρυστάλλου συνήθως ορίζεται στην ευκρίνεια εκείνη όπου ο παράγοντας $I/\sigma(I)$ μειώνεται στην τιμή 2.

Παράγοντας R_{merge} Κατά τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων, οι περισσότερες περιθλάσεις (μαζί με τις ισοδύναμες-συμμετρικές) μετρώνται πολλές φορές και οι εντάσεις των περιθλάσεων αυτών πρέπει να ισοζυγιστούν έτσι ώστε να έχουν όλες την ίδια ένταση και να συγχωνευτούν μετά την εφαρμογή όλων των απαραίτητων διορθώσεων. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται scaling και merging και το αποτέλεσμα της είναι ένα σύνολο μοναδικών περιθλάσεων και εντάσεων μαζί με το ποσοστό σφάλματος της κάθε έντασης. Πολλαπλές παρατηρήσεις της ίδιας περίθλασης παρέχουν τη δυνατότητα του εντοπισμού και ενδεχόμενης απόρριψης ακραίων τιμών, ωστόσο ο αριθμός των περιθλάσεων που θα πρέπει να απορριφθούν θα πρέπει να είναι πολύ μικρός (περίπου 1% τις περισσότερες φορές).

Η ακρίβεια των εντάσεων μπορεί να εκτιμηθεί από τη συμφωνία των μετρήσεων των συμμετρικά ισοδύναμων περιθλάσεων με τον παράγοντα R_{merge} , ο οποίος δίνεται από τη σχέση:

$$R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_i (| \langle I_h \rangle |) I_{h,i} / \sum_h \sum_i I_{h,i}$$

Όπου h είναι ο αριθμός των μοναδικών περιθλάσεων, και i ο αριθμός των συμμετρικών ισοδύναμων περιθλάσεων.

Ένα σύνολο δεδομένων περίθλασης πρέπει να χαρακτηρίζεται από μια τιμή $R_{\text{merge}} < 4-5\%$ αν και πολλές φορές η τιμή αυτή μπορεί να είναι πολύ μικρότερη. Στην απώτερη στοιβάδα ευκρίνειας η τιμή μπορεί να είναι 30-40% σε χαμηλής συμμετρίας κρυστάλλους ενώ μέχρι και 60% σε περιπτώσεις υψηλής συμμετρίας κρυστάλλων καθώς η πολλαπλότητα είναι συνήθως υψηλή.

Η πολλαπλότητα στις μετρήσεις είναι επιθυμητή καθώς βελτιώνει την ποιότητα των δεδομένων τόσο ως προς τις εντάσεις των περιθλάσεων όσο και ως προς το ποσοστό σφάλματος. Πολλές φορές παρόλα αυτά είναι δύσκολο να επιτευχτεί υψηλή πολλαπλότητα στα δεδομένα εξαιτίας της ισχυρής ακτινοβολίας (συγχροτρονικές πηγές ακτινοβολίας) η οποία καταστρέφει τον κρύσταλλο (Wlodawer et al. 2008).

Πληρότητα δεδομένων (completeness ή redundancy) Εάν ένα πείραμα συλλογής κρυσταλλογραφικών δεδομένων δεν διεξαχθεί σωστά, ή αν ο κρύσταλλος καταστραφεί λόγω ακτινοβολίας πριν το τέλος της πειραματικής διαδικασίας, τότε κάποιες περιθλάσεις πιθανό να μην μετρηθούν και τα δεδομένα δεν θα έχουν 100% πληρότητα. Επειδή ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας είναι αποτέλεσμα συμβολής όλων των περιθλάσεων η πληρότητα των δεδομένων επηρεάζει την ποιότητα και τις πληροφορίες που είναι ορατές σε αυτόν. Η πληρότητα των δεδομένων, η οποία θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερη, εκφράζει τη μέτρηση όλων των θεωρητικά πιθανών μοναδικών περιθλάσεων σε συγκεκριμένη ευκρίνεια, αποτελώντας επίσης έναν σημαντικό παράγοντα αξιολόγησης της ποιότητας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων (Wlodawer et al. 2008).

4.9 Βελτιστοποίηση του πρωτεϊνικού μοντέλου

Μετά την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων η δομή η οποία έχει προκύψει περιέχει αρκετά σφάλματα. Το αρχικό μοντέλο που προκύπτει είναι οι συντεταγμένες x,y,z για κάθε άτομο του μορίου. Τα σφάλματα αυτά οφείλονται στις δομικές διαφορές ανάμεσα στο υπό μελέτη

μόριο και στο μόριο μοντέλο αλλά και στα πειραματικά σφάλματα του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ωστόσο μπορεί να βελτιωθεί μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται βελτιστοποίηση (refinement), σύμφωνα με την οποία το αρχικό μοντέλο μεταβάλλεται συστηματικά ούτως ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη συμφωνία του με τα πειραματικά δεδομένα.

Η βελτιστοποίηση αυτή γίνεται αρχικά μόνο με την αλλαγή της θέσης και του προσανατολισμού του μορίου (rigid body refinement) ενώ ακολουθεί βελτιστοποίηση των συντεταγμένων x,y,z των ατόμων του μορίου, αλλά και των παραγόντων θερμικής κίνησης του κάθε ατόμου (B factor). Εδώ να αναφερθεί ότι θερμικός παράγοντας (B, temperature factor ή παράγοντας Debye-Waller) αποτελεί μέτρο της ταλάντωσης των ατόμων και επηρεάζει το μέγεθος του νέφους ηλεκτρονιακής πυκνότητας γύρω από κάθε πυρήνα ατόμου λόγω της επίδρασης του στον ατομικό παράγοντα σκέδασης. Ο θερμικός παράγοντας B ορίζεται ως:

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

όπου u^2 αντιστοιχεί στο τετράγωνο της μέσης τιμής του εύρους ταλάντωσης, όταν υποθέσουμε ότι έχουμε ισότροπη και αρμονική δόνηση ατόμων.

Ακολουθεί τροποποίηση στη θέση αρκετών πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων

του ενζυμικού μοντέλου σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, διεδρες γωνίες, κ.ά.) και η προσθήκη μορίων ύδατος στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας (F_o-F_c και $2F_o-F_c$), όπου F_o και F_c είναι ο παρατηρούμενος και υπολογιζόμενος από το μοντέλο δομικός παράγοντας αντίστοιχα.

Η πολυπλοκότητα όμως των πρωτεϊνικών μορίων, και η περιορισμένη ευκρίνεια των κρυσταλλογραφικών δεδομένων καθιστούν απαραίτητη την ύπαρξη ορισμένων περιορισμών προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι υπολογισμοί για τις χιλιάδες παράμετρους που εμπλέκονται στη διαδικασία της βελτιστοποίησης. Οι περιορισμοί αυτοί αφορούν στις χημικές δομές των πρωτεϊνικών μορίων (μήκη και γωνίες δεσμών) και είναι διαθέσιμοι στη βιβλιογραφία. Αυτοί προκύπτουν από υψηλής ευκρίνειας κρυσταλλογραφικά δεδομένα αμινοξέων και πεπτιδίων αλλά και από φασματοσκοπικές και θεωρητικές μελέτες (Lattman and Loll 2008).

4.10 Έλεγχος της αξιοπιστίας του πρωτεϊνικού 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 (πεπτιδικό δεσμοί, δίεδρες γωνίες πλευρικών ομάδων και στερεοχημική παρεμπόδιση).

Δείκτης αξιοπιστίας R Ο κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας R αποτελεί ένα κριτήριο αξιολόγησης του πρωτεϊνικού μοντέλου που προκύπτει από την βελτιστοποίηση. Ο δείκτης αξιοπιστίας R εκφράζει τη συμφωνία ανάμεσα στα πλάτη των περιθλάσεων του παράγοντα δομής που παρατηρούνται πειραματικά $|F_{\text{obs}}|$ του και αυτών που υπολογίζονται από το προτεινόμενο μοντέλο $|F_{\text{calc}}|$ και καθορίζεται από τη σχέση : $\Sigma|F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \Sigma F_{\text{obs}}$ και συνδυάζει τα σφάλματα που προκύπτουν από την πειραματική διαδικασία και την απόκλιση του μοντέλου από την πραγματική

δομή. Ο δείκτης αξιοπιστίας R σε μια καλά προσδιορισμένη δομή θα πρέπει να λαμβάνει τιμές $<20\%$. Όταν η τιμή του ξεπερνάει το 30% τότε η δομή θα πρέπει να ελεγχθεί καθώς κάποια τμήματα του μοντέλου πιθανόν να είναι λανθασμένα (Wlodawer et al. 2008).

Δείκτης αξιοπιστίας R_{free} Ένας σημαντικός παράγοντας που εισήλθε στην κρυσταλλογραφία το 1992 είναι ο παράγοντας R_{free} (Brunger 1992). Ο R_{free} υπολογίζεται όπως και ο δείκτης αξιοπιστίας R αλλά για ένα μόνο μικρό σύνολο τυχαία επιλεγμένων περιθλάσεων. Το μικρό αυτό τμήμα (5-10%) των περιθλάσεων διαχωρίζεται από την αρχική επεξεργασία και τον μετασχηματισμό Fourier (Kleywegt 2007). Καθώς η διαδικασία της βελτιστοποίησης προχωρά, ο δείκτης αξιοπιστίας R , που αντιστοιχεί στο 90-95% των δεδομένων, μειώνεται, αλλά στη περίπτωση που το μοντέλο πραγματικά βελτιώνεται θα πρέπει ταυτόχρονα να μειώνεται και ο δείκτης R_{free} . Η τιμή του R_{free} θα πρέπει να είναι μικρότερη του 28% και ιδανικά κάτω από το 25% , ενώ η τιμή του R κάτω από 25% . Η διαφορά $R - R_{\text{free}}$ θα πρέπει να είναι μικρότερη από 0,1. Εάν η τιμή του R_{free} είναι ιδιαίτερα υψηλή και υπερβαίνει την τιμή του $R >7\%$ αυτό υποδεικνύει σοβαρά δομικά

λάθη στο μοντέλο ή υπερβελτιστοποίηση των πειραματικών δεδομένων.

Ο R_{free} είναι πιο ευαίσθητος από τον R στην ανίχνευση δομικών λαθών του προτεινόμενου μοντέλου και η παρακολούθηση του κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης είναι πολύ χρήσιμη στην επίλυση νέων δομών. Κατά τη διάρκεια των ενδιάμεσων σταδίων της βελτιστοποίησης οι τιμές του δείκτη R_{free} είναι υψηλότερες από του R , στα τελικά όμως στάδια οι δύο δείκτες αξιοπιστίας λαμβάνουν παραπλήσιες τιμές. Ο δείκτης R_{free} χρησιμοποιείται για την κατάλληλη επιλογή του δομικού μοντέλου, καθώς και του κατάλληλου πρωτοκόλλου βελτιστοποίησης, την ακριβέστερη εκτίμηση των σφαλμάτων των φάσεων και των συντεταγμένων και την αποφυγή υπερβελτιστοποίησης (Brunger 1992, Rhodes 1999).

RMSD (Root-mean-square deviations)

Για να είναι ένα μοντέλο αποδεκτό, θα πρέπει τα μήκη και οι γωνίες των δεσμών του, να είναι παραπλήσιες με τις τιμές που έχουν τα απλά οργανικά μόρια. Ένα κριτήριο που υποδεικνύει αν το μοντέλο αποκλίνει από τις γεωμετρικές παραμέτρους των μορίων είναι το $rmsd$ (τετραγωνική ρίζα της μέσης τιμής απόκλισης). Οι γεωμετρικές παράμετροι των μορίων χρησιμοποιούνται ως περιορισμοί κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης της κρυσταλλικής δομής.

Η τιμή της $rmsd$ υπολογίζεται κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης και πρέπει να είναι μικρότερη από 0.02 Å και 4° για τα μήκη δεσμών και τις γωνίες αντίστοιχα έτσι ώστε το πρωτεϊνικό μοντέλο να είναι αποδεκτό (Rhodes 1999).

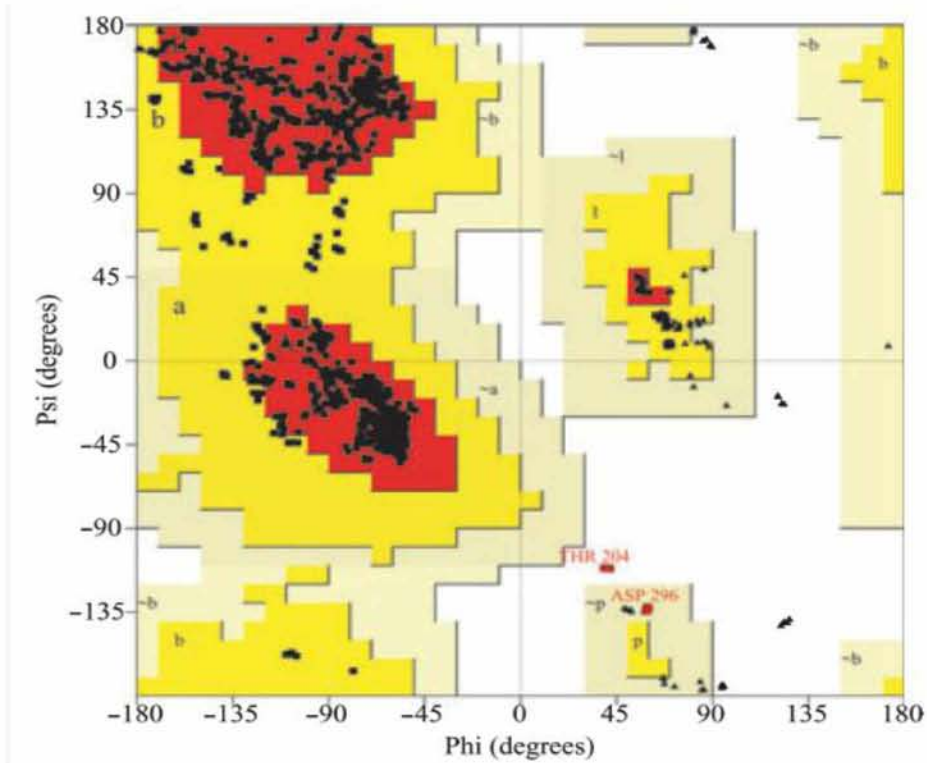
Πεπτιδικοί δεσμοί Οι πεπτιδικοί δεσμοί πρέπει να είναι σχεδόν επίπεδοι.

Διάγραμμα Ramachandran -Γωνίες διαμόρφωσης

Οι αποκλίσεις στις στερεοχημικές παραμέτρους που μπορεί να εμφανιστούν κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης υποδεικνύουν πιθανά λάθη στη δομή των μορίων όμως δεν παρέχουν την πληροφορία για την πηγή του πιθανού προβλήματος. Ένα χρήσιμο εργαλείο για τον εντοπισμό λαθών στη στερεοχημεία των μορίων είναι το διάγραμμα Ramachandran, στο οποίο οι διεδρες γωνίες ϕ και ψ για κάθε αμινοξικό κατάλοιπο καταχωρούνται σε διάγραμμα όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.15. 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 επιτρεπές, διαφορετικά το μοντέλο πρέπει να

επανεξεταστεί για τα κατάλοιπα που παρουσιάζουν λάθος στερεοχημεία (Rhodes 1999).



Εικόνα 4.15: Διάγραμμα Ramachandran στο οποίο παρουσιάζονται δυο αμινοξέα τα οποία βρίσκονται εκτός των επιτρεπόμενων περιοχών (Wlodawer et al. 2008)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου κατέχει βασικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια ως ένας από τους πιο σημαντικούς στόχους για την ανακάλυψη νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων, τόσο συνθετικών όσο και φυσικών (Schrödinger , Oikonomakos 2002, Hayes and Leonidas 2010, Somsak 2011). Βιολογικές μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα τέτοιων αναστολέων στην μείωση της γλυκογονόλυσης και τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα (Martin et al. 1998, Treadway et al. 2001, Kurukulasuriya et al. 2003, Kurukulasuriya et al. 2003, Agius 2010).

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που ακολουθούνται σήμερα για την ασθένεια του διαβήτη II είναι ανεπαρκείς ενώ σε αρκετές περιπτώσεις εμφανίζουν και σοβαρές παρενέργειες. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η ανάγκη νέων θεραπειών για τον αποτελεσματικό έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης χωρίς τον κίνδυνο υπογλυκαιμίας για τους ασθενείς με διαβήτη τύπου II (Jones 2012). Η έρευνα αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση στον αριθμό των πατεντών που κατατίθενται από φαρμακευτικές και βιοτεχνολογικές εταιρίες που στοχεύουν την GP για την ανακάλυψη νέων αντιδιαβητικών φαρ-

μάκων τα τελευταία χρόνια (Carpino and Goodwin 2010)

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί βιοχημικές και δομικές μελέτες για περισσότερους από 250 αναστολείς της GP που προσδένονται στα διάφορα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου, ωστόσο το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται στο επίκεντρο ερευνών καθώς οι πλειονότητα αυτών των μελετών αναφέρεται σε αναστολείς που προσδέονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και είναι ανάλογα γλυκόζης (Somsak et al. 2008, Praly and Vidal 2010, Tsirkone et al. 2010, Somsak 2011, Kantsadi et al. 2012).

Το καταλυτικό κέντρο της GP είναι μια εσοχή η οποία βρίσκεται "θαμμένη" στο κέντρο του μονομερούς περίπου 15 Å από την επιφάνεια, όπου οι επικράτειες 1 (αμινοξέα 1-484) και 2 (αμινοξέα 485-842) πλησιάζουν σχηματίζοντας την περιοχή αυτή. Η α-D-γλυκόζη είναι ο φυσιολογικός αναστολέας του ενζύμου με ασθενή ανασταλτική δράση καθώς η σταθερά αναστολής (K_i) είναι 1,7-3,2 mM (Martin et al. 1991) για την GPb και 4,9 mM για την GPa (Papageorgiou et al. 1989). Παρόλα αυτά ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός αναστολέων έχει επικεντρωθεί σε ανάλογα γλυκόζης καθώς η γλυκόζη κατέχει ρυθμι-

στικό ρόλο τόσο για την φωσφορυλάση του γλυκογόνου (αναστολή), όσο και για την συνθάση του γλυκογόνου (ενεργοποίηση) και συνεπώς έχει ισχυρή επίδραση στην αναστολή της γλυκογονόλυσης. Επιπλέον το σύμπλοκο GP_a- γλυκόζη είναι καλύτερο υπόστρωμα για απενεργοποίηση μέσω αποφωσφορυλίωσης από την PP1 από ότι η ελεύθερη GP_a (Oikonomakos 2002). Έχει προταθεί λοιπόν ότι, ανάλογα γλυκόζης τα οποία έχουν ισχυρότερη ανασταλτική δράση από ότι η γλυκόζη μπορεί να έχουν αποτελεσματική ρυθμιστική δράση στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης και αποτελούν μια υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση του σακχαρώδους διαβήτη. Για το λόγο αυτό οι αναστολείς σχεδιάζονται με βάση τη δομή του συμπλόκου της GP_b (διαμόρφωση T) με την α-D-γλυκόζη. (Martin et al. 1991). Οι αναστολείς θα πρέπει να μιμούνται τη γλυκόζη στον τρόπο σύνδεσης της στο καταλυτικό κέντρο, σχηματίζοντας αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξικά κατάλοιπα του ενζύμου οι οποίες σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s προάγοντας έτσι την διαμόρφωση T του ενζύμου.

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε μία συστηματική κινητική και κρυσταλλογραφική μελέτη της σύνδεσης αναστολέων, που έχουν συντεθεί μετά από κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό, στο

καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ο απώτερος στόχος της μελέτης ήταν η ανακάλυψη αναστολέων με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και μεγάλη συγγένεια για την ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η βιοδραστικότητα και η σύνδεση 28 αναστολέων, παραγώγων της γλυκόζης, στη διαμόρφωση T της μυϊκής GP_b κονίκλων. Τα συνθετικά παράγωγα είναι χημικώς παρόμοια. Όλα έχουν τον πυρανοζιτικό δακτύλιο της γλυκόζης, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους στον υποκατάστατη της β-θέσης του ατόμου C1 της γλυκόζης. Εκτιμώντας πως η αύξηση της συμπληρωματικότητας των χημικών δομών μεταξύ της πρωτεΐνης και του αναστολέα θα οδηγήσει σε αύξηση της ανασταλτικής τους δράσης, διεξήχθη προσπάθεια προς αυτή την κατεύθυνση. Έτσι με στόχο τη μεγιστοποίηση του αριθμού των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αναστολέα και φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, οι υποκαταστάτες στη θέση αυτή διέφεραν στο μήκος και στο μέγεθος ώστε να συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα μιας περιοχής του καταλυτικού κέντρου (β-εσοχή). Η διαφοροποίηση αυτή, αφενός βοήθησε στην χαρτογράφηση των αλληλεπιδράσεων του καταλυτικού κέντρου και αφετέρου οδήγησε στην ανακάλυψη νέων ισχυρών αναστολέων

(K_i της τάξης του nM για το ηπατικό ένζυμο).

Με κινητικά πειράματα μελετήθηκε η επίδραση των παραγώγων γλυκόζης στη δραστηριότητα του ενζύμου και προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι και οι σταθερές αναστολής (K_i). Οι κινητικές ιδιότητες των αναλόγων συσχετίστηκαν με κρυσταλλογραφικά πειράματα για τη δομική εξήγηση της αναστολής τους αλλά και για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων με κατάλοιπα της β-εσοχής και του βρόχου 280s οι οποίες είναι σημαντικές στην αναγνώριση και την πρόσδεση των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο.

Η πρώτη ομάδα αναστολέων που μελετήθηκε ήταν γλυκοκυρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης που έφεραν στη θέση C5 της ουρακίλης αλογόνα. Οι κινητικές μελέτες στη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές αποτελούν ισχυρούς αναστολείς του ενζύμου ενώ το παράγωγο με χλώριο (GlcCIU) αποτελεί έναν από τους πλέον βιοδραστικούς αναστολείς του καταλυτικού κέντρου που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες ανέδειξαν τις αλληλεπιδράσεις που είναι σημαντικές για την πρόσδεση των αναστολέων αυτών στο καταλυτικό κέντρο αλλά και τη σημασία των αλογόνων στη βιοδραστικότητα.

Στην επόμενη ομάδα αναστολέων, μελετήθηκαν ομάδες αλκυνίων διαφορετικού μήκους και μεγέθους στη θέση C5 της ουρακίλης. Σκοπός ήταν οι ομάδες αυτές να συνδεθούν στην περιοχή της β-εσοχής, υποδεικνύοντας τις αλληλεπιδράσεις που συμβάλλουν στην αύξηση της ανασταλτικής δράσης. Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες ανέδειξαν τον σημαντικό ρόλο των αλληλεπιδράσεων van der Waals για την πρόσδεση των αναστολέων αλλά και τη σημασία της μετατόπισης του βρόχου 280s στην βιοδραστικότητα των αναστολέων.

Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν αποκαλύψει πως ένα σημαντικό στοιχείο είναι η ομάδα που συνδέει το τμήμα της γλυκοκυρανόζης με έναν υποκαταστάτη στη θέση C1. Στην επόμενη ομάδα αναστολέων μελετήθηκε ο συνδέτης $-NHCO-$ χρησιμοποιώντας ως υποκαταστάτες υδρόφοβες ομάδες διαφορετικού μήκους και μεγέθους. Στη συνέχεια οι πιο βιοδραστικοί αναστολείς αυτής της ομάδας χρησιμοποιήθηκαν ως ικρίωμα για την σύνθεση νέων αναστολέων στους οποίους η ομάδα του συνδέτη $-NHCO-$ αντικαταστάθηκε από μια ακόμη μεγαλύτερη ομάδα, την $-NHCONHCO-$. Τα αποτελέσματα των κινητικών και κρυσταλλογραφικών μελετών των αναστολέων έδειξαν ότι η σύνδεση στη β-εσοχή εξαρτάται άμεσα από το συνδέτη. Ακόμα αποκάλυψαν πως οι

C1-υποκαταστές συνδέονται στη β-εσοχή και συμμετέχουν σε ένα σημαντικό αριθμό αλληλεπιδράσεων van der Waals και δεσμών υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με πρωτεϊνικά κατάλοιπα οδηγώντας σε αύξηση της βιοδραστικότητας των αναστολέων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές δεν είχαν παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες αναστολέων που συνδέονταν στη β-εσοχή.

Η τελευταία ομάδα αναστολέων που μελετήθηκε αποτελείται από ενώσεις που φέρουν ως συνδέτη στη θέση C1 της γλυκοπυρανόζης ετεροκυκλικούς δακτύλιους. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η δραστηριότητα αναστολέων που έφεραν ιμιδαζολικό και 1,2,4 τριαζολικό δακτύλιο στη β-θέση του ατόμου C1 της γλυκοπυρανόζης, και υποκαταστάτες διαφορετικού μήκους και μεγέθους. Κινητικές μελέτες στη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου έδειξαν ότι αυτές οι ενώσεις αποτελούν ισχυρούς αναστολείς του ενζύμου με σταθερά αναστολής (K_i) της τάξης nM. Επιπροσθέτως, υπέδειξαν πως ο ιμιδαζολικός δακτύλιος είναι καλύτερος από τον τριαζολικό. Στην ομάδα αυτή ανακαλύφθηκε ο πλέον ισχυρός ($K_i = 26$ nM) αναστολέας που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα για το καταλυτικό κέντρο. Ο μεγάλος αριθμός αλληλεπιδράσεων με αμινοξικά κατάλοιπα της β-εσοχής και του βρόχου 280s, οι οποίες σταθεροποιούν την ανενεργή διαμόρφωση T του ενζύμου, σε συνδυασμό με την απουσία δια-

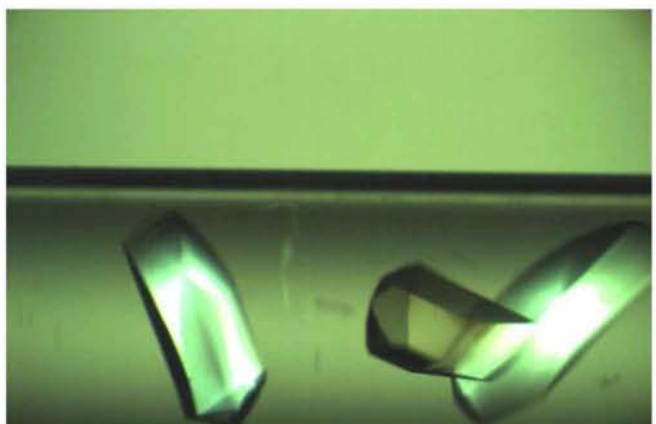
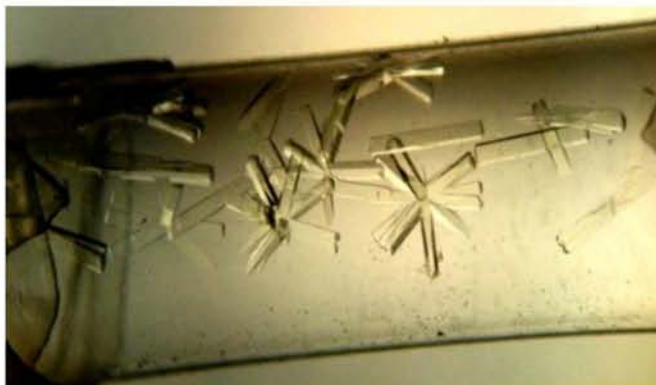
τάραξης της αρχιτεκτονικής του καταλυτικού κέντρου κατά τη σύνδεση των αναστολέων, συμβάλλουν στην ισχυρή ανασταλτική δραστηριότητα των ενώσεων αυτών.

Μέρος των μελετών πραγματοποιήθηκε στη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από κονίκλους λόγω της υψηλής απόδοσης κατά την απομόνωση της και της δυνατότητας παραγωγής καλής ποιότητας κρυστάλλων. Η ανθρώπινη ηπατική GP (h1GPa) είναι 80% ομόλογη με την μυϊκή GP κονίκλων (mGPb), όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων είναι 100% στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου τόσο στην αμινοξική αλληλουχία όσο και στην αρχιτεκτονική. Ωστόσο η ηπατική παρά η μυϊκή ισομορφή είναι ο μοριακός στόχος για το σχεδιασμό φαρμάκων. Έτσι για την τελευταία ομάδα αναστολέων (που περιελάμβανε και τον πλέον ισχυρό αναστολέα από αυτούς που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής) πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες έναντι της h1GPa. Οι μελέτες αυτές είχαν σκοπό να αναδείξουν την ισχυρή ανασταλτική δράση των ενώσεων αυτών στον πραγματικό φαρμακευτικό στόχο, αλλά και να επαληθεύσουν πειραματικά (για πρώτη φορά) την ασφαλή χρήση πειραματικών δεδομένων από την mGPb κονίκλων για το σχεδιασμό αναστολέων για την h1GPa. Τα αποτελέσματα επαλήθευσαν την ισχυρή α-

νασταλτική ισχύ αυτών των αναστολέων και έναντι της ανθρώπινης ηπατικής GPα ενώ παράλληλα απέδειξαν πως η χρήση της gmGPb ως μοντέλο για την ανακάλυψη νέων

αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου – εν δυνάμει αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων – είναι ορθολογική.

Υλικά και μέθοδοι



Τετραγωνικοί κρύσταλλοι mGPb

ΥΛΙΚΑ

Αντιδραστήρια

a-D-Glucose 1-phosphate dipotassium salt hydrate	SIGMA
Acetic Acid	Merck
Acrylamide	SERVA
Adenosine 5'-monophosphate monohydrate	SIGMA
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	SIGMA
Ammonium Molybdate tetrahydrate	Applichem
Ammonium Persulfate (APS)	SIGMA
Ammonium sulfate	CHEM-LAB
Ampicillin	SERVA
β- Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate	SIGMA
β-Mercaptoethanol	SIGMA
BES	Riedel de Haën
Bis Acrylamide	SERVA
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay	Bio-rad
Bromophenol Blue	Research Organics
Caffeine	SIGMA
Calcium Chloride dehydrate	Merck
Chloramphenicol	SIGMA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Merck
diPotassium Hydrogen Phosphate	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	SERVA
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Panreac
Ethanol Absolute	SIGMA
Glycerol	Panreac
Glycine	Biochemica
Glycogen, from oyster	SERVA
Hepes	SIGMA
Hydrochloric Acid (HCl)	Merck
Imidazole	SIGMA
Inosine 5'-monophosphate disodium salt hydrate	SIGMA
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)	Fermentas
Kanamycin monosulphate	Applichem
L-Ascorbic acid	SIGMA
LB Agar	SIGMA
LB Broth	Merck
L- Glutathione reduced Biochemica	Applichem
Magnesium acetate tetrahydrate	Applichem
Magnesium Chloride Hexahydrate (MgCl ₂ •6H ₂ O)	Panreac
Manganese (II) chloride solution	SIGMA
Methanol	Applichem
Pink prestained protein marker	Nippon Genetics

PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)	Applichem
Potassium bicarbonate minimum 99.5%	SIGMA
Potassium Chloride (KCl)	Merck
Potassium diHydrogen Phosphate	Merck
Protease inhibitor cocktail tablets, EDTA-free	Roche
Pyridoxine	SIGMA
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	SERVA
Sodium acetate	Merck
Sodium Azide	Riedel de Haën
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	Merck
Sodium Carbonate Anhydrous (Na ₂ CO ₃)	Panreac
Sodium Chloride (NaCl)	Applichem
Sodium diHydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Spermine	SIGMA
TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine)	Research Organics
Triethanolamine	SIGMA
Tris Base	Merck
Zinc acetate dehydrate	SIGMA
1-Thioglycerol	SIGMA

Ένζυμα

Benzonase	SIGMA
DNase	Scientific

Βακτηριακά στελέχη

BL21- Gold (DE3)	Agilent Technologies
B834- DE3	Merck
XL1 Blue	Agilent Technologies

Στήλες χρωματογραφίας

HisTrap HP (Ni ²⁺ -Sephacrose)	GE Healthcare
HiTrapBlueHP	GE Healthcare
Protino GST/4B	Macherey-Magel
Resource Q	GE Healthcare

Όργανα

ÄKTA purifier (FPLC system)	GE Healthcare Life Sciences
Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Nichiryo
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης	BioRad

Μετρητής pH
Στερεοσκόπιο
Σύστημα απεικόνισης (FluorChem™E)
Φυγόκεντροι
Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός/UV

Metrohm
Olympus TL2
Protein Simple
Eppendorf Centrifuge 5810R, HermLe Z36HK
UV- 1600PC Spectrophotometer VWR

Το γλυκογόνο (oyster glycogen) καθαρίστηκε από πιθανές προσμίξεις νουκλεοτιδίων σύμφωνα με τη μέθοδο των Helmreich & Cori (Helmreich & Cori, 1964). Τα στάδια καθαρισμού περιλαμβάνουν διαλυτοποίηση με απιονισμένο ύδωρ, κατεργασία με ζώανθρακα, φυγοκέντρωση και επανάληψη της κατεργασίας με ζώανθρακα τουλάχιστον 2 φορές, καταβύθιση με 1.5 όγκο απόλυτης αλκοόλης, διήθηση υπό κενό και λυοφιλίωση στους -20°C για 12-15 ώρες. Το στερεό διαλυτοποιείται στον κατάλληλο όγκο απιονισμένου ύδατος ώστε η τελική συγκέντρωση του γλυκογόνου να είναι 10% (w/v). Φυλάσσεται στους -20°C .

Οι μεμβράνες διαπίδυσης (cutoff 10 kDa) ήταν της εταιρίας Sigma. Πριν τη χρησιμοποίησή τους υπέστησαν κατεργασία με 1% Na_2CO_3 και 10 mM EDTA στους 100°C (30 min) και συνεχείς εκπλύσεις με αποσταγμένο νερό.

Τα φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 4 (cutoff 10 kDa και 30 kDa) και τα φίλτρα διήθησης Minisart (0.45 μm) ήταν της εταιρίας Sartorius.

Τριχοειδείς σωλήνες διαμέτρου 2.0mm για τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων ήταν της εταιρίας WJM-Glas Muller GmbH.

5. Υλικά και Μέθοδοι

A. Παρασκευαστικές μέθοδοι

5.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκονίου b από σκελετικούς μύες κονίκλων

Η απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκονίου b από σκελετικούς μύες κουνελιών βασίστηκε στη μέθοδο των Fischer και Krebs (Fischer and Krebs 1962) χρησιμοποιώντας 2-μερκαπτο-αιθανόλη έναντι L-κυστεΐνης ως αναγωγικό παράγοντα (Melridou and Oikonomakos 1983).

Υλικά:

- Τρεις αρσενικοί κόνικλοι μετρίου μεγέθους του είδους *oryctolagus cuniculus*
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50mM β-φωσφογλυκερόλη, /HCl, 50mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1mM EDTA, 0.5 mM -διθειοθρεϊτόλη)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃)
- Διάλυμα οξικού οξέος CH₃COOH 1N
- Διάλυμα θεικού αμμωνίου κορεσμού 90%, 3.6 M
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris [τρις-(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο]/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0 M (χωρίς ρύθμιση του pH)
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M, (pH 7.0)
- Διάλυμα EDTA 0.1M, (pH 7.0)
- Διάλυμα AMP 0.1 M, pH 7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1.0 M

- Γλυκερόλη
- dH₂O

Βήμα 1^ο: Παραλαβή του μυϊκού ιστού, κατεργασία για την εκχύλιση του ενζύμου

Από τους τρεις κόνικλους αφαιρέθηκαν οι σκελετικοί μυς, οι οποίοι αλέσθηκαν με μηχανή και ζυγίστηκαν. Στη συνέχεια ακολούθησαν τρεις εκχυλίσεις, εν ψυχρώ, με απιονισμένο ύδωρ. Οι δύο πρώτες εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν με όγκο διαλύματος ισάριθμο με το βάρος των μυών ενώ η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Η διήθηση του εκχυλίσματος κάθε φορά έγινε μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν επιτρέπεται να ξεπερνάει τα 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που συλλέχθηκε διηθήθηκε (φιλτραρίστηκε) μέσω υαλοβάμβακα ώστε να απομακρυνθούν οι λιπαρές ουσίες και τα αιωρούμενα σωματίδια.

Βήμα 2^ο: Όξινη καταβύθιση για την κατακρήμνιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

Το pH του διαλύματος που παραλήφθηκε από το βήμα 1 ρυθμίστηκε σε 5.1-5.2 με την προσθήκη διαλύματος CH₃COOH 1.0 N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφέθηκε στη συνέχεια για 5 λεπτά σε πάγο. Σε αυτό το στάδιο η θολερότητα του διαλύματος αυξήθηκε λόγω της κατακρήμνισης πρωτεϊνών που είναι αδιάλυτες σε όξινο pH. Το πρωτεϊνικό ίζημα απο-

μακρύνθηκε με φυγοκέντρηση, σε 5000 g, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο διάλυμα διηθήθηκε μέσω αντλίας κενού τύπου Buchner, εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Έπειτα ακολούθησε ρύθμιση του pH του διηθήματος στο 6.8 με κορεσμένο διάλυμα KHCO_3 και το διήθημα ογκομετρήθηκε.

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίστηκε με θειικό αμμώνιο κορεσμού 41%, ύστερα από την προσθήκη θειικού αμμωνίου κορεσμού 90% με όγκο ίσο προς 0.837 για κάθε λίτρο πρωτεϊνικού διαλύματος και στη συνέχεια το διάλυμα παρέμεινε στους 4 °C για περίπου 16 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών το υπερκείμενο αποχύθηκε με την χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση σε 5000g g για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Το ίζημα που λάβαμε διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τέλος ακολούθησε διαπίδυση στους 4 °C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl 1 mM (pH 7.5), για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Μετά το πέρας της διαπίδυσης το διάλυμα συλλέχθηκε και ακολούθησε διαύγαση με φυγοκέντρηση στις 5500 gg για 30 λεπτά στους 4 °C. Ακολούθησε προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων:

- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M, pH 7.0, όγκου ίσου με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος.
- EDTA 0.1 M, pH 7.0 με όγκο ίσο με 5×10^{-2} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης
- Διάλυμα Tris 2 M για ρύθμιση του pH στο 8.8.

Το μίγμα επώαστηκε στους 37 °C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έπειτα προστέθηκε διάλυμα CH_3COOH 1N για ρύθμιση του pH στο 7.0 και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε σε 15000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο (ενζυμικό διάλυμα) ογκομετρήθηκε.

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση του ενζύμου

Η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1 mL AMP 0.1M (pH 7.0) και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M (pH 7.0) ανά 100 mL πρωτεϊνικού διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης (το AMP και το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφέθηκε στους 0 °C για τουλάχιστον 6 ώρες ώστε να ολοκληρωθεί η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 15500 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στους 30 °C σε όσο το δυνατό λιγότερο όγκο διαλύματος αραίωσης 50:50:1, pH 6.8.

Το διάλυμα υπέστη διαύγαση με φυγοκέντρωση σε 17500 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 25-30° C. Ακολούθησε η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH₃COO)₂Mg, όπως ακριβώς έγινε στο προηγούμενο βήμα. Το μίγμα αφέθηκε ώστε να αναπτυχθούν κρύσταλλοι του ενζύμου στους 0 °C για χρονικό διάστημα 6 ωρών. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης διεξήχθησαν για τουλάχιστον 4 φορές, και η τελευταία ανακρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε χωρίς την προσθήκη AMP και (CH₃COO)Mg.

Βήμα 6°: Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης του γλυκόγόνου b αφού συλλέχθηκαν μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση, διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα 50:50:1 pH 6.8 με επώαση στους 30 °C. Ακολούθησε προσδιορισμός της ενζυμικής συγκέντρωσης με φωτομέτρηση του δείγματος σε μήκος κύματος 280 nm. Τέλος προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

5.2 Προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* με χημική μέθοδο

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην παρατήρηση των Mandel και Higa, ότι τα βακτήρια έπειτα από κατεργασία με ψυχρό διάλυμα CaCl₂ είναι ικανά να προσλάβουν γενετικό υλικό προερχόμενο από διάφορες πηγές. (Mandel and Higa

1970). Τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα, είναι κύτταρα των οποίων τα κυτταρικά τοιχώματα έχουν μεταβληθεί, έτσι ώστε ξένο DNA να μπορεί να τα εισέλθει εντός του κυττάρου. Η πιο κοινή μέθοδος για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων, με διαπερατά κυτταρικά τοιχώματα είναι η χημική μέθοδος, η οποία περιλαμβάνει κατεργασία με δισθενή ή πολυσθενή κατιόντα (ασβεστίου, μαγνησίου, μαγγανίου, ρουβιδίου κ.α).

Η μεταβολή στη διαπερατότητα των μεμβρανών επιτρέπει στο DNA να διαπεράσει το κυτταρικό περίβλημα των κυττάρων *E.coli*, το οποίο αποτελείται από μια εξωτερική μεμβράνη, μια εσωτερική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα. Η εξωτερική μεμβράνη αποτελείται από φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες. Σύντηξη της εξωτερικής μεμβράνης με την εσωτερική έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία καναλιών, τα οποία επιτρέπουν τη μεταφορά των μορίων DNA διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (Bayer 1968).

Τα αρνητικά φορτία του DNA, ωστόσο απωθούνται από τα φορτισμένα μακρομόρια της εξωτερικής μεμβράνης. Η χημική μέθοδος μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων στηρίζεται στην απόδοση θετικού φορτίου στο τοίχωμα τους μετά από έκθεση τους σε CaCl₂, έτσι ώστε να εξουδετερώνονται οι μη επιθυμητές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ομάδων DNA και των μακρομο-

ρίων της εξωτερικής μεμβράνης και να διευκολύνεται με αυτό το τρόπο η είσοδος του στο βακτηριακό κύτταρο. Τα μετασηματισμένα κύτταρα απομονώνονται σε θρεπτικό υλικό επιλογής (με το κατάλληλο αντιβιοτικό). Η ικανότητα μετασηματισμού με τη μέθοδο αυτή είναι περίπου $0,5-2,0 \times 10^7$ βακτήρια/μg υπερελικωμένου DNA.

Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό 2YT
- Αντιβιοτικό ανθεκτικότητας βακτηριακών κυττάρων
- Διάλυμα CaCl_2 100 mM
- Γλυκερόλη 50% v/v
- Τρυβλία Petri

Πορεία:

1. Από τρυβλίο που έχουν αναπτυχθεί αποικίες δεκτικών κυττάρων *E.coli* γίνεται ενοφθαλμισμός μιας αποικίας σε αποστειρωμένο σωλήνα των 50 mL, στον οποίο έχουν τοποθετηθεί 5 mL αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού 2YT και κατάλληλης συγκέντρωσης αντιβιοτικό στο οποίο τα βακτηριακά στελέχη διαθέτουν ανθεκτικότητα. Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C, υπό ανάδευση (180-220 g) για 16 -18 h.

2. Σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη των 500 mL μεταφέρονται 200 mL υγρού θρεπτικού υλικού 2YT παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης αντιβιοτικού και εμβολιάζονται με 2 mL υγρής καλλιέργειας. Η κωνική φιάλη το-

ποθετείται σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C, υπό ανάδευση (180-220g). Η καλλιέργεια παρακολουθείται φασματοφωμετρικά μέχρι η απορρόφηση να φτάσει $\text{OD}_{600} = 0,5-0,7$ A, όπου και θεωρείται πως τα βακτήρια βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και πολλαπλασιάζονται με έναν μέγιστο σταθερό ρυθμό ανάπτυξης σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα. Ως τυφλό χρησιμοποιείται υγρό θρεπτικό υλικό 2YT.

3. Όταν η καλλιέργεια φτάσει στην επιθυμητή απορρόφηση μεταφέρεται απευθείας σε πάγο (ώστε να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων), όπου και παραμένει για 15 min.

4. Η καλλιέργεια που βρίσκεται στην κωνική φιάλη μεταφέρεται σε τέσσερις αποστειρωμένους σωλήνες των 50 mL. Οι σωλήνες φυγοκεντρώνονται σε 4.000 g για 6 min σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται καθώς τα βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται στο ίζημα.

5. Τα βακτηριακά κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο, και ακολουθεί διαλυτοποίηση του ιζήματος με 20 mL (σε κάθε σωλήνα των 50 mL) αποστειρωμένου και ψυχρού διαλύματος CaCl_2 100 mM. (Η προσθήκη του διαλύματος CaCl_2 γίνεται σταδιακά, έτσι ώστε τα βακτηριακά κύτταρα να επαναιωρηθούν καλά και να μην δημιουργηθούν συσσωματώματα). Το εναίωρημα τοποθετείται στον πάγο για 20 min.

6. Τα βακτήρια τοποθετούνται σε δυο σωλήνες

των 50 mL (40 mL στον καθένα). Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 4000 g για 6 min σε θερμοκρασία 4 °C και απόρριψη του υπερκειμένου.

7. Το ίζημα τοποθετείται στον πάγο και στη συνέχεια διαλυτοποιείται με την προσθήκη 1.6 mL (σε κάθε σωλήνα των 50 mL) αποστειρωμένου και ψυχρού διαλύματος CaCl₂ 100 mM.

8. Τα βακτήρια παραμένουν στον πάγο για τουλάχιστον 2 h ή εναλλακτικά για 16-18h εντός ψυκτικού θαλάμου. Ακολούθως προστίθεται αποστειρωμένη γλυκερόλη 50% v/v όγκου ίσου με το 1/3 του όγκου του βακτηριακού εναιωρήματος έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της γλυκερόλης να είναι 10% v/v.

9. Τα βακτήρια χωρίζονται σε κλάσματα των 0.1 mL και τοποθετούνται σε σωληνάρια των 1.5 mL (τύπου erpendorf). Τέλος παγώνονται σε υγρό άζωτο και τοποθετούνται στους -80 °C.

Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόστηκε για την δημιουργία δεκτικών βακτηριακών στελεχών *E.coli* XL1 Blue, BL21 (DE3) Gold και B834 (DE3).

5.3 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* με πλασμιδιακό φορέα

Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό LB Broth

- Θρεπτικό υλικό LB άγαρ
- Αντιβιοτικό ανθεκτικότητας βακτηριακών κυττάρων
- Πλασμιδιακός φορέας
- Τρυβλία petri

Πορεία:

1. Το εναιώρημα των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων αφήνεται να ξεπαγώσει σε πάγο.

2. Στα σωληνάρια τύπου erpendorf που ήταν αποθηκευμένα τα βακτηριακά κύτταρα, προστίθενται 1-100 ng πλασμιδιακού φορέα που φέρει εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό και το γονίδιο για την έκφραση της επιθυμητής ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και τα βακτηριακά κύτταρα αφήνονται για επώαση για 30 min στον πάγο μαζί με τον πλασμιδιακό φορέα, για να σταθεροποιηθεί η λιπιδιακή μεμβράνη ώστε να αυξηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων ασβεστίου και των αρνητικών μορίων του κυττάρου.

3. Ακολουθεί θερμικό σοκ των βακτηριακών κυττάρων με επώαση στους 42 °C, σε υδατόλουτρο, για 45 s. Η αλλαγή στη θερμοκρασία μεταβάλλει τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέποντας στο μόριο του DNA να εισέλθει εντός του κυττάρου. Το μείγμα τοποθετείται άμεσα στον πάγο και επωάζεται για 2 min.

4. Στη συνέχεια προστίθενται 1 mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth, χωρίς την

προσθήκη αντιβιοτικού, και τα μετασχηματισμένα πλέον βακτηριακά κύτταρα επωάζονται στους 37 °C για 1h υπό ανάδευση (180-220 g).

5. Μετά το πέρας της επώασης το 1/20 του όγκου της υγρής καλλιέργειας επιστρώνεται σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο LB Άγαρ, στα οποία έχει προστεθεί κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα τρυβλία επωάζονται για 14-16 h σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C. Τα πλασμίδια προσδίδουν στα κύτταρα ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό, με αποτέλεσμα οι αποικίες που εμφανίζονται στο τρυβλίο να αποτελούνται αποκλειστικά από κύτταρα που περιέχουν τον πλασμιδιακό φορέα (*Sambrook J. et al., 1989*).

Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόστηκε για τον μετασχηματισμό δεκτικών βακτηριακών στελεχών *E.coli* XL1 Blue, BL21 (DE3) Gold, B834 (DE3). Σημειώνεται ότι όλες οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν χειρισμό βακτηριακών κυττάρων και αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων λαμβάνουν χώρα σε στείρες συνθήκες.

5.4 Απομόνωση της HRV 3C πρωτεάσης (3C PreScission Protease)

Η πρωτεάση 3C χρησιμοποιείται για την πρωτεολυτική διάσπαση του επίτοπου GST (τρανσφεράση της S-γλουταθειόνης) σε πρωτεΐνες που φέρουν αυτόν τον επίτοπο και περιέχουν την αλληλουχία αναγνώρισης της πρω-

τεάσης. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη αποτελείται από την ανθρώπινη rhinovirus (HRV) πρωτεάση 3C και από τον επίτοπο GST.

Η αλληλουχία αναγνώρισης της πρωτεΐνης είναι η LEVLFQGP ενώ το σημείο κοπής είναι ανάμεσα στα αμινοξέα Q-G. Η πρωτεάση 3C παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση και διαθέτει υψηλή δραστηριότητα στους 4 °C, γεγονός που εξυπηρετεί την πρωτεολυτική διάσπαση σε χαμηλή θερμοκρασία αποτρέποντας την αστάθεια την πρωτεΐνης- στόχου λόγω υψηλής θερμοκρασίας.

5.4.1 Υπερέκφραση της HRV 3C πρωτεάσης σε βακτηριακά στελέχη *E.coli* B834 (DE3)

Για την υπερέκφραση της 3C πρωτεάσης αρχικά έγινε προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* B834 (DE3), όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.2. Ακολούθησε μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.3. Το γονίδιο του ενζύμου είναι κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGex-6-P-3 (Amersham GE) ο οποίος είναι εφοδιασμένος εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και χλωραμφενικόλη, και με τον κατάλληλο επίτοπο ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να εκφράζεται συγχωνευμένη με την τρανσφεράση της S-γλουταθειόνης (GST).

Κατά την πορεία έκφρασης και απομόνωσης μιας πρωτεΐνης, τα βασικά σημεία που πρέπει να καθοριστούν πριν από την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα είναι:

1. Οι συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας (θερμοκρασία, αερισμός, θρεπτικό υλικό, διάρκεια επώασης)

2. Η συγκέντρωση IPTG που απαιτείται κατά την επαγωγή καθώς επίσης και θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η επαγωγή.

Επίσης πριν από την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα, γίνεται διερεύνηση ως προς τον εντοπισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης στο διαλυτό ή στο αδιάλυτο κλάσμα, καθώς επίσης και αν αλληλεπιδρά με άλλα κυτταρικά συστατικά.

Για την επαγωγή της έκφρασης της HRV 3C πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε σαν επαγωγέας η ένωση IPTG διότι εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την αλλολακτόζη και επιπλέον μιας και δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου, δεν καταβολίζεται εξασφαλίζοντας έτσι συνεχή επαγωγή.

Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό LB Broth
- Θρεπτικό υλικό LB άγαρ
- Αντιβιοτικά αμικικιλίνη (100mg/mL) και χλωραμφενικόλη (35mg/mL)
- Πλασμιδιακός φορέας
- Δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli* B834 (DE3)
- Τρυβλία petri

- IPTG 0.1M

Πορεία:

1. Από τρυβλίο που έχουν αναπτυχθεί αποικίες μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* B834 (DE3) μεταφέρεται μια αποικία σε αποστειρωμένο σωλήνα των 50mL, στον οποίο έχουν τοποθετηθεί 5 mL αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού LB στο οποίο έχουν προστεθεί αμικικιλίνη (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και χλωραμφενικόλη (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C, υπό ανάδευση (180-220 g) για 16-18 h.
2. Σε 2 αποστειρωμένες κωνικές φιάλες, χωρητικότητας 2 L η καθεμιά, μεταφέρονται 500 mL υγρού θρεπτικού υλικού LB παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης του αντιβιοτικού αμικικιλίνη (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και εμβολιάζονται με 0,5 mL υγρής καλλιέργειας. Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C, υπό ανάδευση (180-220 g). Η καλλιέργεια παρακολουθείται φασματοφωμετρικά μέχρι η απορρόφηση να έχει φτάσει $\text{OD}_{600} = 0,5-0,7$ A, όπου και θεωρείται πως τα βακτήρια βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ως τυφλό χρησιμοποιείται υγρό θρεπτικό υλικό LB. Είναι επιθυμητό, η καλλιέργεια να φτάσει στο μέγιστο σημείο της εκθετικής φάσης όπου και θα ξεκινήσει η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης.

3. Προστίθεται ο επαγωγέας IPTG (0,1 mM) και η καλλιέργεια επάγεται στους 37 ° C υπό ανάδευση (210 g) για 4 h.
4. Μετά το πέρας της επαγωγής η καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων φυγοκεντρείται σε δοχεία συλλογής στις 5000 g για 10 min στους 4 ° C.
5. Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υπερκείμενο το οποίο θα πρέπει να είναι διαυγές (αν δεν είναι διαυγές επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση διότι αυτό σημαίνει ότι δεν έχουν καταβυθιστεί όλα τα κύτταρα), και το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται μπορεί να υποστεί αμέσως περαιτέρω επεξεργασία ή εναλλακτικά να αποθηκευτεί στους -20 °C .

5.4.2 Λύση των βακτηριακών κυττάρων

Η λύση των κυττάρων είναι ένα κρίσιμο βήμα στη πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης καθώς μπορεί να επηρεάσει τη βιολογική της ενεργότητα και τη συνολική της ποσότητα. Η λύση των κυττάρων μπορεί να γίνει ενζυμικά, μηχανικά ή με την εφαρμογή οσμωτικής πίεσης. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε ο μηχανικός τρόπος λύσης των κυττάρων με χρήση υπερήχων και η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται πρώτα σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) και στη συνέχεια πραγματοποιεί-

ται λύση των κυττάρων.

Το διάλυμα λύσης αποτελείται από

- 50 mM Tris/HCl (pH 7.5)
- 150 mM NaCl
- 0.01% v/v MTG
- Αναστολείς πρωτεασών (Complete tablets, EDTA – free)
- 50 U βενζονάση

2. Διαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων (pellet) στο διάλυμα λύσης σε θερμοκρασία 0°C.

3. Το διάλυμα στη συνέχεια υφίσταται την επίδραση υπερήχων ανά 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (διατήρηση σε πάγο) για την αποφυγή υπερθέρμανσης που θα οδηγήσει σε καταστροφή των πρωτεϊνών.

4. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4 °C , για 1 h στις 16000 g.

5. Πριν το διάλυμα των πρωτεϊνών υποστεί χρωματογραφικό καθαρισμό με το αυτόματο σύστημα FPLC φιλτράρεται από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm.

5.4.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της HRV 3C πρωτεΐνης

Χρωματογραφία συγγένειας:

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί μια αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού ενζύμων. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής βασίζεται στη βιολογική συγγένεια, η οποία στα ένζυμα εκφράζεται με την ικανότητα τους να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν με εκλεκτικό και αντιστρέψιμο τρόπο συγκεκριμένα μόρια-προσδέτες (ligand). Αν κάποιος προσδέτης, π.χ. ενζυμικό υπόστρωμα, αναστολέας, συνένζυμο, αντίσωμα, μέταλλο κ.α., δεσμευθεί χημικά (ακινητοποιηθεί) σε κατάλληλο πολυμερές στερεό υλικό, το οποίο αποκαλείται φορέας, τότε λαμβάνεται ο λεγόμενος προσροφητής συγγένειας (affinity adsorbent). Όταν ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει μίγμα μακρομορίων περάσει από τη χρωματογραφική στήλη που φέρει τον προσροφητή τότε, τυπικά, μόνο το μακρομόριο που παρουσιάζει συγγένεια με τον προσδέτη θα συγκρατηθεί (προσροφηθεί) στη στήλη, ενώ όλα τα άλλα μόρια θα απομακρυνθούν κατά το επόμενο στάδιο, της έκπλυσης. Ακολούθως, το προσροφημένο μακρομόριο εκλύεται υπό συνθήκες που εξασθενούν τις δυνάμεις μοριακής αναγνώρισης με τον προσδέτη, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του συμπλόκου στη στήλη και την παραλαβή του μακρομορίου.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης ήταν η Protino GST/4B που φέρει ως προσδέτη (ligand) ακινητοποιη-

μένη γλουταθειόνη. Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη GST περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της πρωτεΐνης με ρυθμό ροής 0.5 mL/min

Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:

- 40 mM Hepes/NaOH (pH 7.5)
- 200 mM NaCl
- 0,1 % v/v MTG (1-thioglycerol)

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection) με ρυθμό ροής 0,3 mL/min. Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον προσδέτη διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με ρυθμό ροής 0,5 mL/min με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη.

4. Έκλυση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλυσης το οποίο περιέχει:

- 40 mM Hepes/NaOH (pH 7,5)
- 200 mM NaCl
- 0,1 % MTG

- 20mM ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)
5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα. Ο ρυθμός ροής σε αυτό το βήμα ήταν 0,5mL/min.
 6. Συλλέχθηκαν τα κλάσματα με την υψηλότερη απορρόφηση, και εν συνεχεία ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν σε τελική συγκέντρωση 1mg/mL. Η συμπύκνωση έγινε με ειδικά φυγοκεντρικά φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 4 με ανώτατο όριο μοριακού βάρους (cut off) 10000 Da ώστε να μην διαφύγει η απομονωμένη πρωτεΐνη από τους πόρους του φίλτρου (MW GST-3C protease =64,4 kDa).
 7. Στη συμπυκνωμένη πρωτεΐνη που συλλέξαμε προστίθεται ίσος όγκος 100 % v/v γλυκερόλης με τον όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος ώστε η τελική συγκέντρωσή της να είναι 50% v/v. Το σύνολο του πρωτεϊνικού μίγματος δια-

μοιράζεται σε σωλήνες τύπου erpen-dorf 1,5mL και αποθηκεύεται στους -20 °C.

5.5 Απομόνωση της γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης (γ-PhK) με υπερέκφραση σε βακτηριακά στελέχη *E.coli* B834 (DE3)

Για την υπερέκφραση της γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης (E.C 2.7.1.38) αρχικά έγινε προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* B834 (DE3), όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.2. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την καταλυτική επικράτεια (catalytic domain) του ενζύμου (αμινοξέα 1-298) είναι κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P-1 (Amersham GE) ο οποίος είναι εφοδιασμένος εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμικικιλίνη και με τον κατάλληλο επίτοπο ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να εκφράζεται συγχωνευμένη με την τρανσφεράση της S-γλουταθειόνης (GST) μέσω του πρωτεολυτικού κέντρου (LEVLFQGP) που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση Rhinovirus 3C ((PreScission Protease). Ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.3

5.5.1 Υπερέκφραση της γ -καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης (γ -PhK) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli* B834 (DE3)

Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό LB Broth
- Θρεπτικό υλικό LB άγαρ
- Αντιβιοτικά αμικιλίνη (100mg/mL) και χλωραμφενικόλη (35 mg/mL)
- Πλασμιδιακός φορέας
- Δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli* B834 (DE3)
- Τρυβλία petri
- IPTG 0,1M
- Φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,45

Πορεία:

1. Από τρυβλίο που έχουν αναπτυχθεί αποικίες μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* B834 (DE3) μεταφέρεται μια αποικία σε αποστειρωμένο σωλήνα των 50mL, και εμβολιάζονται 5mL αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού LB στο οποίο έχει προστεθεί αμικιλίνη (50 μ g/mL). Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C, υπό ανάδευση (180-220 g) για 16 -18 h.
2. Σε 4 αποστειρωμένες κωνικές φιάλες, χωρητικότητας 2 L η καθεμιά, μεταφέρονται 500 mL υγρού θρεπτικού υλικού LB παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης αντιβιοτικού αμικιλίνη (50 μ g/mL) και εμβολιάζονται με 0,5mL υγρής καλλιέργειας. Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε επωαστικό θάλαμο στους

37°C, υπό ανάδευση (180-220 g). Η καλλιέργεια παρακολουθείται φασματοφωμετρικά μέχρι η απορρόφηση να έχει φτάσει OD₆₀₀= 0,5-0,7 A, όπου και θεωρείται πως τα βακτήρια βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ως τυφλό χρησιμοποιείται υγρό θρεπτικό υλικό LB.

3. Αμέσως μετά το πέρας της επώασης, οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε πάγο, για τουλάχιστον 30min ώστε να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των βακτηριακών κυττάρων. Στη συνέχεια τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο ο οποίος έχει ψυχθεί στους 18° C, για ακόμα 30min ώστε η θερμοκρασία της βακτηριακής καλλιέργειας να είναι περίπου ίδια με αυτή του επωαστικού θαλάμου.
4. Προστίθεται ο επαγωγέας IPTG (0,1mM) και η καλλιέργεια επωάζεται στους 18 ° C υπό ανάδευση (210 g) για 14-16 h.
5. Μετά το πέρας της επαγωγής η καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων φυγοκεντρείται σε δοχεία συλλογής στις 5000 g για 10 min στους 4 °C.
6. Μετά τη φυγοκέντρωση απορρίπτεται το υπερκείμενο το οποίο θα πρέπει να είναι διαυγές (αν δεν είναι διαυγές επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση διότι αυτό σημαίνει ότι δεν έχουν καταβυθιστεί όλα τα κύτταρα), και το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται μπορεί να υποστεί αμέσως περαιτέρω επεξεργασία ή εναλλακτικά να αποθηκευτεί στους -20 °C .

5.5.2 Λύση των βακτηριακών κυττάρων

1. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται πρώτα σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) και στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων.

Το διάλυμα λύσης αποτελείται απο

- 50mM Tris/HCl (pH 7,5)
- 200 mM NaCl
- 0,1% MTG
- Αναστολείς πρωτεασών (Complete tablets, EDTA – free)
- 50 U βενζονάση

2. Διαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων

στο διάλυμα λύσης σε θερμοκρασία 0 °C.

3. Το διάλυμα στη συνέχεια υφίσταται την επίδραση υπερήχων ανά 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (διατήρηση σε πάγο) για την αποφυγή υπερθέρμανσης που θα οδηγήσει σε καταστροφή των πρωτεϊνών.

4. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4 °C , για 1 h σε 16000 g

5. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το πρωτεϊνικό διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm.

5.5.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της καταλυτικής υπομονάδας γ της κινάσης της φωσφορυλάσης

A. Χρωματογραφία συγγένειας:

Η πρώτη στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της γ-PhK ήταν η Protino GST/4B (Macherey-Magel) που φέρει ως προσδέτη (ligand) ακινητοποιημένη γλουταθειόνη. Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη GST περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), με ρυθμό ροής 0,5mL/min

Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:

- 50 mM KH_2PO_4 (pH 8,2)
- Γλυκερόλη 10% v/v
- 0,1 % w/v/ MTG
- 200 mM NaCl

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection) με ρυθμό ροής 0,3mL/min. Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον προσδέτη διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη

στήλη. Το στάδιο αυτό έγινε με ρυθμό ροής 0,5 mL/min.

4. Έκλουση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει:

- 50 mM KH_2PO_4 (pH 8,2)
- 10% v/v/ γλυκερόλη
- 0,1 % w/v MTG
- 200 mM NaCl
- 20 mM ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα. Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά κλάσματα ενώνονται και ακολουθεί πρωτεολυτική διάσπαση του επίτοπου της GST με την προσθήκη διαλύματος HRV-3C πρωτεάσης (PreScission Protease) σε αναλογία 1/20 w/w με επώαση για 16 h στους 4 °C.

B. Χρωματογραφία συγγένειας:

Η δεύτερη στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της γ-PhK ήταν η HiTrap-BlueHP (GEHealthcare) που φέρει ως προσδέτη (ligand) τον Cibacron™ BlueF3G-A. Η δια-

δικασία του καθαρισμού με τη στήλη Cibacron περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της πρωτεΐνης.

Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:

- 50 mM KH_2PO_4 (pH 8,2)
- 10 % v/v γλυκερόλη
- 0,1 % w/v MTG
- 50 mM NaCl

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection).

Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον προσδέτη διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη.

4. Έκλουση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει:

- 50 mM KH_2PO_4 (pH 8,2)
- 10 % v/v γλυκερόλη
- 0,1 % w/v MTG
- 1 M NaCl

8. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη

στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με την υψηλότερη απορρόφηση με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα. Όλα τα βήματα της απομόνωσης έγιναν με ρυθμό ροής 0,5mL/min.

Γ. Χρωματογραφία συγγένειας:

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα καθαρίστηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία σε στήλη ακινητοποιημένης γλουταθειόνης Protino GST/4B. Η διαδικασία καθαρισμού διαφέρει από το πρώτο βήμα καθαρισμού καθώς η γ -Phk δεν θα δεσμευθεί στη στήλη εφόσον έχει γίνει η πρωτεολυτική διάσπαση του επίτοπου της GST. Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη GST περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:
 - 50 mM KH_2PO_4 (pH 8,2)
 - 10 % v/v γλυκερόλη
 - 0,1 % w/v MTG
 - 200 mM NaCl

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection).

Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν

συγγένεια με τον προσδέτη διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται. Στην στήλη θα δεσμευτεί η GST-3C καθώς και η GST.

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη συνεπώς και της υπό μελέτη πρωτεΐνης.

4. Έκλουση (elution) με το διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει:

- 50 mM KH_2PO_4 (pH 8,2)
- 10 % v/v γλυκερόλη
- 0,1 % w/v MTG
- 200 mM NaCl
- 20 Mm ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη, διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Στο έκλουσμα περιέχονται η πρωτεάση 3C, και ο επίτοπος GST.

6. Τα κλάσματα έκλουσης που έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση και καθαρότητα μετά την απομόνωση, συλλέγονται και συμπυκνώνονται στην επιθυμητή συγκέντρωση με

φίλτρα συμπύκνωσης vinaspin 4, με ανώτατο όριο μοριακού μεγέθους (cut off) 10.000 Da ώστε να μην διαφύγει η προς μελέτη πρωτεΐνη από τους πόρους του φίλτρου (MWγ-PhK= 34kDa). Όλα τα βήματα της απομόνωσης έγινε με ρυθμό ροής 0,5 mL/min.

Σε κάθε βήμα του καθαρισμού η καθαρότητα της πρωτεΐνης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων έκλυσης σε γέλη πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ενώ γίνεται και ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο Bradford. Η πρωτεΐνη που τελικά απομονώθηκε αποθηκεύεται στους -20°C αφού προστεθεί ίσος όγκος γλυκερόλης 100% v/v με τον όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος, ώστε τελικά η συγκέντρωση της γλυκερόλης να είναι 50% v/v. Ο έλεγχος της δραστηριότητας του ενζύμου επιτυγχάνεται με κινητικές μελέτες όπου γίνεται προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας και των σταθερών K_m και V_{max} .

5.6 Απομόνωση της πρωτεάσης TEV (Tobacco Etch Virus protease)

Η πρωτεάση TEV είναι μια πρωτεάση κυστεΐνης με μεγάλη εξειδίκευση που χρησιμοποιείται για την πρωτεολυτική διάσπαση του επιτόπου His-Tag, δηλαδή μιας σηματοδοτικής αλληλουχίας έξι καταλοιπίων ιστιδίνης στο αμινοτελικό άκρο πρωτεϊνών που φέρουν αυτόν τον επίτοπο και περιέχουν την αλληλουχία αναγνώρισης της πρωτεάσης. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη αποτελείται από την καταλυ-

τική επικράτεια της Πυρηνικής Έγκλειστης α πρωτεΐνης (NIa) που εκφράζεται από τον Tobacco Etch Virus και από μια σηματοδοτική αλληλουχία έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο και έχει μοριακό βάρος 27 kDa (Karust et al. 2001).

Η πρωτεάση TEV αναγνωρίζει ένα γραμμικό επίτοπο της μορφής E-X_{aa}-X_{aa}-Y -X_{aa}-Q-(G/S) ενώ η πιο κοινή αλληλουχία αναγνώρισης είναι η ENLYFQG/S ενώ το σημείο κοπής είναι ανάμεσα στα αμινοξέα Gln-Gly ή Gln-S. Η πρωτεάση TEV παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση και διαθέτει μέγιστη δραστηριότητα στους 30 °C. Ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί εξίσου αποτελεσματικά και στους 4 °C καθώς η δραστηριότητα της δεν μειώνεται δραματικά σε σύγκριση με την βέλτιστη θερμοκρασία (Nallamsetty et al. 2004).

5.6.1 Υπερέκφραση της TEV πρωτεάσης σε βακτηριακά στελέχη *E.coli* BL21 (DE3) Gold

Για την υπερέκφραση της TEV πρωτεάσης αρχικά έγινε προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* BL21 (DE3) Gold, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 1.2. Ακολούθησε μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα MHT234 όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.3. Το γονίδιο του ενζύμου είναι κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης MHT234 ο οποίος είναι εφοδιασμένος εκτός από το γονίδιο ανθε-

κτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και με τον κατάλληλο επίτοπο ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να εκφράζεται συγχωνευμένη με μια σηματοδοτική αλληλουχία έξι καταλοίπων ιστιδίνης (His-Tag) στο αμινοτελικό άκρο της.

Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό LB Broth
- Θρεπτικό υλικό LB Άγαρ
- Αντιβιοτικό καναμυκίνη (30 mg/mL)
- Πλασμιδιακός φορέας
- Δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) Gold
- Τρυβλία petri
- IPTG 1 M

Πορεία:

1. Από τρυβλίο που έχουν αναπτυχθεί αποικίες μετασηματισμένων κυττάρων *E.coli* BL21 (DE3) Gold μεταφέρεται μια αποικία σε αποστειρωμένο σωλήνα των 50mL, στον οποίο έχουν τοποθετηθεί 5mL αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού LB στο οποίο έχουν προστεθεί αμπικιλίνη (50 µg/mL) και γλωραμφενικόλη (30 µg/mL). Η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί σε επωαστικό θάλαμο στους 37° C, υπό ανάδευση (180-220 g) για 16-18h.
2. Σε 2 αποστειρωμένες κωνικές φιάλες, χωρητικότητας 2L η καθεμιά, μεταφέρονται 800mL υγρού θρεπτικού υλικού LB παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης αντιβιοτικού καναμυκίνη (35µg/mL) και εμβολιάζονται με 0,5mL υγρής καλλιέργειας. Η κωνική φιάλη

τοποθετείται σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C, υπό ανάδευση (180-220 g). Η καλλιέργεια παρακολουθείται φασματοφωμετρικά μέχρι η απορρόφηση να έχει φτάσει OD₆₀₀= 1,0 A.

3. Προστίθεται ο επαγωγέας IPTG (0,5 mM) και η καλλιέργεια επώάζεται για 3,5 h στους 37 °C υπό ανάδευση (210 g).
4. Μετά το πέρας της επώασης η καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων φυγοκεντρείται σε δοχεία συλλογής στις 5.000 g για 10 min στους 4 °C.
5. Μετά τη φυγοκέντρωση απορρίπτεται το υπερκείμενο και εν συνεχεία το κυτταρικό ίζημα διαλυτοποιείται σε διάλυμα 20 mM Tris/HCl pH 7,5.
6. Το κυτταρικό εναιώρημα στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 5.000 g για 10 min στους 4 °C. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται μπορεί να υποστεί αμέσως περαιτέρω επεξεργασία ή εναλλακτικά να αποθηκευτεί στους -20 °C .

5.6.2 Λύση των βακτηριακών κυττάρων

1. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται πρώτα σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) και στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων. Το διάλυμα λύσης αποτελείται από :

- 20 mM NaH₂PO₄ pH 8,0
- 300 mM NaCl

- 10 mM Ιμιδαζόλιο
- Αναστολείς πρωτεασών (Complete tablets, EDTA – free)
- 50 U βενζονάση

2. Διαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων (pellet) στο διάλυμα λύσης σε θερμοκρασία 0 °C.

3. Το διάλυμα στη συνέχεια υφίσταται την επίδραση υπερήχων ανά 1 λεπτό με ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα.

4. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4 °C , για 40 min σε 12000 g.

5. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το πρωτεϊνικό διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm.

5.6.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της πρωτεΐνης TEV

A. Χρωματογραφία συγγένειας

Η πρώτη στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον χρωματογραφικό καθαρισμό της πρωτεΐνης TEV ήταν η HisTrapHP (Ni²⁺-Sephacrose) που φέρει ως προσδέτη (ligand) ακινητοποιημένα σφαιρίδια Ni⁺² σεφαρόζης. Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη HisTrap HP περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equili-

bration buffer), ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της πρωτεΐνης.

Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:

- 20 mM NaH₂PO₄ pH 8.0
- 300 mM NaCl
- 10 mM Ιμιδαζόλιο

Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με ρυθμό ροής 0,5 mL/min με 10 mL διαλύματος εξισορρόπησης.

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection). Στη συνέχεια, ρυθμίζοντας την πίεση και το ρυθμό ροής 0.3mL/min, αρχίζει να περνάει η πρωτεΐνη μέσα από τη στήλη, ώστε ότι είναι ειδικό προς αυτή να προσδεθεί στα σφαιρίδια σεφαρόζης που φέρουν Ni⁺² και ότι δεν είναι ειδικό να εκπλυθεί στα κλάσματα υπερδιήθηματος (flow-through).

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Κατά την έκπλυση της στήλης οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συνδεθεί με μεγάλη αγκιστεία με τα σφαιρίδια σεφαρόζης που φέρουν το νικέλιο, θα απομακρυνθούν από τη στήλη και θα συλλεχθούν σε κλάσματα. Το βήμα αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που έχουν προσδεθεί στη στήλη μη-ειδικά. Η έκπλυση

έγινε με ρυθμό ροής 0,5 mL/min με τουλάχιστον 10 mL διαλύματος.

4. Έκλουση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης (Διάλυμα B) το οποίο περιέχει:

- 20 mM NaH₂PO₄ pH 8,0
- 300 mM NaCl
- 250 mM Ιμιδαζόλιο

Στο στάδιο αυτό η έκλουση γίνεται σε τέσσερα βήματα με διαβάθμιση στη συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης. Σε κάθε βήμα αυξάνεται η συγκέντρωση του παράγοντα έκλουσης, του ιμιδαζολίου, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες που έχουν δεσμευτεί με μικρότερη αγκιστεία στον προσδέτη να απομακρύνονται σταδιακά. Τα στάδια της έκλουσης περιλαμβάνουν :

I. Έκλουση με 5 mL διαλύματος 20 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Ιμιδαζόλιο (4% διαλύματος B) με ρυθμό ροής 0,5mL/min.

II. Έκλουση με 5mL διαλύματος 20 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 62 mM Ιμιδαζόλιο (24.8% διαλύματος B) με ρυθμό ροής 0,5 mL/min.

III. Έκλουση με 10 mL διαλύματος 20 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 125 mM Ιμιδαζόλιο (50% διαλύματος B) με ρυθμό ροής 0,5 mL/min.

IV. Έκλουση με 5 mL διαλύματος 20 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Ιμιδαζόλιο (100% διαλύματος B) με ρυθμό ροής 0,5mL/min.

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Στη συνέχεια, η καθαρότητα της πρωτεΐνης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων έκλουσης σε γέλη πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Τα κλάσματα τα οποία είχαν την υψηλότερη απορρόφηση με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα και περιείχαν την υπό μελέτη πρωτεΐνη συλλέχθηκαν ενώ ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο Bradford.

6. Αμέσως μετά την συλλογή των κλασμάτων ακολούθησε συμπύκνωση της πρωτεάσης TEV σε συγκέντρωση 1mg/mL με φυγοκεντρικά φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 4 με ανώτατο όριο μοριακού βάρους 10.000 Da. Ταυτόχρονα με την συμπύκνωση έγινε και αλλαγή διαλύματος της πρωτεΐνης καθώς η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου στο διάλυμα μειώνει τη δραστηριότητα της πρωτεάσης TEV. Το διάλυμα αποθήκευσης της πρωτεΐνης αποτελείται από 50mM Tris/HCl pH 7,5 και 2,5mM EDTA. Τέλος

προστέθηκε ίσος όγκος 100% v/v γλυκερόλης με τον όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος, ώστε η συγκέντρωση της γλυκερόλης να είναι τελικά 50% v/v και το σύνολο του πρωτεϊνικού μίγματος διαμοιράστηκε σε σωλήνες τύπου errendorf και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -20 °C.

5.7 Απομόνωση ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (hlGP)

Η ανασυνδυασμένη hlGP εκφράζεται σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) gold ως πρωτεΐνη συγχωνευμένη στο αμινοτελικό της άκρο με επίτοπο έξι καταλοίπων ιστιδίνης (6*His) ακολουθούμενο από τον επίτοπο Lumio (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys). Η δημιουργία του φορέα έκφρασης pET160DEST_hlgp έγινε με αντίδραση ανασυνδυασμού LR με τον αρχικό φορέα κλωνοποίησης pENTR221 σύμφωνα με την τεχνολογία κλωνοποίησης Gateway (Invitrogen).

Για την υπερέκφραση της αρχικά έγινε προετοιμασία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E.coli* BL21 (DE3), όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.2. Το γονίδιο του ενζύμου είναι κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pET160DEST ο οποίος είναι εφοδιασμένος με γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Ο μετασχηματισμός των επιδεκτικών κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται

στην παράγραφο 5.3

5.7.1 Υπερέκφραση της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (hlGP) σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BL21 (DE3) Gold.

Πριν την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα, καθορίστηκαν οι συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας (θερμοκρασία και διάρκεια επώασης), η συγκέντρωση του απαγωγέα IPTG και η θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η επαγωγή.

Υλικά:

- Θρεπτικό υλικό LB Broth
- Θρεπτικό υλικό LB Άγαρ
- Αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100mg/mL)
- Χλωριούχο μαγγάνιο (MnCl₂) (1 M)
- Πυριδοξίνη (100mg/mL)
- Πλασμιδιακός φορέας
- Δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E.coli* BL21(DE3) Gold
- Τρυβλία petri
- IPTG 0,1M
- Φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,45μm

Πορεία:

1. Από τρυβλίο που έχουν αναπτυχθεί αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* BL21 (DE3) Gold μεταφέρεται μια αποικία σε αποστειρωμένο σωλήνα των 50 mL, και εμβολιάζονται με 5 mL αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού LB παρουσία 50 μg/mL αμπικιλίνης, 600 mg/L χλωριούχου μαγγανίου και 100 mg/L πυριδοξίνης. Η καλλιέργεια αφήνε-

ται να αναπτυχθεί σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C, υπό ανάδευση (180-220 g) για 16 -18 h.

2. Σε 4 αποστειρωμένες κωνικές φιάλες, χωρητικότητας 2 L η καθεμιά, μεταφέρονται 500 mL υγρού θρεπτικού υλικού LB παρουσία αμπικιλίνης (50 µg/mL), 600 mg/L χλωριούχου μαγγανίου και 100 mg/L πυριδοξίνης και εμβολιάζονται με 0,5 mL υγρής καλλιέργειας. Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C, υπό ανάδευση (180-220 g). Η καλλιέργεια παρακολουθείται φασματοφωμετρικά μέχρι η απορρόφηση να έχει φτάσει $OD_{600} = 0,5-0,7$ A, όπου και θεωρείται πως τα βακτήρια βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης.
3. Αμέσως μετά το πέρας της επώασης, οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε πάγο, για τουλάχιστον 30 min ώστε να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των βακτηριακών κυττάρων. Στη συνέχεια τοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο στους 18 ° C, για ακόμα 30 min ώστε να γίνει εξισορρόπηση της θερμοκρασίας.
4. Προστίθεται ο επαγωγέας IPTG (0,6mM) και η καλλιέργεια επωάζεται στους 18 ° C υπό ανάδευση (210 g) για 14 – 16 h.
5. Μετά το πέρας της επαγωγής η καλλιέργεια των βακτηριακών κυττάρων φυγοκεντρείται σε δοχεία συλλογής στις 5000 g για 10 min στους 4 °C.
6. Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίπτεται

το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται μπορεί να υποστεί αμέσως περαιτέρω επεξεργασία ή εναλλακτικά να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία - 20 °C .

5.7.2 Λύση των βακτηριακών κυττάρων

1. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται πρώτα σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων.

Το διάλυμα λύσης αποτελείται από

- 50mM Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4 pH 8,0
- 500 mM NaCl
- 20 mM Ιμιδαζόλιο
- Αναστολείς πρωτεασών (Complete tablets, EDTA – free)
- 50 U βενζονάση

2. Διαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων (pellet) στο διάλυμα λύσης σε θερμοκρασία 0 °C.

3. Το διάλυμα στη συνέχεια υφίσταται την επίδραση υπερήχων ανά 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (διατήρηση σε πάγο) για την αποφυγή υπερθέρμανσης που θα οδηγήσει σε καταστροφή

των πρωτεϊνών.

4. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4°C , για 1 h σε 16000 g

5. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το πρωτεϊνικό διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45µm.

5.7.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (hIGPb)

A. Χρωματογραφία συγγένειας

Η πρώτη στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον χρωματογραφικό καθαρισμό της hIGP ήταν η HisTrapHP (Ni²⁺ Sepharose) που φέρει ως προσδέτη (ligand) ακινητοποιημένα σφαιρίδια Ni⁺² σεφαρόζης. Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη HisTrap HP περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της πρωτεΐνης. Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:

- 50 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ pH 8,0
- 500 mM NaCl
- 20 mM Ιμιδαζόλιο

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection). Στη συνέχεια, ρυθμίζοντας την πίεση και το ρυθμό ροής, αρχίζει να περνάει η πρωτεΐνη μέσα από τη στήλη, ώστε ότι είναι ειδικό προς αυτή να

προσδεθεί στα σφαιρίδια σεφαρόζης που φέρουν Ni⁺² και ότι δεν είναι ειδικό να εκπλυθεί στα κλάσματα υπερδιηθήματος (flow-through). Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στη ρητίνη μέσω σύνδεσης της σηματοδοτικής αλληλουχίας ιστιδινών που φέρει στο αμινοτελικό άκρο, με τα ιόντα νικελίου. Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον προσδέτη διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Κατά την έκπλυση της στήλης οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συνδεθεί με μεγάλη αγκιστεία με τα σφαιρίδια σεφαρόζης που φέρουν το νικέλιο, θα απομακρυνθούν από τη στήλη και θα συλλεχθούν σε κλάσματα. Το βήμα αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που έχουν προσδεθεί στη στήλη μη-ειδικά.

4. Έκλυση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλυσης το οποίο περιέχει:

- 50mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ pH 8,0
- 500 mM NaCl
- 0,5 M Ιμιδαζόλιο

Ο ρόλος του ιμιδαζολίου είναι να δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου και να ανταγωνίζεται τη δέσμευση των πρωτεϊνών

που φέρουν αλληλουχία ιστιδινών στο αμινοτελικό τους άκρο.

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα. Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά κλάσματα με τη μεγαλύτερη απορρόφηση με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα ενώνονται και ακολουθεί πρωτεολυτική διάσπαση του επίτοπου των έξι καταλοίπων ιστιδίνης με την προσθήκη διαλύματος πρωτεάσης TEV σε αναλογία 1/40 w/w με επώαση για 16 h στους 4 °C. Ταυτόχρονα με την πρωτεολυτική διάσπαση πραγματοποιήθηκε και αλλαγή του διαλύματος της πρωτεΐνης με διαπίδυση σε μεμβράνες διαπίδυσης με ανώτατο όριο μοριακού βάρους (cut off) 10000 Da ώστε να μην διαφύγει η απομονωμένη πρωτεΐνη από τους πόρους της μεμβράνης (MW=98kDa). Το διάλυμα διαπίδυσης αποτελείται από 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο. Η διαπίδυση έγινε στους 4 °C για 16 h.

B. Χρωματογραφία Συγγένειας

Το πρωτεϊνικό διάλυμα καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία συγγένειας με στήλη νικελίου HisTrap HP. Η διαδικασία κα-

θαρισμού διαφέρει από το πρώτο βήμα καθαρισμού καθώς η HisTrap δεν θα δεσμευθεί στη στήλη, εφόσον έχει γίνει η πρωτεολυτική διάσπαση του επίτοπου των έξι ιστιδινών, και δεν διαθέτει πλέον αγχιστεία για ακινητοποιημένα σφαιρίδια Ni⁺² σεφαρόζης. Στη στήλη συνδέεται ο επίτοπος των έξι ιστιδινών και η πρωτεάση TEV, ενώ η HisTrap εκλούεται στα κλάσματα υπερδιηθήματος (flow-through) όπου και συλλέγεται. Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη HisTrap HP περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer). Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:
 - 20 mM Tris/HCl pH 7,5
 - 500 mM NaCl 20 mM Ιμιδαζόλιο
2. Εισαγωγή του δείγματος (injection).

Στη συνέχεια, ρυθμίζοντας την πίεση και το ρυθμό ροής, αρχίζει να περνάει το πρωτεϊνικό διάλυμα μέσα από τη στήλη και η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου συλλέγεται στα κλάσματα του υπερδιηθήματος.

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί.

4. Έκλουση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει:

- 20 mM Tris/HCl pH 7,5
- 500 mM NaCl
- 0,5 M Ιμιδαζόλιο

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm.

Στη συνέχεια στο κλάσμα του υπερδιηθήματος που περιείχε την hIGPb έγινε αλλαγή του διαλύματος της πρωτεΐνης με διαπίδυση σε μεμβράνες διαπίδυσης με ανώτατο όριο μοριακού βάρους (cut off) 10000 Da (MWhlGp=98kDa). Το διάλυμα διαπίδυσης αποτελείται από 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,25 mM DTT (διθειοτρεϊτόλη). Η διαπίδυση έγινε στους 4 °C για 16h.

Γ. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Ο χρωματογραφικός καθαρισμός του πρωτεϊνικού διαλύματος συνεχίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Resource Q) όπου ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το φορτίο τους. Το pH του διαλύματος της πρωτεΐνης είναι μεγαλύτερο από το pI της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης να είναι αρνητικό, επιτυγχάνοντας έτσι την ειδική πρόσδεση της πρωτεΐνης στην ένωση τεταρτοταγούς αμμωνίου που είναι ο θετικά φορτισμένος ανιοντοανταλλάκτης της στήλης.

Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη Resource Q περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της πρωτεΐνης με ρυθμό ροής 0,5 mL/min. Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:

- 20 mM Tris/HCl pH 7,5
- 0,25 mM DTT

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection).

Η πρωτεΐνη περνώντας μέσα από τη στήλη, προσδένεται λόγω του αρνητικού φορτίου της στο θετικά φορτισμένο προσδέτη της στήλης. Πρωτεΐνες των οποίων το συνολικό φορτίο είναι αρνητικό δεν μπορούν να προσδεθούν στη στήλη, για αυτό και διέρχονται από αυτή και συλλέγονται στα κλάσματα του υπερδιηθήματος. Ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε στα 0,3 mL/min.

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Στο στάδιο αυτό απομακρύνονται πρωτεΐνες οι οποίες έχουν προσδεθεί μη ειδικά πάνω στη στήλη.

4. Έκλουση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει:

- 20 mM Tris/HCl pH 7,5

- 0,25 mM DTT
- 1 M NaCl

Στο στάδιο αυτό η έκλουση γίνεται με κλασμάτωση της συγκέντρωσης του διαλύματος έκλουσης. Σε κάθε βήμα αυξάνεται η συγκέντρωση του παράγοντα έκλουσης, του ιμιδαζολίου, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες που έχουν δεσμευτεί με μικρότερη αγκιστεία στον προσδέτη να απομακρύνονται σταδιακά. Για το λόγο αυτό η έκλουση πραγματοποιήθηκε σε δυο βήματα. Στο πρώτο βήμα η έκλουση πραγματοποιήθηκε έως το 40% του διαλύματος έκλουσης (400 mM NaCl) με ρυθμό ροής 0,5 mL/min σε χρονική διάρκεια 40 min (η συγκέντρωση του παράγοντα έκλουσης αυξανόταν 2% σε κάθε κλάσμα που συλλέχθηκε). Τα κλάσματα της έκλουσης που συλλέχθηκαν είχαν όγκο 1 mL. Το δεύτερο βήμα της έκλουσης πραγματοποιήθηκε με 100% του διαλύματος έκλουσης με τον ίδιο ρυθμό ροής για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που δεν εκλούστηκαν στο προηγούμενο βήμα.

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη, διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Τα κλάσματα έκλουσης που έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση και καθαρότητα

μετά την απομόνωση, συλλέγονται και συμπυκνώνονται στην επιθυμητή συγκέντρωση με φίλτρα συμπύκνωσης ninaspin 4 με ανώτατο όριο μοριακού μεγέθους (cut off) 10.000 Da ώστε να μην διαφύγει η προς μελέτη πρωτεΐνη από τους πόρους του φίλτρου.

Σε κάθε βήμα του καθαρισμού η καθαρότητα της πρωτεΐνης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων του υπερδιηθήματος, της έκπλυσης και της έκλουσης σε γέλη πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ενώ γίνεται και ποσοτικός προσδιορισμός με τη μέθοδο Bradford. Η πρωτεΐνη που απομονώθηκε φυλάσσεται στο διάλυμα έκλουσης χωρίς να υποστεί διαπίδυση για αλλαγή διαλύματος και σε θερμοκρασία 4 °C ώστε να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία για την μετατροπή της στην ενεργό μορφή φωσφορυλάση του γλυκογόνου a, όπως περιγράφεται παρακάτω.

5.8 Παρασκευή ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου a

Μετά τον χρωματογραφικό καθαρισμό της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b ακολούθησε η μετατροπή στην ενεργό μορφή του ενζύμου την φωσφορυλάση του γλυκογόνου a. Οι δυο αυτές αλληλομετατρέπόμενες μορφές διαφέρουν κατά μία φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η ομοιο-

πολική αυτή τροποποίηση καταλύεται από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η παρασκευή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *a* βασίζεται στη μέθοδο Cohen (Cohen 1973).

Υλικά:

- Διάλυμα ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου
- Διάλυμα γ -καταλυτικής υπομονάδας κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου
- Διάλυμα ATP (100 mM)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Hepes buffer 4x) pH 8,2
 - ◆ 200 mM Tris
 - ◆ 200 mM Hepes
 - ◆ 2 mM CaCl_2
 - ◆ 8 mM DTT
 - ◆ 40 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$
- Διάλυμα αραίωσης της γ -PhK (pH 8,2)
 - ◆ 50 mM Tris
 - ◆ 50 mM Hepes
 - ◆ 0,5 mM CaCl_2
 - ◆ 2 mM DTT
 - ◆ 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$
 - ◆ 5 mg/mL BSA

Η αντίδραση φωσφορυλίωσης πραγματοποιήθηκε για 1 h σε υδατόλουτρο όπου η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 30 °C. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 1 mL και η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη διαλύματος γ -PhK. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση φωσφορυλίωσης ήταν : Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Hepes buffer

1x) pH 8,2 (50 mM Tris, 50 mM Hepes, 0,5 mM CaCl_2 , 2 mM DTT, 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$), 4 mM ATP, 0,5 mg/mL διαλύματος φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b*, 5 ng/mL διαλύματος γ -καταλυτικής υπομονάδας κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μετά την επώαση ελέγχεται η δραστηριότητα του ενζύμου απουσία AMP καθώς η ηπατική ισομορφή του ενζύμου δεν υπόκειται σε αλλοστερικό έλεγχο από το AMP.

5.9 Παρασκευή μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *a*

Η μετατροπή της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου *a* βασίζεται όπως αναφέρθηκε και παραπάνω στη μέθοδο Cohen (Cohen 1973). Στο διάλυμα, η φωσφορυλάση *b* έχει πολύ μικρή δραστηριότητα και είναι απαραίτητη η παρουσία ενός ενεργοποιητή, που σταθεροποιεί την R διαμόρφωση (π.χ. AMP), για να εμφανίσει δραστηριότητα. Η φωσφορυλάση *a* είναι δραστική και δεν απαιτεί την παρουσία τέτοιου ενεργοποιητή παρόλο που η προσθήκη AMP προκαλεί μια αύξηση 10- 20% της δραστηριότητας. Η φωσφορυλάση *b* παρουσία AMP και η φωσφορυλάση *a* παρουσιάζουν παρόμοιες δραστηριότητες (Leonidas et. al, 1990).

Η αντίδραση φωσφορυλίωσης πραγματοποιήθηκε για 2 h σε υδατόλουτρο όπου η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 30 °C. Οι συνθήκες στις

οποιες έλαβε χώρα η αντίδραση φωσφορυλίωσης ήταν αυτές που χρησιμοποιήθηκαν και για την μετατροπή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης b σε a (5.8). Μετά την επώαση ελέγχεται η δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία και απουσία AMP παρουσία υποστρώματος α-D- Glc-1-P σε κορεσμό (20 mM). Αύξηση της δραστηριότητας κατά 10-20 % παρουσία AMP θεωρείται ένδειξη της μετατροπής της GPb σε GPa.

5.10 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb

Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της διαμόρφωσης T της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b αναπτύσσονται παρουσία IMP (Johnson et al. 1978) (Oikonomakos et al. 1985) που είναι ένας ασθενής ενεργοποιητής του ενζύμου και οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας του (V_{max}) χωρίς ωστόσο να επηρεάζει την συγγένεια του ως προς το υπόστρωμα (K_m). Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι της GPb στην T διαμόρφωση θα πρέπει το διάλυμα του ενζύμου να είναι απαλλαγμένο από AMP. Για τον λόγο αυτό ακολουθείται κατεργασία του ενζύμου με ενεργό ζωάνθρακα για την απομάκρυνση του AMP. Αρχικά το διάλυμα του ενζύμου (50-100 mg/mL) υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM BES/NaOH (pH 6,7), 0,1 mM EDTA, 0,02% w/v NaN₃ παρουσία ενεργού ζωάνθρακα, σε αναλογία ενζύμου:ζωάνθρακα 1:1.2 για περίπου 16 h.

Στη συνέχεια το ένζυμο φυγοκεντρείται για 10 min στις 17.000 g σε θερμοκρασία 25 ° C και μετράται η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm. Ακολουθεί κατεργασία με ενεργό ζωάνθρακα, σε αναλογία ενζύμου:ζωάνθρακα 1:1. Το ενζυμικό μίγμα αναδεύεται με τη βοήθεια υάλινης ράβδου Pasteur για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά την ανάδευση το ένζυμο φυγοκεντρείται για 10 min στις 17.000 g σε θερμοκρασία 25 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση το ένζυμο φιλτράρεται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45μm έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα του ζωάνθρακα. Τέλος, μετράται η οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Όταν ο λόγος των δύο απορροφήσεων A_{260}/A_{280} κυμαίνεται από 0,51- 0,54 θεωρείται πως έχει απομακρυνθεί η AMP (Kastenschmidt et al. 1968).

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 κορε-

σμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων GPb, η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας συμμετρίας χώρου $P4_32_12$) εντός γυάλινων σωλήνων.

Υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα BES (10 mM BES/HCl, 0,1 mM EDTA, 0.02% w/v NaN_3 , pH 6,7)
- Διάλυμα DTT 200 mM, pH 6,7
- Διάλυμα σπερμίνης 200 mM, pH 6,7
- Διάλυμα IMP 100 mM, pH 6,7
- Πυρήνες κρυστάλλωσης
- Διάλυμα GPb περιεκτικότητας 20-30 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα BES.
- Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3 mm, μήκους 3 cm.

Οι κρύσταλλοι της φυσικής διαμόρφωσης T της GPb αναπτύσσονται από μίγμα 25-30 mg/mL καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM IMP, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 10 mM BES/HCl (pH 6,7), 0,1 mM EDTA και 0,02% (w/v) NaN_3 στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραιώσεως. Το διάλυμα των πυρήνων κρυστάλλωσης παρασκευάζεται από τη θραύση τετραγωνικών κρυστάλλων φωσφορικής b. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε μικρούς σωλήνες εσωτερικής διαμέτρου 2-3 mm και μήκους περίπου 3 cm των οποίων τα δύο άκρα σφραγίζονται με parafilm. Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει μετά από 5 - 6 h σε θερμοκρασία 16 °C, ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας των κρυστάλλων είναι $a=b=128.6 \text{ \AA}$, $c=116.1 \text{ \AA}$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

B. Αναλυτικές μέθοδοι

5.11 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

5.11.1 Μέθοδος Bradford

Η εύρεση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που περιέχονται σε ένα διάλυμα γίνεται εύκολα με χρωματομετρικές μεθόδους, ή με τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος 280 nm. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford, λόγω της ευκολίας και της ταχύτητας με την οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί. Η μέθοδος αυτή εξαρτάται από τη δέσμευση της χρωστικής Coomassie G-250, κυρίως στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών, αλλάζοντας ταυτόχρονα το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης τους. Η δέσμευση αυτή είναι ανάλογη της ποσότητας των βασικών αμινοξέων των πρωτεϊνών. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αγνώστου δείγματος χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με τη βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων της βόειας αλβουμίνης ορού (BSA). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η πρότυπη πρωτεΐνη διαλύεται σε ίδιας σύστασης ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο είναι διαλυμένες οι άγνωστες πρωτεΐνες (Bradford 1976).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κάθε δείγματος, λαμβάνεται μικρή ποσότητα

πρωτεϊνών από κάθε δείγμα μέχρι τελικού όγκου 20 μL και προστίθεται σε τελικό όγκο 980 μL αντιδραστηρίου Bradford 1x και τα διαλύματα επωάζονται για 10 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, υπολογίζεται η φασματοφωτομετρική τους απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε κάθε διάλυμα έχει πραγματοποιηθεί προηγουμένως προσδιορισμός της πρότυπης καμπύλης με γνωστές συγκεντρώσεις της βόειας αλβουμίνης ορού (BSA). Από τις τιμές απορρόφησης των πρότυπων δειγμάτων κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη, από την οποία βρίσκουμε την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης. Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης ($OD_{595\text{nm}} = f(C_{BSA})$) γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στα διαλύματα σε μονάδες mg/mL .

5.11.2 Φωτομετρικός προσδιορισμός

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έγινε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 280 nm. Η συγκέντρωση του δείγματος μετά τη φωτομέτρηση υπολογίζεται από την σχέση (Kastenschmidt et al. 1968):

$$C = A/\epsilon b$$

Όπου A= απορρόφηση του ενζύμου στα 280nm

ϵ = συντελεστής απορρόφησης ($1.32 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ για την gmGP και $1.2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ για την hlGP)

b= οπτική διαδρομή κυψελίδας (συνήθως 1 cm)

C= Συγκέντρωση του ενζύμου σε mg/mL για το δείγμα της απορρόφησης.

5.12 Κινητική μελέτη μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου b που απομονώθηκε από τους σκελετικούς μυς των κόνικλων υποβλήθηκε σε κινητικές μελέτες με σκοπό τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου, τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten, και τον υπολογισμό των σταθερών αναστολής K_i χημικά συντιθεμένων ενώσεων έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Υλικά

- Φωσφορυλάση του γλυκογόνου b η οποία απομονώθηκε από σκελετικούς μύες κόνικλων.
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM EDTA)
- Διάλυμα AMP 50mM
- Διάλυμα α-D-Glc-1-P (G1P) 400 mM
- Ασκορβικό οξύ (Ascorbic acid)
- Μολυβδαινικό αμμώνιο (Ammonium molybdate)
- Οξικός ψευδάργυρος (Zinc acetate)
- SDS 1% w/v
- DMSO 100% v/v

- HCl 10 M
- NaOH 10 M
- Διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων (Pi) 1 mM
- Γλυκογόνο 1% w/v
- Ιμιδαζόλιο
- EDTA
- KCl
- dH₂O

Όργανα:

- Υδατόλουτρο, με θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 30 °C
- Πεχάμετρο
- Φωτόμετρο UV-Vis
- Πιπέτα μεγάλων όγκων (dispenser)
- Vortex
- Αναλυτικός ζυγός
- Πιπέτες
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Χρονόμετρο

5.12.1 Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Το ένζυμο μετά την απομόνωση φυλάσσεται σε εναιώρημα γλυκερόλης όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 1.1. Από το εναιώρημα αυτό παίρνουμε 5-10 μL και το αραιώνουμε με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Στη συνέχεια το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ο προσδιορισμός γίνεται με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Ως τυφλό

χρησιμοποιείται 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος αραιώσης ενζύμου 50:50:1 pH 6,8. Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία 4 °C.

5.12.2 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρώματος α-D-Glc-1-P

Για την παρασκευή των διαλυμάτων υποστρώματος Glc-1-P αρχικά παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (Assay buffer) GIP το οποίο περιείχε:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 1 (Assay buffer 1): Ιμιδαζόλιο 200 mM, KCl 400 mM, DTT 4 mM, EDTA 4 mM, pH 6,8

Εν συνεχεία, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα 2 (Assay buffer 2) ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7mM) και pH 6.8 με κατάλληλη αραιώση του ρυθμιστικού διαλύματος 1.

Από το πυκνό διάλυμα της Glc-1-P (400 mM) και το ρυθμιστικό διάλυμα 1 ιμιδαζόλιο (200 mM), KCl (400 mM), EDTA (4mM), DTT (4 mM) αναμιγνύονται κατάλληλοι όγκοι ώστε να προκύψει διάλυμα Glc-1-P (90 mM), ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) pH 6,8.

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της Glc-1-P προκύπτουν με αραιώσεις του διαλύμα-

τος Glc-1-P 90 mM με το ρυθμιστικό διάλυμα 2 ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM). Έτσι προκύπτουν συνολικά τα παρακάτω διαλύματα:

- Glc-1-P 90mM, Ιμιδαζόλιο (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) pH 6,8
- Glc-1-P 45mM, Ιμιδαζόλιο (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) pH 6,8
- Glc-1-P 27mM, Ιμιδαζόλιο (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) pH 6,8
- Glc-1-P 18mM, Ιμιδαζόλιο (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) pH 6,8
- Glc-1-P 9mM, Ιμιδαζόλιο (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) pH 6,8

Τα διαλύματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία -20°C για να αποφευχθεί υδρόλυση της Glc-1-P.

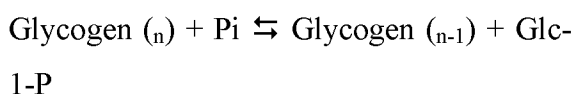
5.12.3 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb

Η ειδική δραστηριότητα (Specific Activity,

$\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{mg}}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλ-

λά 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, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Πορεία:

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται και λαμβάνεται το εναιώρημα ένζυμου περιεκτικότητας ~500 $\mu\text{g/mL}$. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25 μg ενζύμου/ mL , γλυκογόνο 1% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσεως ένζυμου 50:50:1 5% (v/v). Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται επίσης το υπόστρωμα για $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ 2 mM με προσθήκη 200 μL υποστρώματος $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ 9 mM, 18 μL AMP 50 mM και 502 μL H_2O .

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση σε θερμοκρασία 30 °C επί 15 λεπτά και το υπόστρωμα επί 3 λεπτά. Μετά την επώαση, 180 μL από το ενζυμικό μείγμα προστίθενται στον σω-

λήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Η συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση είναι: 5,0 $\mu\text{g/mL}$ ένζυμου, 1 mM AMP, 0,2 % w/v γλυκογόνο, ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσεως ένζυμου 50:50:1 1% (v/v), υπόστρωμα $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ 2 mM, και ρυθμιστικό διάλυμα 30 mM ιμιδάζολιο, 0,6 mM EDTA, 0,6 mM DTT και 60 mM KCl (pH 6,8). Η προσθήκη KCl εξασφαλίζει πως η ιοντική ισχύς του διαλύματος αντίδρασης παραμένει σταθερή σε όλα τα πειράματα. Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1-2-3-4 min) λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1.0% w/v (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται). Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ιόντων (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω.

5.12.4 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m) 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 ($\alpha\text{-D-Glc-1-P}$).

Πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25 μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 1% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου 50:50:1 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D- Glc-1-P 2, 4, 6, 10 και 20 mM, με προσθήκη 200 μL από το αντίστοιχο υπόστρωμα α-D- Glc-1-P, 18 μL AMP 50 mM και 502 μL H₂O.

Το ενζυμικό μείγμα τοποθετείται για επώαση σε θερμοκρασία 30 °C επί 15 λεπτά και τα υποστρώματα περίπου 3 λεπτά. Στη συνέχεια, για την εκκίνηση της αντίδρασης σε όλους τους σωλήνες των υποστρωμάτων σταδιακά προστίθενται 180 μl ενζυμικού μίγματος. Οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση είναι: 5 μg/mL ενζύμου, AMP 1 mM, γλυκογόνο 0,2% w/v, υπόστρωμα α-D- Glc-1-P 2-20mM και ρυθμιστικό διάλυμα 30 mM ιμιδάζολιο, 0,6 mM EDTA, 0,6 mM DTT και 60 mM KCl (pH 6,8). Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1-2-3-4 min) λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1.0% w/v.

5.12.5 Προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ιόντων- Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Ο προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστηριότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν ορθοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η απελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την αντίστροφη αντίδραση σύνθεσης 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 (Fiske and Subbarow 1925).

Η μέθοδος του ασκορβικού οξέος βασίζεται στο γεγονός ότι ο ανόργανος φώσφορος σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου Zn²⁺ σε ήπιο όξινο περιβάλλον (pH 5). Μετά από αναγωγή με ασκορβικό οξύ, το σύμπλεγμα φωσφομολυβδαινικού παράγει μια έγχρωμη ένωση (χρωμοφόρο) που παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm η οποία είναι σταθερή για αρκετή ώρα. Απουσία ορθοφωσφορικών ιόντων δεν σχηματίζεται η έγχρωμη ένωση ενώ τα ιόντα ψευδαργύρου είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό του παρούσα ορθοφωσφορικών ιόντων. Η ποσότητα των δειγμάτων σε ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi) δεν πρέπει να ξεπερνά τα 0,4 μmoles, προκει-

μένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και αξιόπιστη σε σύγκριση με τη αρχική μέθοδο Fiske και Subbarow και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων σε διάφορες αντιδράσεις (Saheki et al. 1985).

Υλικά:

- Διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου 15 mM και οξικού ψευδαργύρου 100 mM με pH 5,0. Η ρύθμιση του pH του διαλύματος γίνεται με HCl 1 N (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως).

- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), με ρύθμιση pH 5,0 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N.

Στη συνέχεια αναμιγνύουμε τα διαλύματα με αναλογία όγκων 4:1, δηλ 4 όγκους διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου/ οξικού ψευδαργύρου με 1 όγκο διαλύματος 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 (> 3 hrs).

Πορεία:

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2,5 mL από το παραπάνω διάλυμα Μετά από ισχυρή ανάδευση οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C για 15 min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm.

5.12.6 Προσδιορισμός της K_i αναστολέων στη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου b

Η K_i , είναι η σταθερά αναστολής, ή σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα, EI, και ισούται προς $[E][I]/[EI]$.

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας της σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των Pi. Η μείωση αυτή εκφράζεται ως αναστολή, σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής. Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, δρουν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή, διότι η σύνδεση τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος και συνεπώς τη φυσιολογική δράση του ενζύμου. Συμφωνά με το μοντέλο αυτής της αναστολής, ο αναστολέας δεσμεύεται στο καταλυτικό κέντρο και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Πορεία

Για να προσδιοριστεί η σταθερά της αναστολής, πραγματοποιούνται 5 πειράματα το καθένα με διαφορετική συγκέντρωση α-D-Glc-1-P, έχοντας όμως σταθερή την συγκέντρωση του αναστολέα και του AMP. Αρχικά παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα όπως έχει περιγραφεί πιο πάνω. Στη συνέχεια παρασκευάζουμε τα διαλύματα των υποστρώματων. Κάθε διάλυμα υποστρώματος θα πρέπει να έχει τελικό όγκο 720 μL . Τα διαλύματα υποστρώματος, τοποθετούνται επίσης στο υδατόλουτρο το οποίο είναι ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 30 °C, ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ενζυμικό διάλυμα, πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία.

Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος καθώς και των διαλυμάτων του υποστρώματος, μεταφέρονται 180 μL από το ενζυμικό διάλυμα σε κάθε διάλυμα υποστρώματος με τη σειρά, έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια ανά 1 λεπτό και σε χρόνους 1, 2, 3, και 4 λεπτών λαμβάνονται και μεταφέρονται 200 μL από το διάλυμα της αντίδρασης σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιέχουν 50 μL SDS 1% w/v και η αντίδραση σταματά. Στη συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις α-D-Glc-1-P και αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί, προστίθενται από 2,5 mL διάλυμα ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα τα δείγματα ε-

πιάζονται για 15 λεπτά στους 30° C και ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα, από τις οποίες θα προκύψουν και αλλά πειραματικά δεδομένα για την δημιουργία της καμπύλης για τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής (K_i). Στη συνέχεια ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit (Leatherbarrow 2007) προκειμένου να προσδιοριστεί η K_i .

5.13 Κινητική μελέτη μυϊκής κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η γ - καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου υποβλήθηκε σε κινητικές μελέτες με σκοπό τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου και των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου.

Η καταλυτική επικράτεια (αμινοξέα 1-298) της γ -καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι ενεργή, χωρίς να απαιτείται η ενεργοποίηση του ενζύμου με φωσφορυλίωση στο λεγόμενο τμήμα ενεργοποίησης κινάσης, όπως συμβαίνει με άλλες πρωτεϊνικές κινάσες. Αυτό συμβαίνει λόγω της ύπαρξης ενός καταλοίπου γλουταμινικού οξέος το οποίο 'μιμείται' φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα σερίνης/ θρεονίνης ή τυροσίνης καθιστώντας την επικράτεια αυτή ιδιόστατικώς ενεργή. (Skamnaki et al. 1999)

5.13.1 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας της γ -PhK γίνεται έμμεσα και στηρίζεται στη μέτρηση της ειδικής δραστηριότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου.

Υλικά:

- Stop Buffer (pH 6,8)
 - 0,1 M TEA
 - 1 mM EDTA
 - 2 mM DTT

- Buffer αραίωσης κινάσης (pH 8,2)
 - 5 mg/mL BSA
 - 50 mM Tris
 - 50 mM Hepes
 - 0,5 mM CaCl_2
 - 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$

- Buffer Hepes 4x pH 8,2:
 - 50 mM Tris
 - 50 mM Hepes
 - 0,5 mM CaCl_2
 - 2 mM DTT
 - 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$

- Γλυκογόνο 1 % (w/v)
- Διάλυμα SDS 1% (w/v)
- Διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων (Pi) 1 mM, pH 6,8
- Διάλυμα AMP 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6,8

- Απιονισμένο ύδωρ

Όργανα:

- Υδατόλουτρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Συσκευή vortex
- pHμετρο
- Χρονόμετρο

5.13.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της γ -PhK ως προς ATP

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο όπου η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 30 °C. Ο συνολικός όγκος των υποστρωμάτων ήταν 90 μL και περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Hepes buffer), φωσφορυλάση του γλυκογόνου, και διάφορες συγκεντρώσεις ATP. Τα υποστρώματα τοποθετήθηκαν για επώαση στους 30 °C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 10 μL διαλύματος γ -Phk 50 ng/mL. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε: 50 mM Tris/HCl pH 8,2, 50 mM Hepes, 0,5mM CaCl_2 , 2mM DTT, 10 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 0,5 mg/mL BSA, 1 mg/mL GPb, ATP (0,08 mM- 0,2 mM- 0,4 mM- 0,5 mM-0,8 mM) και γ -PhK 5 ng/mL.

Σε χρονικά διαστήματα 4- 8- 12 και 14 min, λαμβάνονται δείγματα 20 μL από την ενζυμική

αντίδραση και αραιώνονται 50 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα (Stop buffer), σε θερμοκρασία 0 °C ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η ενζυμική δραστηκότητα της GPa που είναι το προϊόν της αντίδρασης της γ -PhK.

5.13.3 Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηκότητας της GPa

Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της δραστηκότητας της GPa. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C. Αρχικά ετοιμάζονται τα υποστρώματα της αντίδρασης που περιέχουν 152 mM GIP, 2% w/v γλυκογόνο, 20 μ M AMP, και 1 mM καφεΐνη με τελικό όγκο 0,15 mL. Τοποθετούνται τα υποστρώματα για επώαση στους 30 °C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 0.15 μ L GPa 0,02 mg/mL (προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης), στα υποστρώματα. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση (σε τελικό όγκο 0,3 mL) έχουμε: 76 mM Glc-1-P, γλυκογόνο 1% w/v, 10 μ M AMP, 0,5mM καφεΐνη.

Μετά από χρόνο αντίδρασης 4 min λαμβάνονται δείγματα των 200 μ L από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 300 μ L SDS 1% w/v. Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός Pi (προϊόν αντίδρασης) με

την μέθοδο ασκορβικού οξέος προσθέτοντας 5 mL διαλύματος ασκορβικού οξέος σε κάθε δείγμα. Μετά από 15min επώαση μετρήθηκε η απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm.

5.14 Κινητική μελέτη ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου b που απομονώθηκε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.6 και φωσφορυλιώθηκε για την μετατροπή της στην ενεργό μορφή GPa όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.7. Η GPa υποβλήθηκε σε κινητικές μελέτες με σκοπό τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηκότητας του ενζύμου, τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten, και των σταθερών αναστολής K_i . Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με την αυτή που περιγράφηκε για την μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου ωστόσο έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών των πειραματικών διαδικασιών για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου και της σταθεράς αναστολής (K_i) των υπό μελέτη ενώσεων.

Υλικά:

- Ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου a
- Διάλυμα α -D-Glc-1-P (Glc-1-P) 400 mM
- Ασκορβικό οξύ (Ascorbic acid)
- Μολυβδαινικό αμμώνιο (Ammonium molybdate)

- Οξικός ψευδάργυρος (Zinc acetate)
- SDS 1% w/v
- DMSO 100% v/v
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 10 M
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) 10 M
- Διάλυμα όρθοφωσφορικών ιόντων (Pi) 1 mM
- Γλυκογόνο 1% w/v
- Ιμιδαζόλιο
- EDTA
- KCl
- dH₂O

Όργανα:

- Υδατόλουτρο, με θερμοκρασία ρυθμιζόμενη στους 30°C
- Πεχάμετρο
- Φωτόμετρο UV-Vis
- Πιπέτα μεγάλων όγκων (dispenser)
- Vortex
- Αναλυτικός ζυγός
- Πιπέτες
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Χρονόμετρο

5.14.1 Βελτιστοποίηση κινητικών συνθηκών

Για την μελέτη των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου, έπρεπε αρχικά να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την κινητική μελέτη του ενζύμου.

Αρχικά έγινε προσδιορισμός του βέλτιστου pH της αντίδρασης με έλεγχο της ειδικής δραστηκότητας της GPα σε pH 6,8 και 7,5. Επίσης προσδιορίστηκε η ενζυμική δραστηκότητα σε διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ενζύμου. Οι

χρόνοι που δοκιμάστηκαν ήταν 30-60-90-120 sec, 1-2-3-4 min, 2-5-10-15 min, 5-8-12-20 min και 4-6-9-12 min και συγκεντρώσεις ενζύμου 950 ng/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 5 µg/mL. Τέλος έπρεπε να καθοριστούν και οι βέλτιστες συγκεντρώσεις υποστρώματος α-D-Glc-1-P καθώς η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν στην ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων. Οι συγκεντρώσεις Glc-1-P που εξετάστηκαν κάλυπταν ένα μεγάλο εύρος τιμών τόσο σε χαμηλές συγκεντρώσεις όσο και σε υψηλές σε συγκεντρώσεις κορεσμού για το ένζυμο και κυμαίνονταν από 0,2 mM έως και 20 mM.

5.14.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis – Menten (K_m)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η φωσφορύλαση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen_(n)**, προς **Glycogen_(n-1)** και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**. Η πειραματική διαδικασία παραμένει η ίδια και στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*.

Πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 5 µg/mL ενζύμου, και γλυκογόνο 1% (w/v). Σε μια σειρά δοκι-

μαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων Glc-1-P 0,2, 0,5, 0,7, 1, 2 και 4 mM, με προσθήκη 40 μL από το αντίστοιχο υπόστρωμα Glc-1-P, και 104 μL H_2O .

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση σε θερμοκρασία 30 °C επί 15 λεπτά και το υπόστρωμα επί 3 λεπτά. Μετά την επώαση, 36 μL από το ενζυμικό μείγμα προστίθενται στον σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η αντίδρασης είναι: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ένζυμου, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υπόστρωμα Glc-1-P 0,2-4 mM, και ρυθμιστικό διάλυμα 30 mM ιμιδάζολιο, 0,6 mM EDTA, 0,6 mM DTT και 60 mM KCl (pH 6,8) ώστε η ιοντική ισχύς να παραμένει σταθερή σε όλα τα πειράματα. Σε χρόνους 4-6-9-12 min λαμβάνονται δείγματα των 40 μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 10 μL SDS 1,0% w/v. Στη συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις Glc-1-P. Στα δείγματα που έχουν ληφθεί, γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός των P_i με τη μέθοδο του ασκορβικού οξέος.

5.14.3 Προσδιορισμός της K_i αναστολέων στην ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου α

Ο προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής K_i των υπό μελέτη αναστολέων πραγματοποιήθηκε στις συνθήκες που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 5.13.2 με τη διαφορά ότι οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται παρουσία σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος Glc-1-P. Για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τουλάχιστον πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων υποστρώματος. Στη συνέχεια ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit (Leatherbarrow, 1992), προκειμένου να προσδιοριστεί η K_i .

5.15 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit

Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit (Leatherbarrow 1992). Οι απορροφήσεις των δειγμάτων διορθώνονται με την αφαίρεση της τιμής απορρόφησης των τυφλών της Glc-1-P (για την κάθε συγκέντρωση) και του γλυκογόνου, ενώ από την τιμή της απορρόφησης του πρότυπου διαλύματος ορθοφωσφορικών ιόντων προκύπτει η τιμή της απορρόφησης του 1 μmol P_i , οπότε όλες οι τιμές των απορροφήσεων ανάγονται σε μmol P_i .

5.15.1 Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας GP και τυπικών αποκλίσεων

Οι τιμές των ταχυτήτων (v) της αντίδρασης και το τυπικό τους σφάλμα (σ^2) υπολογίζονται εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (nonlinear regression) και θεωρώντας ότι η κάθε πειραματική τιμή εμπεριέχει τυχαίο σφάλμα, δηλαδή η τυπική απόκλιση (σ^2) είναι σταθερή ("simple weighting").

Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας της GP είναι η εξής:

$$sp. activity GP = \frac{limit}{time \times [GP] \times Assay volume} \times \ln \frac{limit}{limit - \frac{OD - blank}{st. Pi}}$$

Όπου:

- ♦ $limit = [Glc-1-P] \times 0.78 \times Assay volume$
- ♦ [Glc-1-P]: Η συγκέντρωση του υποστρώματος που χρησιμοποιούμε κάθε φορά στην ενζυμική αντίδραση.
- ♦ Assay volume: Ο όγκος της ενζυμικής αντίδρασης που λαμβάνεται κάθε φορά και τερματίζεται σε 1% w/v SDS σε διάφορους χρόνους.
- ♦ 0.78 (78%): Η μέγιστη παραγωγή προϊόντος Pi όταν η αντίδραση φτάσει σε ισορροπία
- ♦ time: ο χρόνος σε min της ενζυμικής αντίδρασης

- ♦ [GP]: Η τελική συγκέντρωση του ενζύμου στην ενζυμική αντίδραση
- ♦ OD: οπτική απορρόφηση των δειγμάτων σε μήκος κύματος 850nm
- ♦ blanc: το άθροισμα της οπτικής απορρόφησης του τυφλού υποστρώματος (Glc-1-P) και του γλυκογόνου
- ♦ St. Pi: η οπτική απορρόφηση 1 μ mol Pi που προκύπτει από το πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων.

5.15.2 Υπολογισμός κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} για την GP

Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων το πρόγραμμα επεξεργάζεται τις τιμές των ταχυτήτων για όλες τις συγκεντρώσεις υποστρώματος που προέκυψαν από την παραπάνω εξίσωση εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση των δεδομένων και των τυπικών αποκλίσεων τους («explicit weighting»). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους V_{max} και K_m , και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό αυτό χρησιμοποιείται η γνωστή εξίσωση Michaelis-Menten:

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

5.15.3 Υπολογισμός της φαινόμενης K_m ($K_{m,app}$) και της σταθεράς αναστολής K_i – μοντέλο συναγωνιστικής αναστολής (competitive inhibition)

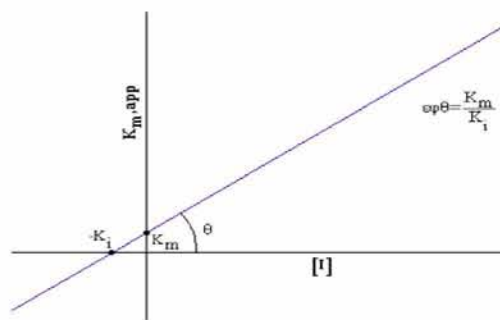
Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, δρουν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή, διότι η σύνδεση τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος και συνεπώς τη φυσιολογική δράση του ενζύμου. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτής της αναστολής, ο αναστολέας συνδέεται στο ίδιο ενεργό κέντρο όπου συνδέεται και το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου. Έτσι, το μόριο του υποστρώματος δεν μπορεί να συνδεθεί όταν ο αναστολέας είναι ήδη συνδεδεμένος και το αντίθετο. Σε αυτή την περίπτωση, η V_{max} της αντίδρασης παραμένει η ίδια (καθώς η παρουσία του αναστολέα μπορεί να υπερνικηθεί από υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος), ενώ η φαινόμενη συγγένεια του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο μειώνεται (αυτό σημαίνει ότι η σταθερά διάστασης K_d ($K_{dissociation}$) αυξάνεται). Η μεταβολή της K_m (σταθερά Michaelis-Menten) ακολουθεί την αλλαγή της K_d . Έτσι η φαινόμενη K_m ($K_{m,apparent}$) αυξάνεται και η τιμή της δίνεται από τον τύπο:

$$K_{m,app} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Ενώ η εξίσωση Michaelis-Menten παίρνει την μορφή:

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{[S] + K_m ([I]K_i + 1)}$$

Παρατηρούμε ότι η μέγιστη ταχύτητα V_{max} δεν μεταβάλλεται, ενώ η τιμή της σταθεράς Michaelis-Menten μεγαλώνει κατά το ποσό $([I]K_i+1)$. Οι υπολογισμοί των σταθερών αναστολής K_i έγιναν με διαγράμματα των $K_{m,app}$ προς τη συγκέντρωση του αναστολέα χρησιμοποιώντας γραμμική απόκλιση (linear regression) και την τυπική απόκλιση (standard deviation) για κάθε τιμή, και θεωρώντας ότι η τιμή της K_i αντιστοιχεί σε $K_{m,app}=0$ (Segel 1993). Σε όλους τους υπολογισμούς των κινητικών παραμέτρων, το τυπικό σφάλμα ήταν κατά μέσο όρο μικρότερο του 10%.



Εικόνα 5.1: Διάγραμμα $K_{m,app}=f([I])$, από όπου από το σημείο τομής με τον άξονα x και την κλίση της ευθείας προκύπτει η τιμή της K_i

5.15.4 Υπολογισμός κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} για την γ -PhK

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας της γ -PhK γίνεται έμμεσα και στηρίζεται στη μέτρηση της ειδικής δραστηριότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου. Οι τιμές των ταχυτήτων (v) της αντίδρασης και το τυπικό τους σφάλμα (σ^2) υπολογίζονται όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 6.5.1 σύμφωνα με τις εξισώσεις:

A) Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας (specific activity) της GP

$$sp. activity_{GP} = \frac{limit}{time \times [GP] \times Assay\ volume} \times \ln \frac{limit}{limit - \frac{OD - blank}{st. Pi}}$$

Όπου:

- limit = [Glc-1-P] x 0.78 x Assay volume
- [Glc-1-P]: Η συγκέντρωση του υποστρώματος που χρησιμοποιούμε κάθε φορά στην ενζυμική αντίδραση.
- Assay volume: Ο όγκος της ενζυμικής αντίδρασης που λαμβάνεται κάθε φορά και τερματίζεται σε 1% SDS σε διάφορους χρόνους.

- 0.78 (78%): Η μέγιστη παραγωγή προϊόντος Pi όταν η αντίδραση φτάσει σε ισορροπία
- time: ο χρόνος σε min της ενζυμικής αντίδρασης
- OD: οπτική απορρόφηση των δειγμάτων στα 850nmblanc: το άθροισμα της οπτικής απορρόφησης του τυφλού υποστρώματος (Glc-1-P) και του γλυκογόνου
- St. Pi: η οπτική απορρόφηση 1 μ mol Pi που προκύπτει από το πρότυπο διάλυμα.

B) Υπολογισμός του προϊόντος της αντίδρασης (GPa) ανά nmol γ -PhK που καταλύεται από την γ -PhK

$$GPa \frac{\mu mol}{nmol} PhK = specific\ activity_{GP} \times \frac{MW_{\gamma-PhK} \times [GP] \times Assay\ volume \times 1000}{MW_{GP} \times V_{max} \times [\gamma-PhK] \times Assay\ volume}$$

Όπου

- [GP]: Η τελική συγκέντρωση σε mg/mL της GP, στο πρώτο μέρος της αντίδρασης, στην αντίδραση φωσφορυλίωσης της GPb σε GPa.
- [γ -PhK]: Η τελική συγκέντρωση σε ng/mL της γ -PhK, στο πρώτο μέρος της αντίδρασης, στην αντίδραση φωσφορυλίωσης της GPb σε GPa.
- V_{max} : Η μέγιστη ταχύτητα της GPa

- Assay volume: Ο όγκος της αντίδρασης που λαμβάνεται κάθε φορά και τερματίζεται σε πάγο σε διάφορους χρόνους.

Οι υπολογισμοί των κινητικών παραμέτρων K_m και V_{max} με το πρόγραμμα Grafit έγιναν όπως παρουσιάζεται στην παράγραφο 6.5.2.

Γ. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

5.16 Επιλογή κρυστάλλων

Η καταλληλότητα των κρυστάλλων που χρησιμοποιούνται σε πειράματα περίθλασης ακτίνων-X κρίνεται αρχικά από το μέγεθος και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά τα οποία εξετάζονται με τη βοήθεια στερεο-μικροσκοπίου εφοδιασμένου με διάταξη πολωμένου φωτός. Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι με διαστάσεις 0,2-0,5mm δίνουν συνήθως υψηλής ευκρίνειας περιθλασιγράμματα με έντονες και καλοσηματισμένες περιθλάσεις (reflections). Η χρήση μικρότερων κρυστάλλων είναι δυνατή, ωστόσο τα περιθλασιγράμματα είναι ασθενέστερα, συνήθως παρέχουν μικρότερη ευκρίνεια και απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος έκθεσής τους στην ακτινοβολία. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας (I) με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι $I = I_0 e^{-\mu t}$

όπου μ (Units/cm) είναι ο συντελεστής γραμμικής απορρόφησης, ο οποίος αυξάνει σημαντικά με τον ατομικό αριθμό του στοιχείου και

είναι το πάχος του κρυστάλλου (I_0 είναι η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας).

Επιπλέον, οι κρύσταλλοι πρέπει να είναι μονοκρύσταλλοι χωρίς ρωγμές, να διαθέτουν οπτική διαύγεια, λείες επιφάνειες, και καλά καθορισμένες ακμές και έδρες. Πολλές φορές παρατηρείται η ανάπτυξη κρυστάλλων με τη μορφή συμπλεγμάτων μικρών κρυστάλλων. Στην περίπτωση αυτή ο διαχωρισμός τους επιτυγχάνεται με εφαρμογή μικρής πίεσης με τη βοήθεια λεπτής τρίχας ή λεπίδας.

Ποσοστό 30 έως 60% περίπου του όγκου των πρωτεϊνικών κρυστάλλων καταλαμβάνεται από το διαλύτη ο οποίος είναι απαραίτητος για τη σταθεροποίηση του κρυσταλλικού πλέγματος. Η αλλαγή της σύστασης του, λόγω εξάτμισης ή μεταβολής της συγκέντρωσης των συστατικών του έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην ακεραιότητα του πλέγματος και την ικανότητα του κρυστάλλου να περιθλά τις ακτίνες-X (Rhodes 1999). Στον κρύσταλλο ο διαλύτης βρίσκεται είτε δεσμευμένος στην επιφάνεια

νεια της πρωτεΐνης μέσω δεσμών υδρογόνου, είτε υπάρχει ελεύθερος στις περιοχές μεταξύ των μορίων.

5.17 Εμβάπτιση κρυστάλλου και τοποθέτησή του σε τριχοειδείς σωλήνες

Ο σχηματισμός του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της συγκρυστάλλωσης είτε με τη μέθοδο του εμποτισμού προσχηματισμένων κρυστάλλων του ενζύμου με διάλυμα του αναστολέα. Στην περίπτωση αυτή ο αναστολέας 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 θερμοκρασία περιβάλλοντος) ακολουθείται και διαφορετική διαδικασία.

Οι κρύσταλλοι της GPb αρχικά μεταφέρονται σε διάλυμα BES (10mM BES/NaOH pH 6.7, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT) εντός τρυβλίου Petri. Στη συνέχεια, επιλέγονται μεμονωμένοι κρύσταλλοι οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή δεδομένων. Στην περίπτωση συλλογής σε θερμοκρασία περιβάλλοντος οι κρύσταλλοι μεταφέρονται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur μέσα σε μικρούς τριχοειδείς σωλήνες, οι οποίοι περιέχουν μικρή ποσό-

τητα διαλύματος BES και τοποθετούνται στο κέντρο του σωλήνα.

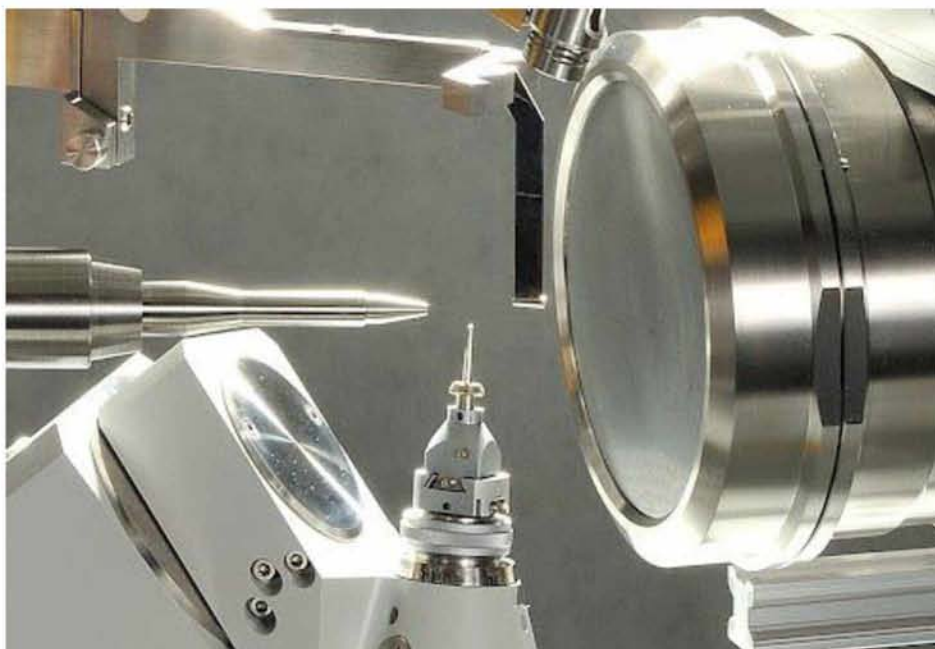
Στη συνέχεια απομακρύνεται η περίσσεια του διαλύτη με τη βοήθεια λεπτών λωρίδων διηθητικού χαρτιού ώστε να ακολουθήσει η εμβάπτιση του κρυστάλλου σε διάλυμα αναστολέα εντός του τριχοειδούς σωλήνα. Ο κρύσταλλος διαβρέχεται από κατάλληλο διάλυμα αναστολέα (200-300 μ L σε ρυθμιστικό διάλυμα BES) για μερικές ώρες έτσι ώστε να εισχωρήσει ο αναστολέας μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα. Κατά την διάρκεια της επώασης ο κρύσταλλος παρακολουθείται ανά τακτά χρονικά διαστήματα και αν εμφανιστούν ρωγμές στον κρύσταλλο απομακρύνεται το διάλυμα. Οι ρωγμές είναι δυνατόν να οφείλονται σε μεγάλες δομικές μεταβολές που προκαλούνται από τη σύνδεση του αναστολέα με την πρωτεΐνη.

Στη συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα του αναστολέα με τη βοήθεια λεπτών λωρίδων διηθητικού χαρτιού. Δυο σταγόνες ρυθμιστικού διαλύματος BES τοποθετούνται στα δύο άκρα του τριχοειδή σωλήνα πριν από την σφράγιση του με κερί προκειμένου να υπάρχει ικανοποιητική υγρασία μέσα στον σωλήνα κατά την διάρκεια μεταφοράς και έκθεσης των κρυστάλλων στις ακτίνες X. Τέλος ο τριχοειδής σωλήνας τοποθετείται στην κεφαλή του γωνιομετρου για την έκθεση του κρυστάλλου στη δέσμη ακτίνων X.

5.18 Έκθεση κρυστάλλου στις ακτίνες X

Το γωνιόμετρο τοποθετείται μπροστά από τις ακτίνες X σε μια διάταξη όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 5.3. Ο κρύσταλλος που βρίσκεται στον τριχοειδή σωλήνα τοποθετείται στο γωνιόμετρο και στη συνέχεια το όλο σύ-

στημα τοποθετείται στην κατάλληλη υποδοχή ανάμεσα στον ανιχνευτή και την έξοδο της ακτινοβολίας. Ο κρύσταλλος ευθυγραμμίζεται (alignment) ως προς την διεύθυνση της δέσμης της ακτινοβολίας με ρυθμίσεις του γωνιομέτρου.



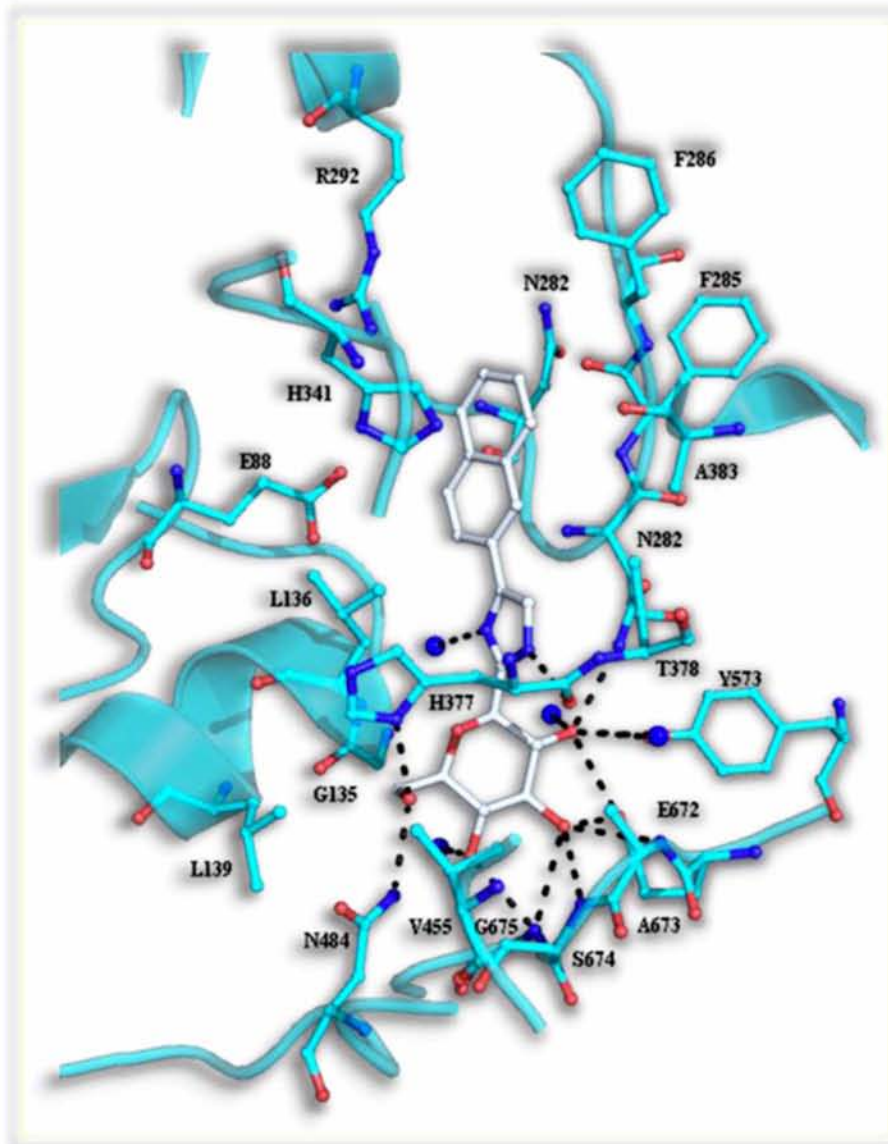
Εικόνα 5.2: Διάταξη που χρησιμοποιείται για την συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων, όπου φαίνεται η πηγή ακτίνων X, η θέση του γωνιομέτρου και ο ανιχνευτής.

Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού καταχωρούνται πριν από την έναρξη της έκθεσης του κρυστάλλου στις ακτίνες X όλα τα χαρακτηριστικά του πειράματος : α) απόσταση του κρυστάλλου από τον ανιχνευτή, β) η γωνιά περιστροφής και γ) ο χρόνος έκθεσης δ) αριθμός εικόνων για την συλλογή ενός πλήρους συνόλου περιθλάσεων στην υψηλότερη δυνατή ευκρίνεια. Στη συνέχεια ακολουθεί η έκθεση του

κρυστάλλου και η λήψη των 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.

Αποτελέσματα- Συζήτηση



Δίκτυο αλληλεπιδράσεων του πλέον ισχυρού αναστολέα (BEva349) για το καταλυτικό καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

6. Αποτελέσματα- Συζήτηση

A. Αποτελέσματα παρασκευαστικών μεθόδων

6.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κονίκλων

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου απομονώθηκε από τους σκελετικούς μύες κουνελιού, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.1. Σε κάθε βήμα της λαμβάνεται δείγμα ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης σε κάθε στάδιο της απομόνωσης (Εικόνα 6.1).

Μετά το τέλος της απομόνωσης ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης με μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος σε μήκος κύματος 280 nm γνωρίζοντας ότι ο συντελεστής απορρόφησης (ϵ) για την μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι $1.32 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Buc et al. 1971) σύμφωνα με την εξίσωση :

$$A = \epsilon \times b \times C$$

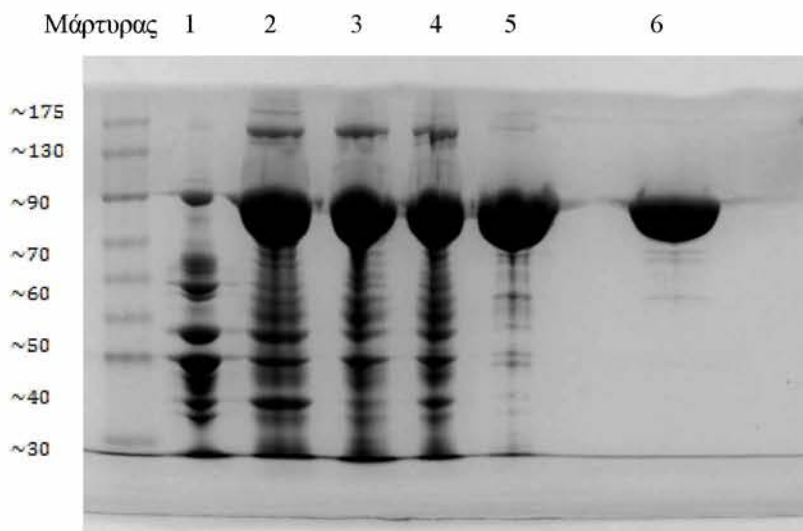
Όπου A = τιμή της απορρόφησης

ϵ = συντελεστής απορρόφησης

b= το μήκος διανυθείσας διαδρομής μέσα στο διάλυμα (στην πράξη αντιστοιχεί στο πάχος της κυψελίδας που είναι συνήθως 1 cm)

C= συγκέντρωση (gr/L).

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης τελικά



Εικόνα 6.1: Ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμιδίου δειγμάτων του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στη δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά τη θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην πέμπτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα κατά την τέταρτη ανακρυστάλλωση. Στην τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη (GPb).

ήταν 275,76 mg/mL, ο συνολικός όγκος της πρωτεΐνης 6 mL, ενώ η συνολική απόδοση της απομόνωσης ήταν 827 mg/kg μυϊκού ιστού.

6.2 Απομόνωση της γ -καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης (γ - PhK)

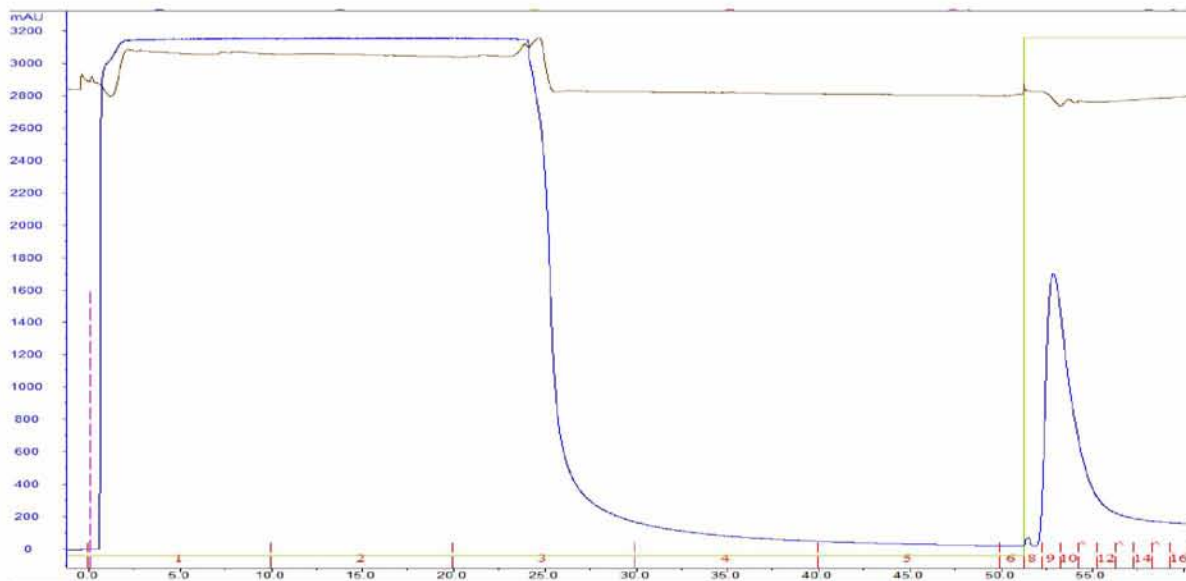
Η γ -καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης υπερεκφράστηκε σε βακτηριακά στελέχη και απομονώθηκε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.5. Η απο-

μόνωση έγινε με χρωματογραφικές μεθόδους και σε κάθε στάδιο της απομόνωσης ελέγχθηκε η καθαρότητα της.

A) Χρωματογραφία συγγένειας

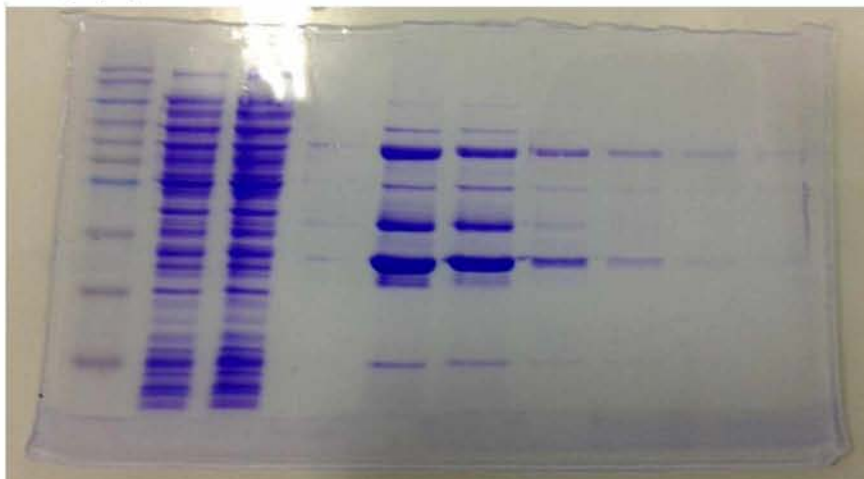
Μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, το πρωτεϊνικό διάλυμα υφίσταται χρωματογραφικό καθαρισμό με τη στήλη Protino GST/4B που φέρει ως προσδέτη ακινητοποιημένη γλουταθειόνη. Ακολουθεί το χρωματογράφημα που προέκυψε μετά το πρώτο στάδιο της απομόνωσης. Τα κλάσματα 1-3 του χρωματογραφήματος αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του υπερδιηθήματος οι

οποίες δεν προσδέθηκαν στη στήλη, τα κλάσματα 4-5 αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες οι οποίες απομακρύνθηκαν από τη στήλη κατά τη διάρκεια της έκλυσης (wash) της στήλης. Τέλος τα κλάσματα 6-16 αντιστοιχούν στο στάδιο της έκλυσης όπου έγινε και η έκλυση της γ -PhK (Εικόνα 6.2). Μετά το τέλος της απομόνωσης λαμβάνεται δείγμα από όλα τα κλάσματα ώστε να ελεγχθεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης (Εικόνα 6.3). Το μοριακό βάρος της γ -PhK είναι 34 kDa, του επίτοπου GST είναι 26 kDa (GST- γ -PhK 60 kDa), ενώ της πρωτεάσης 3C μαζί με την GST 46,4 kDa.



Εικόνα 6.2: Χρωματογράφημα στήλης Protino GST/4B. Με ροζ διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, με μπλε γραμμή η τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, με πράσινη γραμμή η συγκέντρωση του διαλύματος B ενώ με καφέ η αγωγιμότητα του ρυθμιστικού διαλύματος.

Μάρτυρας 1 2 3 4 5 6 7 8 9

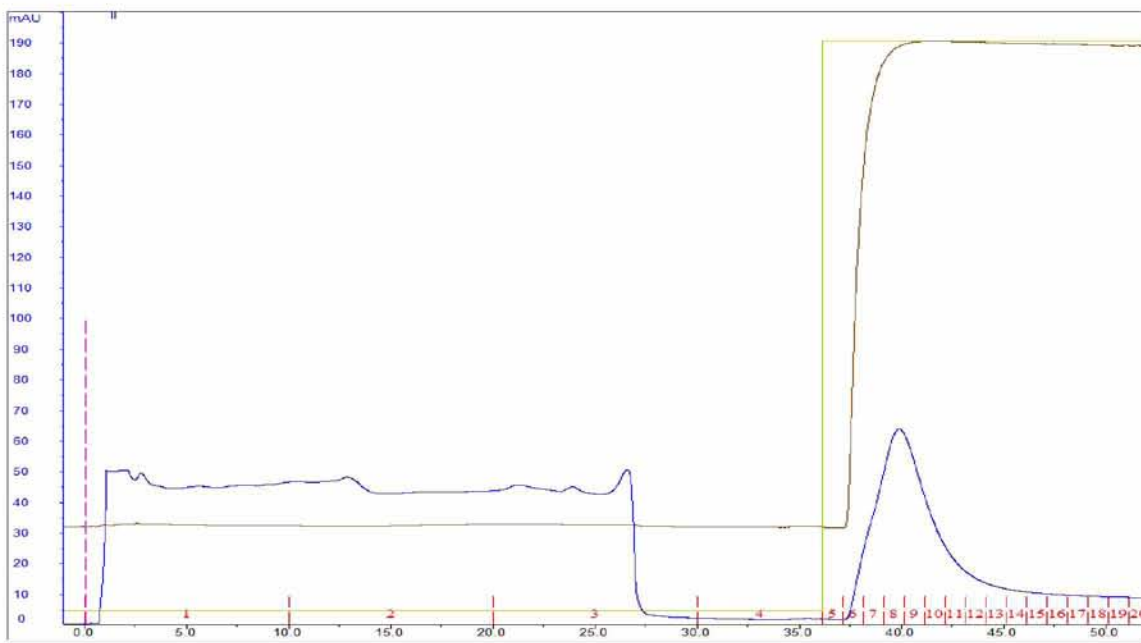


Εικόνα 6.3: Ηλεκτροφόρηση γέλης δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, στο πρώτο βήμα της απομόνωσης της γ -PhK με την ProtinoGST/4B. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το σύνολο των πρωτεϊνών μετά την λύση των βακτηριακών κυττάρων. Στη δεύτερη, το σύνολο του πρωτεϊνικού διαλύματος που δεν δεσμεύθηκε στη στήλη (υπερδιήθημα) και αντιστοιχεί (κλάσμα 1), ενώ στην τρίτη το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά την έκλυση της στήλης (κλάσμα 4). Στις υπόλοιπες διαδρομές το έκλουσμα της στήλης ProtinoGST/4B (κλάσματα 9-14).

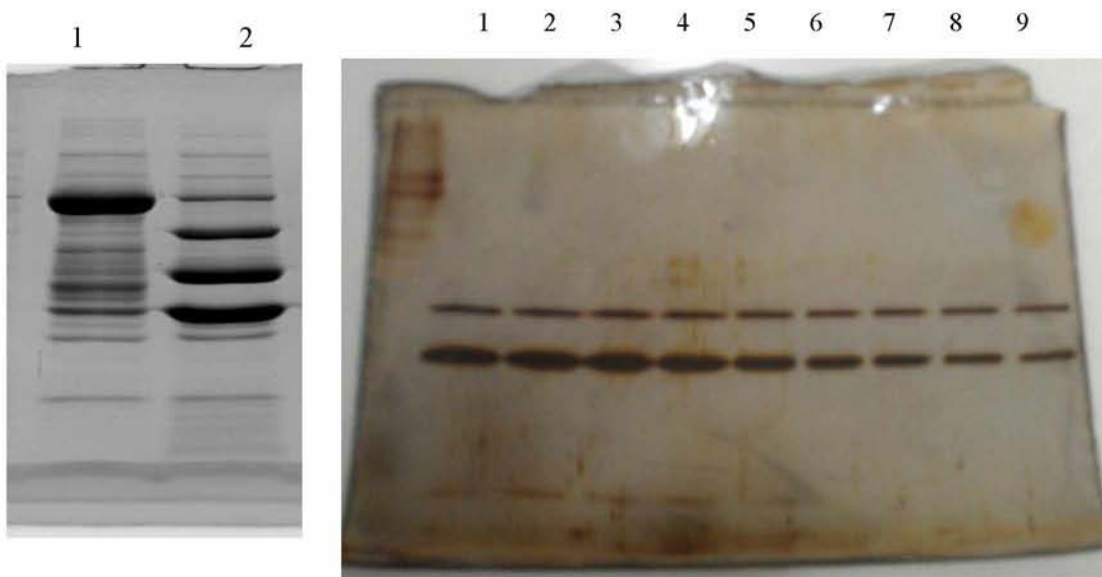
B) Χρωματογραφία συγγένειας

Τα κλάσματα 8-11 από την προηγούμενη στήλη υπέστησαν πρωτεολυτική διάσπαση του επιτόπου GST με την πρωτεάση 3C. Στη συνέχεια το πρωτεϊνικό διάλυμα υφίσταται περαιτέρω καθαρισμό με τη χρήση της στήλης HiTrapBlueHP όπου η έκλυση έγινε με 1M NaCl. Τα κλάσματα 1-3 του

χρωματογραφήματος αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του υπερδιηθήματος οι οποίες δεν προσδέθηκαν στη στήλη, το κλάσμα 4 αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες οι οποίες απομακρύνθηκαν από τη στήλη κατά τη διάρκεια της έκλυσης της στήλης. Τέλος τα κλάσματα 5-20 αντιστοιχούν στο στάδιο της έκλυσης (Εικόνα 6.4).



Εικόνα 6.4: Χρωματογράφημα στήλης HiTrapBlueHP. Με ροζ διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, με μπλε γραμμή η τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, με πράσινη γραμμή η συγκέντρωση ου διαλύματος B ενώ με καφέ η αγωγιμότητα του ρυθμιστικού διαλύματος.

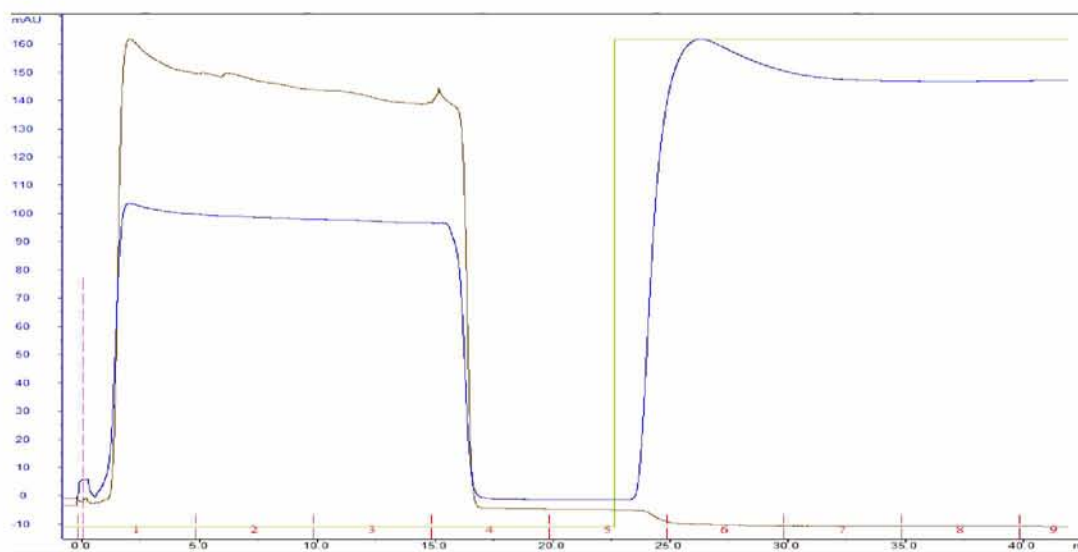


Εικόνα 6.5: Ηλεκτροφόρηση γέλης δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, στο δεύτερο βήμα της απομόνωσης της γ -PhK με την HiTrapBlueHP. Στην εικόνα αριστερά στη διαδρομή 1 εμφανίζεται το σύνολο του εκλούσματος που συλλέχθηκε από τη στήλη την ProtinoGST/4B, ενώ στη διαδρομή 2 το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά την υδρολυτική διάσπαση του επιτόπου, το οποίο εισήχθη στην στήλη HiTrapBlueHP. Στην εικόνα δεξιά εμφανίζονται σε όλες τις διαδρομές τα κλάσματα 6-16 που εκλούσθηκαν από τη στήλη HiTrapBlueHP.

Γ) Χρωματογραφία συγγένειας

Τα κλάσματα 6-16 του εκλούσματος της στήλης HiTrapBlueHP συλλέχθηκαν και ακολούθησε περαιτέρω χρωματογραφικός καθαρισμός με τη στήλη Protino GST/4B. Τα κλάσματα 1-3 του χρωματογραφήματος

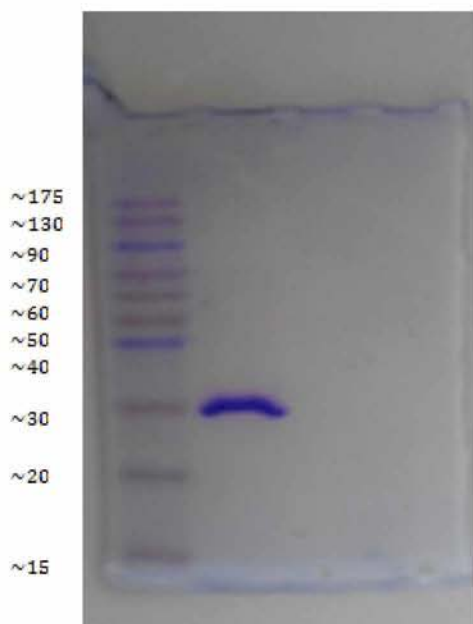
αντιστοιχούν στο υπερδιήθημα το οποίο συλλέχθηκε καθώς περιείχε την γ -PhK, το κλάσμα 4 αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες οι οποίες απομακρύνθηκαν από τη στήλη κατά τη διάρκεια της έκλυσης της στήλης. Τέλος τα κλάσματα 6-9 αντιστοιχούν στο στάδιο της έκλυσης (Εικόνα 6.6).



Εικόνα 6.6: Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα από τη στήλη ProtinoGST/4B όπου η γ -Phk διέρχεται από την στήλη και δεσμεύεται η πρωτεάση 3C. Με ροζ διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, με μπλε γραμμή η τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm, με πράσινη γραμμή η συγκέντρωση του διαλύματος B ενώ με καφέ η αγωγιμότητα του ρυθμιστικού διαλύματος.

Μετά το τέλος του χρωματογραφικού καθαρισμού η πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης ninaspin 4, με ανώτατο όριο μοριακού μεγέθους (cut off) 10.000 Da σε τελικό όγκο 1 mL. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης

προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford και ήταν 0,72 mg/mL. Η συνολική απόδοση της απομόνωσης ήταν 0,36 mg πρωτεΐνης/L καλλιέργειας.



Εικόνα 6.7: Ηλεκτροφόρηση γέλης της τελικού δείγματος της γ -PhK μετά το τέλος της απομόνωσης και της συμπύκνωσης του δείγματος.

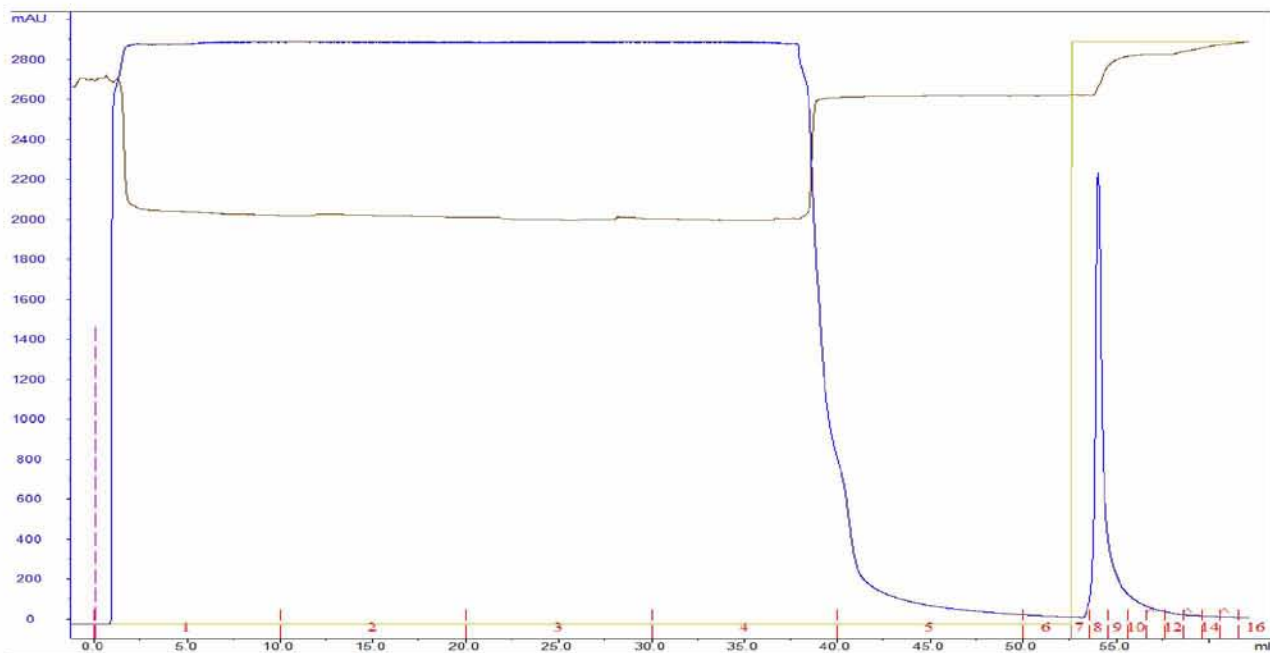
6.3 Απομόνωση ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (hIGP)

Η ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπερεκφράστηκε σε βακτηρια-

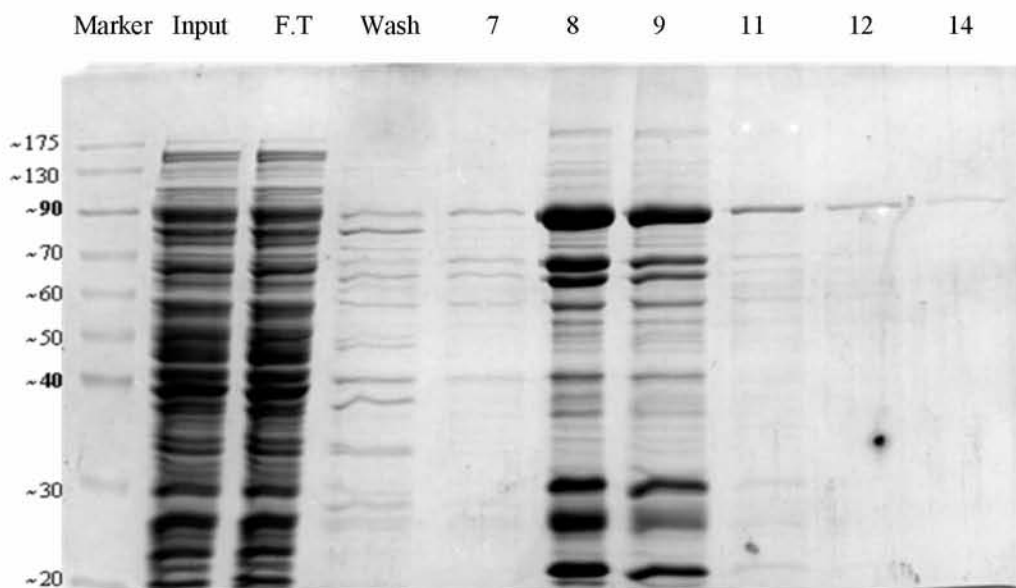
κά στελέχη και απομονώθηκε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.7. Η απομόνωση έγινε με χρωματογραφικές μεθόδους και σε κάθε στάδιο της απομόνωσης ελέγχθηκε η καθαρότητα πρωτεΐνης.

A) Χρωματογραφία συγγένειας

Τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, ακολουθεί χρωματογραφικός καθαρισμός με τη στήλη HisTrapHP που φέρει ως προσδέτη ακινητοποιημένα σφαιρίδια Ni^{+2} σεφαρόζης. Τα κλάσματα 1-4 του χρωματογραφήματος αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του υπερδιηθήματος οι οποίες δεν προσδέθηκαν στη στήλη, τα κλάσματα 5-6 αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες οι οποίες απομακρύνθηκαν από τη στήλη κατά τη διάρκεια της έκλυσης (wash) της στήλης. Τέλος τα κλάσματα 7-16 αντιστοιχούν στο στάδιο της έκλυσης της πρωτεΐνης (Εικόνα 6.8).



Εικόνα 6.8: Χρωματογράφημα στήλης HisTrapHP. Με ροζ διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, με μπλε γραμμή η τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, με πράσινη γραμμή η συγκέντρωση του διαλύματος B ενώ με καφέ η αγωγιμότητα του ρυθμιστικού διαλύματος.

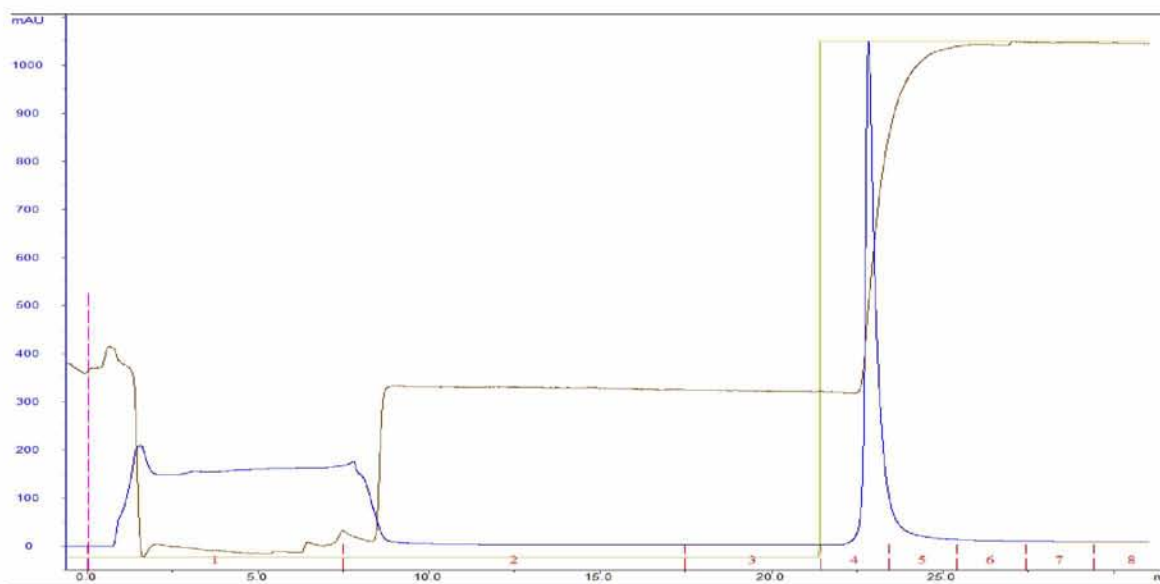


Εικόνα 6.9: Ηλεκτροφόρηση γέλης δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, στο πρώτο βήμα της απομόνωσης της hIGP με την HisTrapHP. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το σύνολο των πρωτεϊνών μετά την λύση των βακτηριακών κυττάρων το οποίο εισήχθη στη στήλη (Input). Στη δεύτερη, το σύνολο του πρωτεϊνικού διαλύματος που δεν δεσμεύθηκε στη στήλη (υπερδιήθημα) και αντιστοιχεί στο κλάσμα 1 (F.T), ενώ στην τρίτη το διάλυμα μετά την έκπλυση της στήλης (Wash) (κλάσμα 4) . Στις υπόλοιπες διαδρομές το έκλουσμα της στήλης και συγκεκριμένα τα κλάσματα 7-8-9-11-12-14.

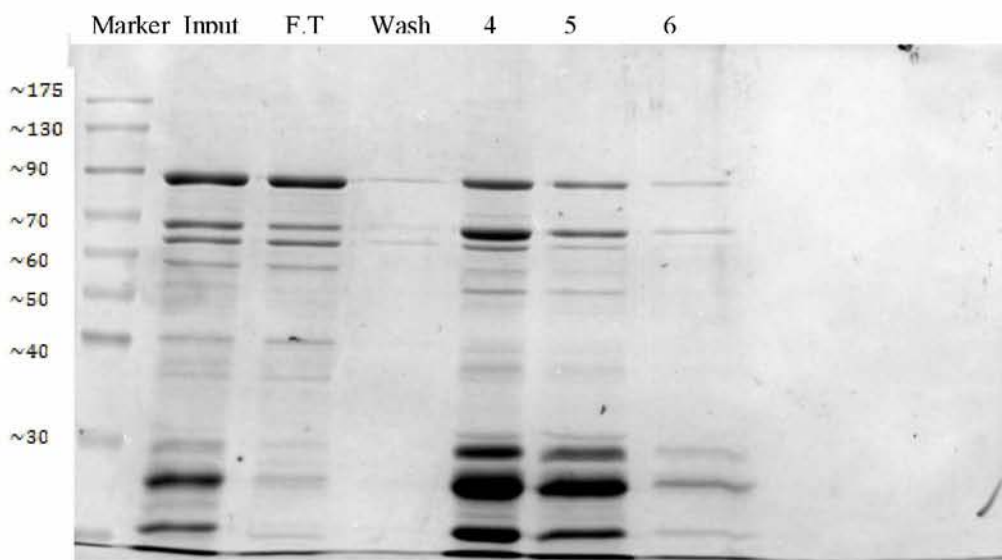
B) Χρωματογραφία συγγένειας

Τα κλάσματα 8-12 υπέστησαν πρωτεολυτική διάσπαση του επιτόπου με την πρωτεάση TEV. Στη συνέχεια το πρωτεϊνικό διάλυμα υφίσταται περαιτέρω καθαρισμό με τη χρήση της στήλης HisTrapHP όπου συλλέχθηκε το υπερδιήθημα. Το κλάσμα 1 του χρωματογραφήματος αντιστοιχεί στις πρω-

τεΐνες του υπερδιηθήματος, τα κλάσματα 2-3 αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες οι οποίες απομακρύνθηκαν από τη στήλη κατά τη διάρκεια της έκλυσης της στήλης. Τέλος τα κλάσματα 4-8 αντιστοιχούν στο στάδιο της έκλυσης όπου έγινε και η έκλυση της υπό μελέτη πρωτεΐνης (Εικόνα 6.10).



Εικόνα 6.10: Χρωματογράφημα στήλης HisTrapHP. Με ροζ διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, με μπλε γραμμή η τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, με πράσινη γραμμή η συγκέντρωση του διαλύματος B ενώ με καφέ η αγωγιμότητα του ρυθμιστικού διαλύματος.

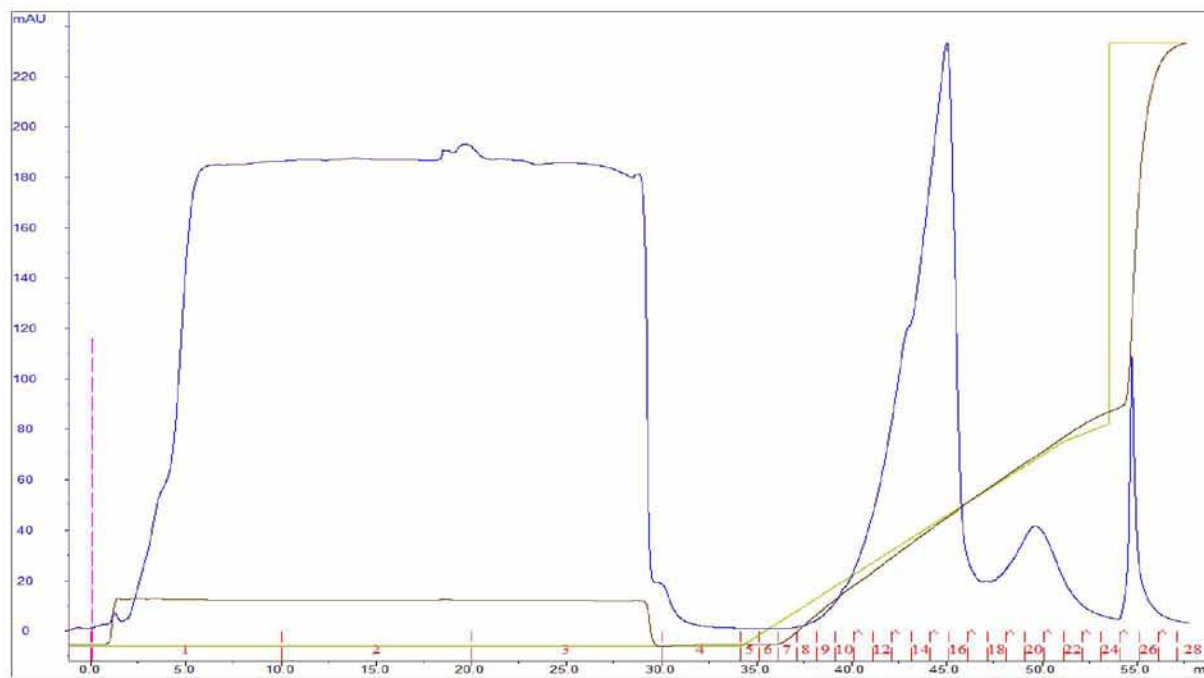


Εικόνα 6.11: Ηλεκτροφόρηση γέλης δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, στο δεύτερο βήμα της απομόνωσης της hIGP με την HisTrapHP. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά την πρωτεολυτική διάσπαση του επιτόπου (6*His) το οποίο εισήχθη στη στήλη (Input). Στη δεύτερη, το σύνολο του πρωτεϊνικού διαλύματος που δεν δεσμεύθηκε στη στήλη (υπερδιήθημα) το οποίο αντιστοιχεί στο κλάσμα 1 (F.T) και είναι το κλάσμα το οποίο συλλέχθηκε καθώς περιείχε την hIGP, ενώ στην τρίτη το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά την έκλυση της στήλης (Wash) (κλάσμα 2). Στις υπόλοιπες διαδρομές το έκλουσμα της στήλης και συγκεκριμένα τα κλάσματα 4-5-6

Γ) Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

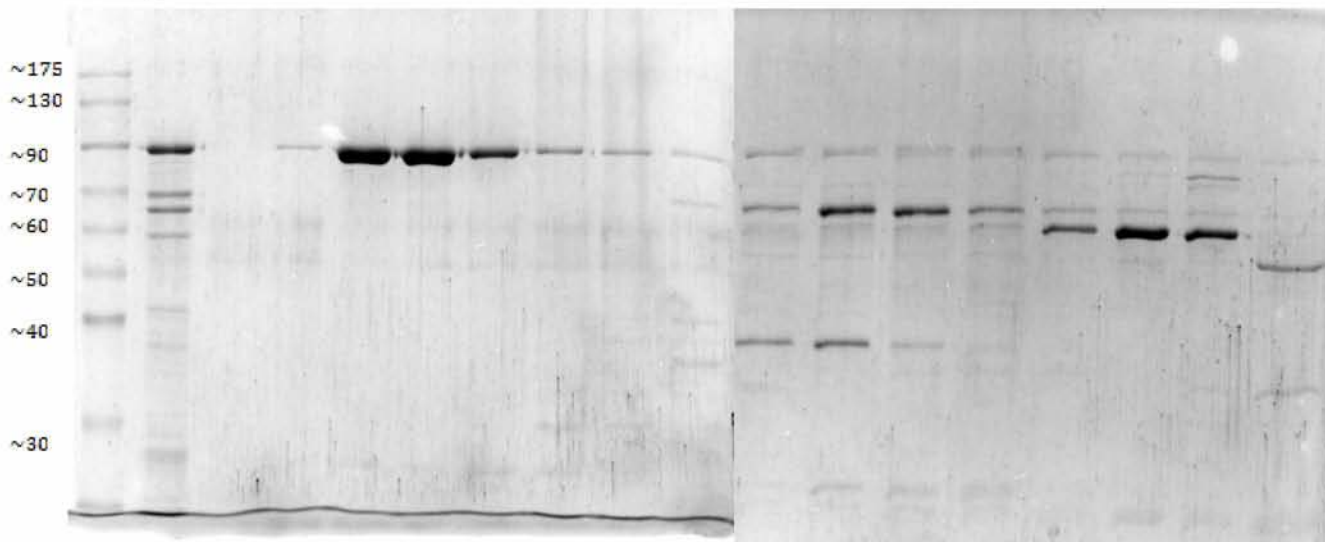
Η διαδικασία της απομόνωσης, συνεχίστηκε με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Resource Q) όπου ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το φορτίο τους. Τα κλάσματα 1-3 του χρωματογραφήματος αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του υπερδιηθήματος, τα κλάσμα 4 αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες οι οποίες απομακρύνθηκαν από τη στήλη κατά τη διάρκεια της έκλυσης της στή-

λης. Τα κλάσματα 4-24 αντιστοιχούν στο πρώτο στάδιο της έκλυσης όπου η έκλυση έγινε με βαθμίδωση στη συγκέντρωση του διαλύματος B από 0-40%. Η συγκέντρωση του παράγοντα έκλυσης, αυξανόταν 2% σε κάθε κλάσμα που συλλέχθηκε. Τα κλάσματα 24-28 αντιστοιχούν στο δεύτερο στάδιο της έκλυσης όπου η έκλυση πραγματοποιήθηκε με 100% του διαλύματος B (Εικόνα 6.12).



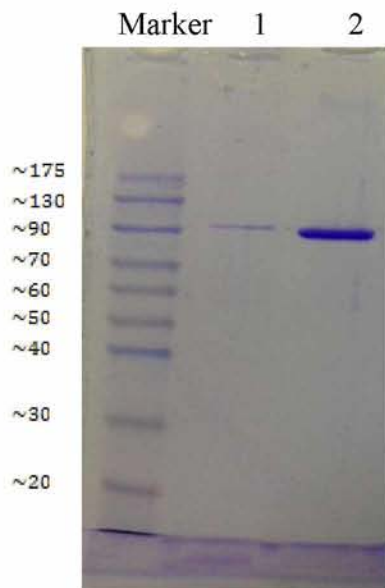
Εικόνα 6.12: Χρωματογράφημα στήλης Resource Q. Με ροζ διακεκομμένη γραμμή απεικονίζεται η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, με μπλε γραμμή η τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, με πράσινη γραμμή η συγκέντρωση του διαλύματος B ενώ με καφέ η αγωγιμότητα του ρυθμιστικού διαλύματος.

Marker Input 9 10 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 25 26 27



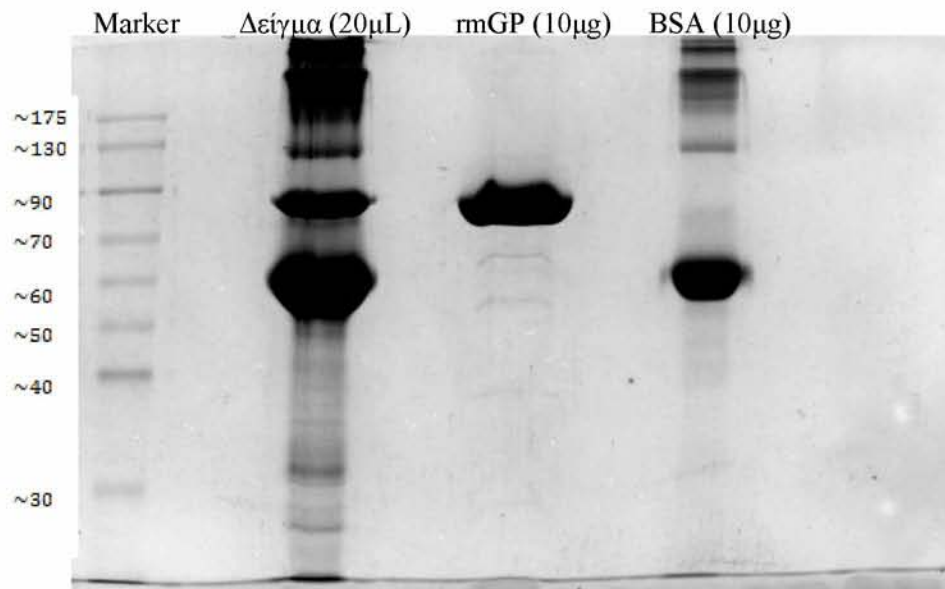
Εικόνα 6.13: Ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμιδίου δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, στο τελευταίο βήμα της απομόνωσης της hIGP με την Resource Q. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το υπερδιήθημα που συλλέχθηκε από το προηγούμενο βήμα και εισήχθη στη στήλη (Input). Στις επόμενες διαδρομές τα κλάσματα 9-17 που αντιστοιχούν και στην πρώτη κορυφή του χρωματογραφήματος, ακολουθούν τα κλάσματα 18-22 που αντιστοιχούν στη δεύτερη κορυφή του χρωματογραφήματος στο πρώτο στάδιο της έκλουσης. Τα κλάσματα 25-27 αντιστοιχούν στην τελευταία κορυφή του χρωματογραφήματος στο δεύτερο στάδιο της έκλουσης.

Συλλέχθηκαν τα κλάσματα της πρώτης κορυφής του χρωματογραφήματος (10-16) και η πρωτεΐνη συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης nivaspin-4, με ανώτατο όριο μοριακού μεγέθους (cut off) 30.000 Da σε τελικό όγκο 1.5 mL. Ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός με μέτρηση της απορρόφησης του πρωτεϊνικού διαλύματος σε μήκος κύματος 280 nm, γνωρίζοντας ότι ο συντελεστής απορρόφησης για την hIGP είναι $1,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Velick and Wicks 1951). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 0,32 mg/mL ενώ η απόδοση της απομόνωσης ήταν 0,16 mg/L καλλιέργειας.



Εικόνα 6.14: Δείγμα της hIGP μετά τον χρωματογραφικό καθαρισμό. Στη διαδρομή 1 εμφανίζεται το δείγμα πριν τη συμπύκνωση, ενώ στη διαδρομή 2 το δείγμα μετά τη συμπύκνωση.

Μετά την χρωματογραφικό καθαρισμό της hIGPb ακολούθησε η αντίδραση φωσφορυλίωσης για την μετατροπή του ενζύμου στην ενεργό μορφή hIGPa. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 5.8. Μετά την αντίδραση φωσφορυλίωσης ακολούθησε διαπίδυση για αλλαγή του διαλύματος της πρωτεΐνης σε μεμβράνες διαπίδυσης με ανώτατο όριο μοριακού βάρους (cut off) 10000 Da έναντι διαλύματος 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 mM DTT, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl σε θερμοκρασία 4°C για 16 h. Η ποσοτικοποίηση της hIGPa στο διάλυμα έγινε με προσδιορισμό της συγκέντρωσης μέσω ανάλυσης της εικόνας γέλης πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα IMAGEJ (Girish and Vijayalakshmi 2004). Το πρόγραμμα αυτό αναλύει και συσχετίζει την ένταση της μπάντας πρωτεΐνης με τη συγκέντρωση της χρησιμοποιώντας ως πρότυπα μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου (0,5 mg/mL) αλλά και BSA (0,5 mg/mL).



Εικόνα 6.15: Γέλη πολυακρυλαμίδης για την ποσοτικοποίηση του υπό μελέτη δείγματος με το πρόγραμμα IMAGEJ

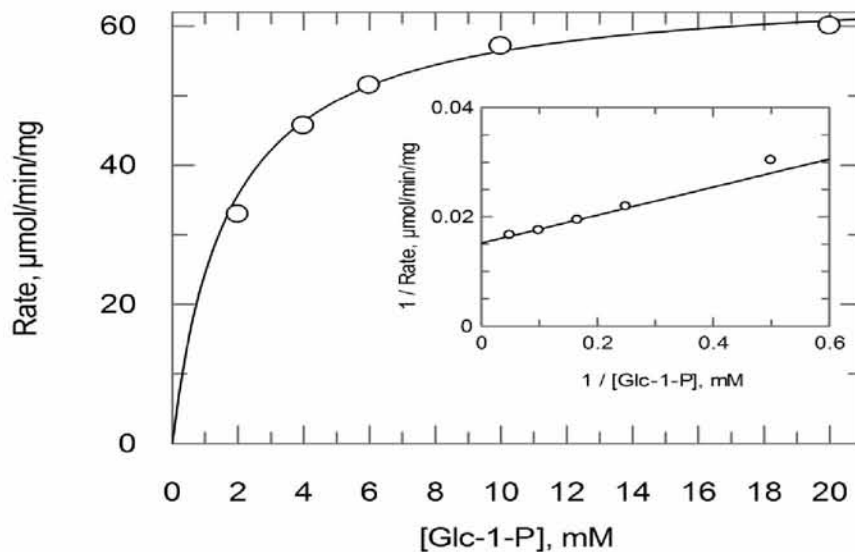
B. Αποτελέσματα κινητικών μελετών

6.4 Κινητική μελέτη μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η κινητική μελέτη είχε ως σκοπό τον προσδιορισμό των σταθερών K_m και V_{max} του ενζύμου. Ο προσδιορισμός της δραστηκότητας της gmGPb και gmGPa στην κατεύθυνση της σύνθεσης του γλυκογόνου καθώς και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις περιγράφονται στην παράγραφο 5.11.4 Σε όλες τις αντιδράσεις ο προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων έγινε με την μέθοδο του ασκορβικού οξέος όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.11.5. Η πειραματική διαδικασία ήταν η ίδια στον προσδιορισμό της ειδικής δραστη-

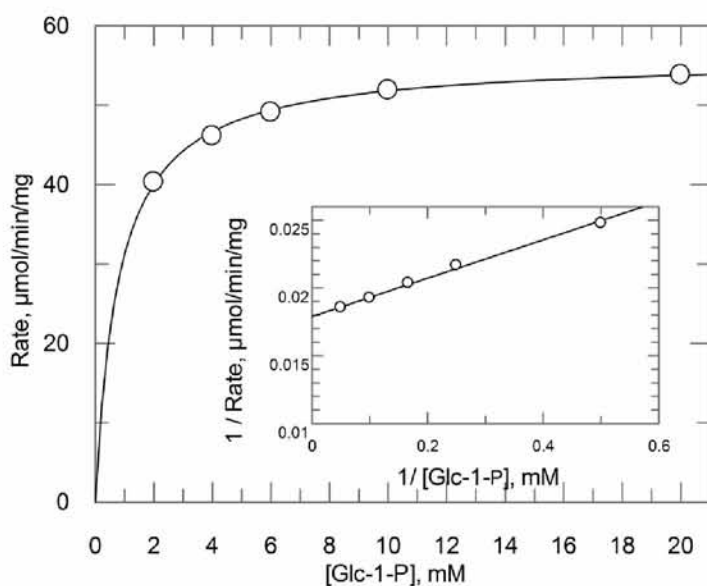
κότητας της gmGPb και gmGPa με τη διαφορά ότι τα κινητικά πειράματα της gmGPb έγιναν παρουσία του αλλοστερικού τροποποιητή AMP. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit (Leatherbarrow 2007).

Οι κινητικές παράμετροι της gmGPb βρέθηκαν: $K_m=1,69 \pm 0,15$ mM, και $V_{max}=65,90 \pm 1,32$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Στην εικόνα 6.16 παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηκότητα, sp. activity, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (Glc-1-P).



Εικόνα 6.16: Διάγραμμα Michaelis-Menten κινητικής μελέτης της gmGPb σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος Glc-1-P (2, 4, 6, 10, 20 mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση AMP (1 mM) και γλυκογόνου (0,2% w/v). Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο ένθετο είναι το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max} .

. Οι κινητικές παράμετροι της gmGPa βρέθηκαν: $K_m=1,11\pm 0,054$ mM, και $V_{max}=76,63\pm 0,69$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Στην εικόνα 6.17 παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, sp. activity, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (Glc-1-P).

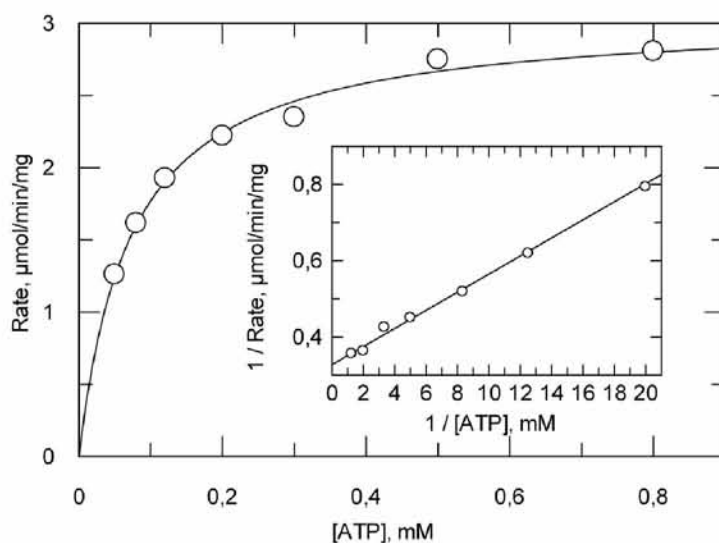


Εικόνα 6.17: Διάγραμμα Michaelis-Menten κινητικής μελέτης της gmGPa σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος Glc-1-P (2, 4, 6, 10, 20 mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο ένθετο είναι το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max}

6.5 Κινητική μελέτη γ -καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης

Η γ -καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης υποβλήθηκε σε κινητικές μελέτες με σκοπό τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.12. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της γ -PhK γίνεται έμμεσα μέσω του προσδιορισμού της δραστηριότητας της gmGPa.

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=0,0724 \pm 0,0056$ mM και $V_{max}= 3,0536 \pm 0,0622$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Στην Εικόνα 6.18 παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, μmol φωσφορικών/ $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (ATP).

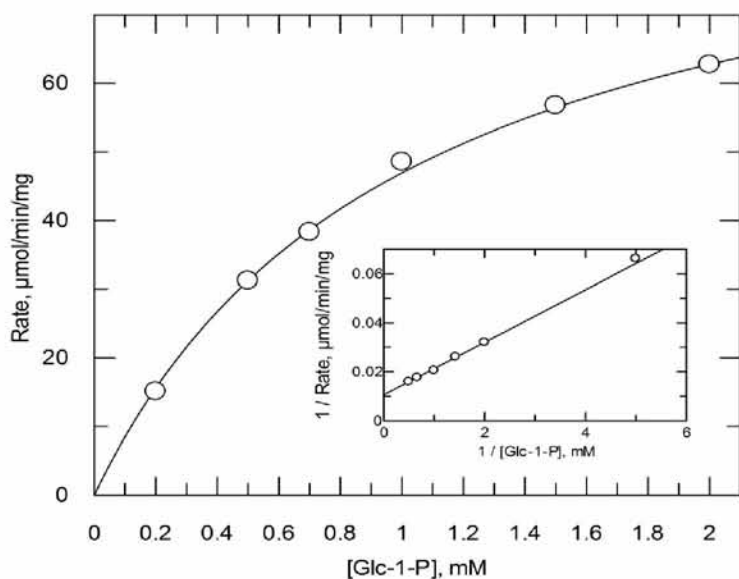


Εικόνα 6.18: Διάγραμμα Michaelis-Menten κινητικής μελέτης της γ -PhK σε διάφορες συγκεντρώσεις ATP. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο ένθετο παρουσιάζεται το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk από το οποίο υπολογίζονται οι σταθερές K_m και V_{max}

6.6 Κινητική μελέτη της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου α.

Μετά τον χρωματογραφικό καθαρισμό και την μετατροπή της hIGPb στην ενεργό μορφή GPα ακολούθησε η κινητική μελέτη του ενζύμου με σκοπό τον προσδιορισμό

των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.13. Οι κινητικές παράμετροι για την hIGPα βρέθηκαν να είναι $K_m = 1,02 \pm 0,01$ mM και $V_{max} = 94,61 \pm 0,49$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.



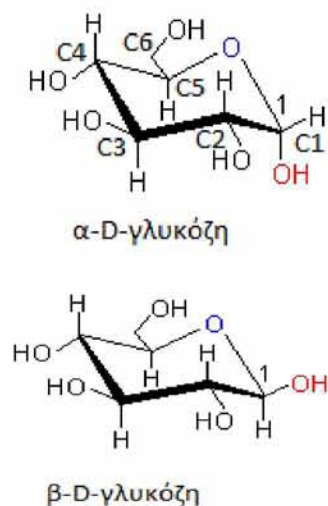
Εικόνα 6.19: Διάγραμμα Michaelis-Menten κινητικής μελέτης της hIGPα σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος Glc-1-P (0,2, 0,5, 0,7, 1, 1,5, 2 mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο ένθετο είναι το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max} .

Αποτελέσματα αξιολόγησης ανασταλτικής δράσης αναλόγων γλυκόζης στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της διαμόρφωσης T της pmGPb με την α-D-γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για το σχεδιασμό και τη σύνθεση μιας σειράς αναστολέων, αναλόγων της γλυκόζης. Η α-D-γλυκόζη είναι ένας αλλοστερικός αναστολέας τόσο της GPb όσο και της GPα που συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο όπου συναγωνίζεται τη σύνδεση του υποστρώματος και προάγει τη σταθεροποίηση του βρόχου 280s και την μετάβαση στη διαμόρφωση T.

Η σύνδεση της α-D-γλυκόζης στη GPα γίνεται μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ κάθε περιφερειακής υδροξυλομάδας της και αμινοξικών καταλοίπων του καταλυτικού κέντρου. Συνολικά αναπτύσσονται 16 δεσμοί υδρογόνου και 58 van der Waals αλληλεπιδράσεις (3 μεταξύ μη πολικών, 12 μεταξύ πολικών και 43 μεταξύ πολικών και μη πολικών ομάδων). Η μελέτη του συμπλόκου GPb-α-D-γλυκόζης (Martin et al. 1991) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπήρχε η δυνατότητα για τροποποιήσεις της γλυκοκυρανόζης με εξαίρεση τη θέση του ανωμερικού ατόμου C1 (Εικόνα 6.20). Ένα σημαντικό δομικό στοιχείο του καταλυτικού κέντρου είναι ο βρόχος 280s καθώς αποτελεί το σημείο εισόδου στο καταλυτικό κέντρο ελέγχοντας την πρόσβαση του υποστρώματος γλυκογόνου. Το Asp283 του βρόχου έχει προσανατολισμό προς το κατα-

λυτικό κέντρο και σχηματίζει αλληλεπιδράσεις μέσω μορίων ύδατος με το συνένζυμο PLP. Στην ανενεργή κατάσταση T της GPb ο βρόχος 280s έχει κλειστή διαμόρφωση, εμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο. Μετά από ενεργοποίηση της GPb με φωσφορυλίωση ή από την AMP ο βρόχος περιστρέφεται και υιοθετεί μια ανοιχτή διαμόρφωση επιτρέποντας την είσοδο του υποστρώματος. Έρευνες έχουν δείξει ότι ενώσεις οι οποίες σταθεροποιούν τον βρόχο 280s στην κλειστή του διαμόρφωση προάγοντας την ανενεργή κατάσταση T αποτελούν ισχυρούς αναστολείς του ενζύμου (Oikonomakos and Somsak 2008, Czako et al. 2009, Bokor et al. 2013, Nagy et al. 2013) Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληροί ένας αναστολέας ώστε να είναι ισχυρότερος αναστολέας από τη α-D-Glc είναι: (1) να παρουσιάζει την ίδια κινητική συμπεριφορά με τη γλυκόζη, (2) να συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και να αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις παρόμοιες με εκείνες της γλυκόζης, (3) να συμβάλλει στη σταθεροποίηση του βρόχου 280s που χαρακτηρίζει τη διαμόρφωση T και (4) να σχηματίζει επιπλέον δεσμούς υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεις που να συμβάλλουν στην αύξηση της ενέργειας σύνδεσης.



Εικόνα 6.20: Δομή της α-D-γλυκόζης και β-D-γλυκόζης που διαφέρουν στη θέση του υδροξυλίου του C1 ατόμου. Στη δομή της α-D-γλυκόζης παρουσιάζεται και η ονοματολογία των ατόμων άνθρακα

7. Μελέτες C5-αλογονοϋποκατεστημένων γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης

Τα ανάλογα πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της GP και έχει μελετηθεί η πρόσδεση τους στο καταλυτικό κέντρο (Gimisis 2010, Tsirkone et al. 2010). Σε μια πρόσφατη έρευνα μελετήθηκε η ανα-

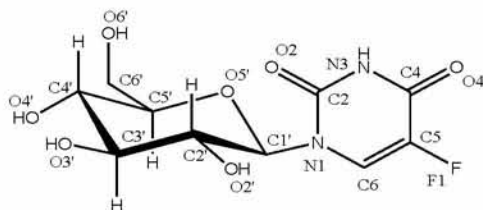
σταλτική δράση της ένωσης 1-(β-D-γλυκοπυρανόσυλ)-5-φθοροουρακίλης (GlcFU, $K_i=7,9 \mu\text{M}$) (Manta et al. 2012) αλλά και η δράση του 3-(β-D-γλυκοπυρανόσυλ)-2-υδρόξυ-5-μεθοξυγλωροβενζολίου ($K_i=39,8 \mu\text{M}$) (Alexacou et al. 2011). Η ισχυρή αναστολή που προκάλεσαν αυτές οι ενώσεις μας παρότρυνε να ερευνήσουμε το ρόλο των αλογόνων ως υποκαταστάτες. Έτσι λοιπόν συντέθηκαν στο εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας μια νέα ομάδα αναστολέων, γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης που έφεραν ως υποκατάστατες στη θέση C1 της γλυκοπυρανόζης την ουρακίλη, ενώ στη θέση C5 της ουρακίλης ένα αλογόνο.

7.1 Κινητικές μελέτες

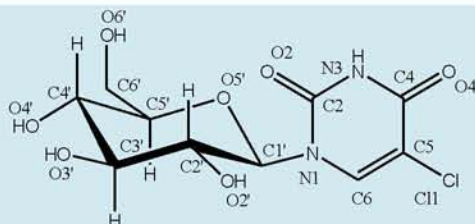
Στον πίνακα παρακάτω παρουσιάζεται η χημική δομή των ενώσεων καθώς και η σταθερά αναστολής (K_i) που προέκυψε μετά από κινητικά πειράματα στη gmGPb.

Πίνακας 7.1: Ονομασία, χημική δομή και οι τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i) των αλογονοϋποκατεστημένων γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης

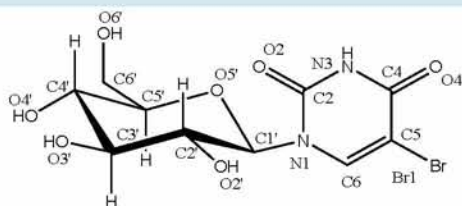
Ονομασία	Χημική δομή	K_i (μM)
GlcU		$12,39 \pm 0,94$

GlcFU

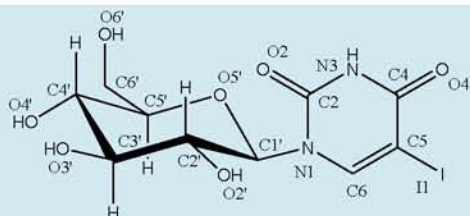
7,86 ± 0,35 (Manta et al. 2012)

GlcClU

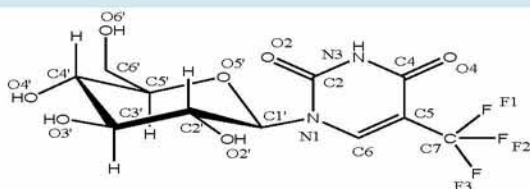
1,02 ± 0,15

GlcBrU

3,27 ± 0,44

GlcIU

1,94 ± 0.09

GlcCF₃U

17,00 ± 1,28

Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών έδειξαν ότι όλες οι ενώσεις παρουσιάζουν συναγωνιστική αναστολή με το υπόστρωμα Glc-1-P, σε σταθερή συγκέντρωση γλυκογόνου και AMP. Η ένωση **GlcU** αποτελεί την ένωση «οδηγό» καθώς δεν φέρει κάποιο αλογόνο ως υποκαταστάτη στη θέση C5 της ουρακίλης. Ό-

λες οι ενώσεις είναι ισχυροί αναστολείς του ενζύμου ενώ οι ενώσεις **GlcClU** και **GlcIU** είναι ανάμεσα στους πιο ισχυρούς αναστολείς του καταλυτικού κέντρου που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα. Όλοι οι αναστολείς εκτός από τον **GlcCF₃U** είναι πιο βιοδραστικοί από την ένωση οδηγό, **GlcU**, υποδεικνύοντας ότι η υ-

ποκατάσταση στη θέση C5 της ουρακίλης βελτίωσε την ανασταλτική δράση τους, ενώ η αύξηση στη βιοδραστικότητα για τις αλογονοϋποκατεστημένες ενώσεις ακολουθεί τη σειρά $Cl > I > Br > F$. Επιπλέον οι διαφορές στις σταθερές αναστολής των ενώσεων αυτών ($K_i = 1,02-7,86 \mu M$) υποδεικνύουν ότι τα χημικά χαρακτηριστικά των αλογόνων επηρεάζουν άμεσα τη δραστηριότητα των αναστολέων. Για να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής που προκαλούν και κυρίως να αποσαφηνιστεί η διαφορά στην ανασταλτική τους δράση, προσδιορίστηκε η δομή της mGPb σε σύμπλοκο με κάθε μια από τις πέντε ενώσεις.

7.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

7.2.1 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν μέσω διάχυσης του διαλύματος των αναστολέων σε σχηματισμένους κρυστάλλους της GPb. Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της GPb αναπτύχθηκαν σε ομάδα χώρου

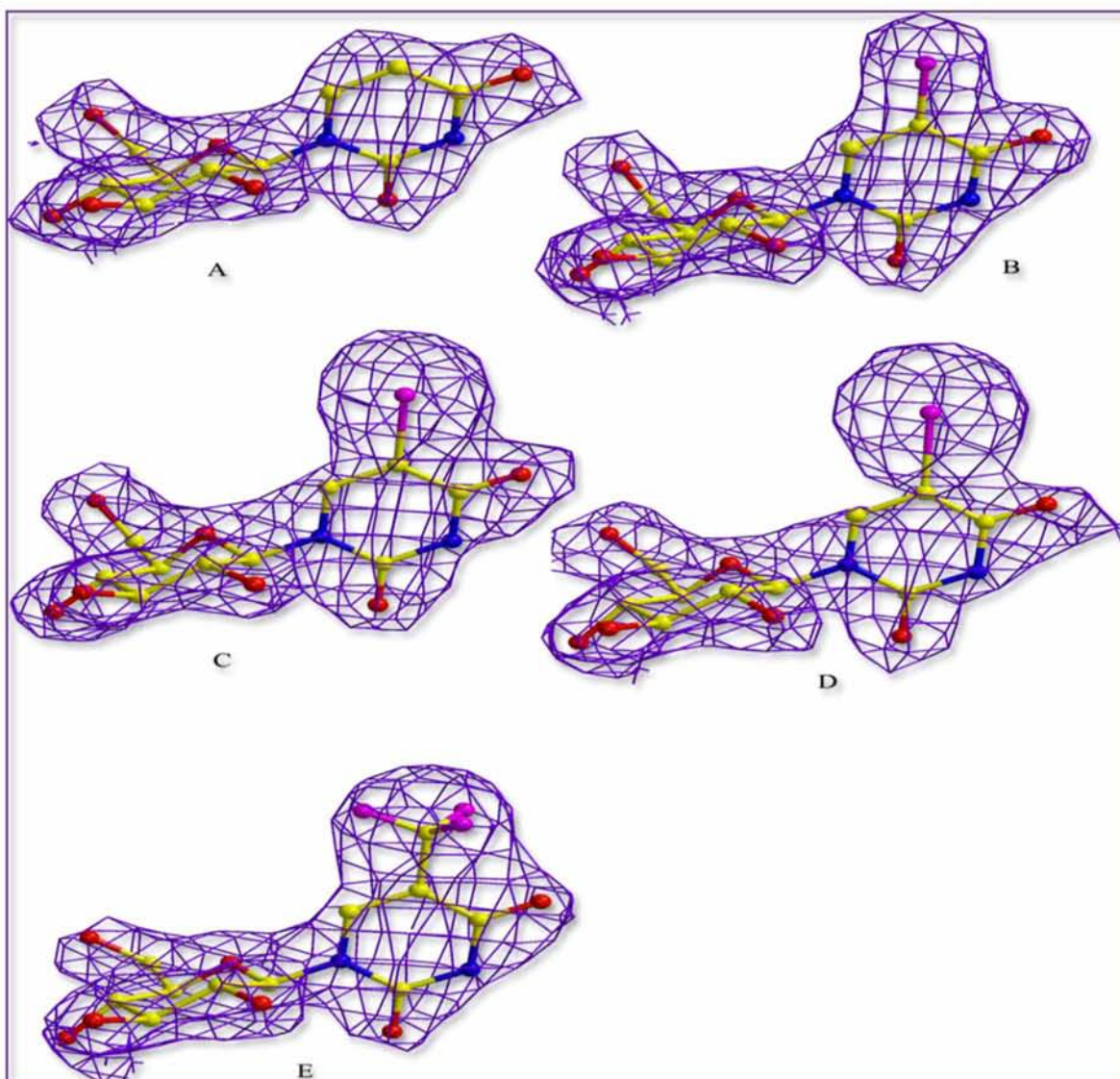
P4₃2₁2 με τη μέθοδο batch όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.10 Ακολούθησε εμπότισμός των κρυστάλλων με 10 mM διάλυμα αναστολέων (10 mM BES, 0,1 mM EDTA, 0,02% w/v NaN₃, pH 6,7, DMSO 15%v/v), για 7 h πριν την συλλογή δεδομένων σε θερμοκρασία δωματίου. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε με συμβατική πηγή ακτίνων X, με το περιθλασίμετρο Oxford Diffraction SuperNova του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, με τη χρήση του ανιχνευτή CCD 135mm, σε θερμοκρασία δωματίου. Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας έδειξαν ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου που υποδήλωνε χωρίς αμφιβολία τη σύνδεση των ενώσεων σε αυτό. Στον πίνακα 7.2 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και της βελτιστοποίησης της δομής των συμπλόκων (οι δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου).

Πίνακας 7.2: Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου GPb-αναστολέων.

Σύμπλοκο	GlcU	GlcClU	GlcBrU	GlcIU	GlcCF ₃ U
Στατιστικοί δείκτες συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων					
Ευκρίνεια (Å)	13.8 - 2.50	13.9 - 2.15	13.9 - 2.40	13.7 - 2.60	13.8 - 2.65

Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2.64 - 2.50	2.27 – 2.15	2.53 – 2.40	2.74 - 2.60	2.79 - 2.65
Μετρήσεις	267350	152300	84255	179881	100217
Μοναδικές περιθλάσεις	33377 (4896)	50243 (6774)	36619 (5255)	30028 (4250)	27634 (3613)
Πολλαπλότητα	8.0 (5.2)	3.0 (2.4)	2.3 (1.8)	6.0 (4.0)	3.6 (2.7)
R_{sym}^a	0.108 (0.478)	0.097 (0.525)	0.108 (0.513)	0.102 (0.455)	0.099 (0.429)
Πληρότητα (%)	96.87 (99.2)	94.6 (89.1)	95.0 (94.5)	98.8 (97.3)	95.6 (87.3)
$\langle I/\sigma I \rangle$	17.6 (2.5)	9.9 (2.4)	7.2 (1.3)	13.9 (2.8)	12.3 (1.9)
Στατιστικοί δείκτες βελτιστοποίησης					
R_{crist}^b	0.16 (0.22)	0.18 (0.30)	0.18 (0.30)	0.16 (0.22)	0.16 (0.21)
R_{free}^c	0.22 (0.32)	0.23 (0.36)	0.23 (0.39)	0.22 (0.34)	0.23 (0.26)
Αριθμός μορίων ύδατος	205	242	109	161	148
Απόκλιση r.m.s. από τις ιδεατές τιμές					
στο μήκος δεσμών (Å)	0.019	0.021	0.018	0.018	0.016
στις γωνίες (°)	1.787	1.900	1.7777	1.707	1.610
Μέση τιμή παράγοντα B (Å²)					
Πρωτεϊνικά άτομα	26.2	30.6	31.7	25.6	26.6
Μόρια ύδατος	25.4	32.4	22.9	23.2	22.5
Προσδέτης	16.5	20.2	23.0	16.3	26.0
PDB code	3T3D	3T3E	3T3G	3T3H	3T3I

7.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης



Εικόνα 7.1: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ των A) **GlcU**, B) **GlcCIU**, C) **GlcBrU**, D) **GlcIU**, E) **GlcF₃U** στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δομές των μορίων προσαρμόστηκαν στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ με σ 1.0 πριν από την διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Υπέρθεση της δομής του συμπλόκου rmGPb- **GlcCIU** στο σύμπλοκο hIGPb- **GlcNAc** (Rath et al. 2000) έδειξε πως δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις δομές των δυο συμπλόκων (r.m.s.d. 1,09 Å για τα άτομα όλων των αμινοξέων, και 0,95 Å για τα άτομα των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου). Συνεπώς, αυτοί οι αναστολείς να

μπορούν να θεωρηθούν και εν δυνάμει αναστολείς της ηπατικής ισομορφής. Για να μπορέσουν να εξηγηθούν οι διαφορές στην ανασταλτική ισχύ των αναστολέων μελετήθηκαν τα στοιχεία σύνδεσης (δεσμοί υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις van der Waals). (Πίνακας 7.2)

Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων έδειξε ότι αυτές που σχηματίζονται από τη γλυκοπυρανόζη είναι ίδιες με αυτές που σχηματίζει η γλυκόζη με την gmGPb (Martin et al. 1990). Τα τμήματα της ουρακίλης σχηματίζουν ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων με αμινοξικά κατάλοιπα (Εικόνα 7.2, Πίνακας 7.2), ανάλογο με εκείνο που έχει παρατηρη-

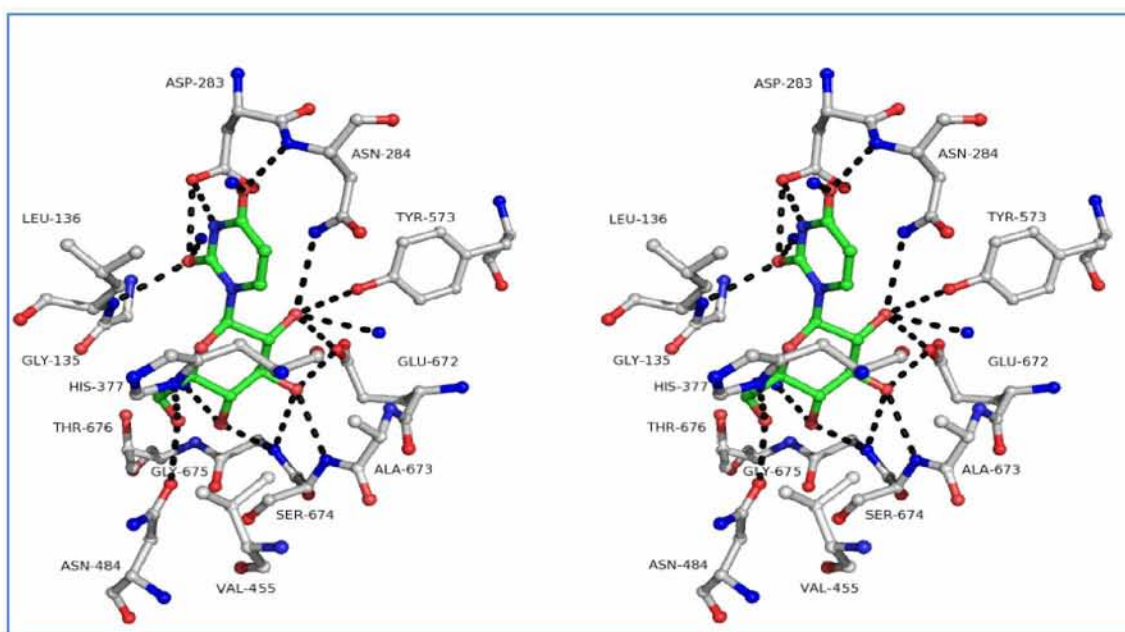
θεί και σε άλλα ανάλογα πυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης (Oikonomakos 2002, Tsirkone et al. 2010) συμπεριλαμβανομένης και της ένωσης **GlcFU** (Manta et al. 2012). Η πρόσδεση των αναστολέων επιτυγχάνεται χωρίς να σχηματίζουν τα αλογόνα απευθείας δεσμό υδρογόνου με τα αμινοξέα της gmGPb (Εικόνα 7.2, Πίνακας 7.2).

Πίνακας 7.2: Εν δυνάμει δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ατόμων των αναστολέων και των ατόμων των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου στον κρύσταλλο.

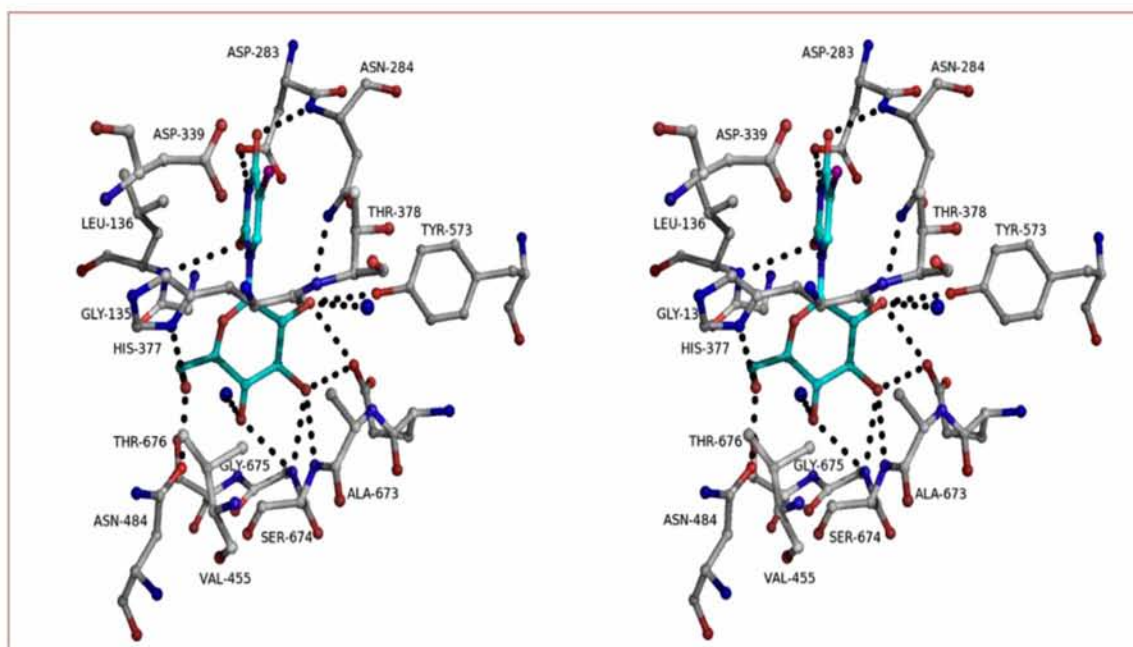
Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)					
		GlcU	GlcFU	GlcCIU	GlcBrU	GlcIU	GlcCF ₃ U
O2'	Asn284 ND2	3.2	3.3	3.3	3.1	3.1	-
	Tyr573 OH	3.1	3.0	3.1	3.2	3.2	3.3
	Glu672 OE1	3.1	3.0	3.1	3.2	3.0	3.1
	Μόριο ύδατος	3.1	2.8	2.9	-	3.1	-
O3'	Glu672 OE1	2.8	2.6	2.8	2.7	2.7	2.7
	Ala673 N	-	3.2	3.1	-	3.2	3.3
	Ser674 N	2.9	3.0	2.9	2.9	2.9	2.9
	Gly675 N	3.1	3.1	3.0	3.1	3.0	3.1
O4'	Gly675 N	2.7	2.7	2.8	2.8	2.8	2.8
	Μόριο ύδατος	2.7	2.7	2.6	2.6	2.7	2.6
O6'	His377 ND1	2.8	2.8	2.6	2.6	2.8	2.9
	Asn484 OD1	2.7	2.7	2.9	2.9	2.6	2.5
O2	Gly135 N	3.2	3.2	3.2	3.1	3.2	3.3
	Leu136 N	3.0	3.0	2.9	3.1	3.2	3.2

	Asp283 OD1	3.3	3.3	-	3.2	-	3.2
	Μόριο ύδατος	2.9	-	2.7	-	-	-
N3	Asp283 OD1	3.1	2.6	2.8	2.5	2.7	2.7
O4	Asn284 N	3.0	3.0	2.9	2.9	2.8	2.9
	Μόριο ύδατος	2.7	-	3.3	-	-	-
Σύνολο		18	17	18	15	16	15

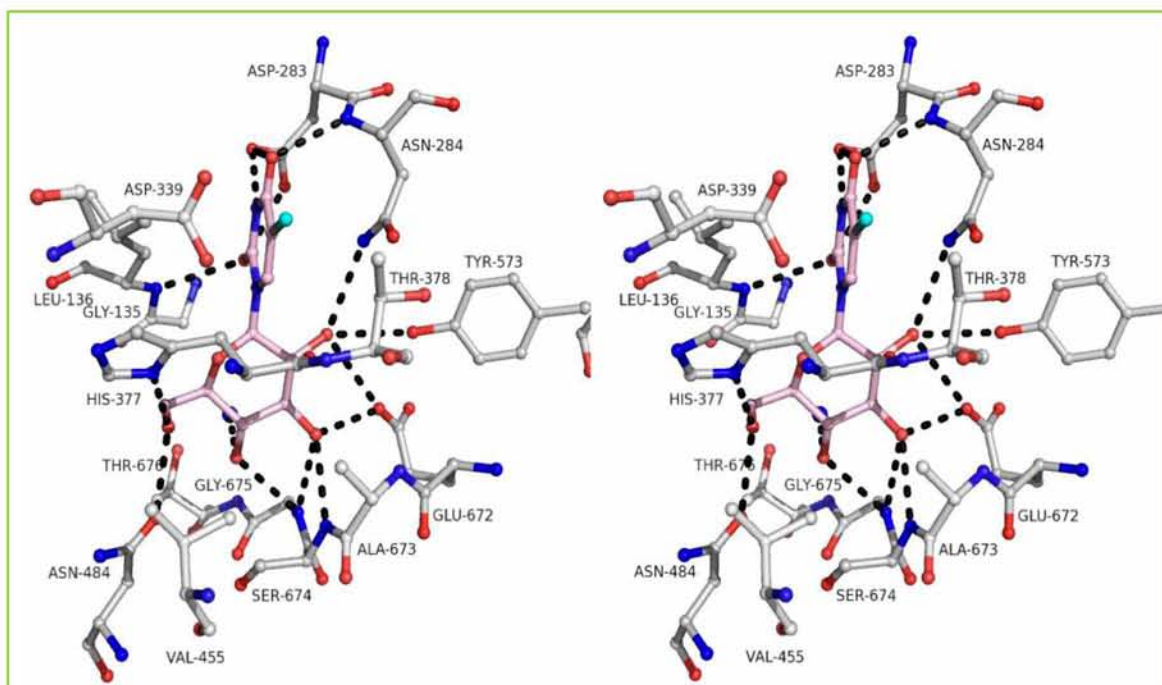
A



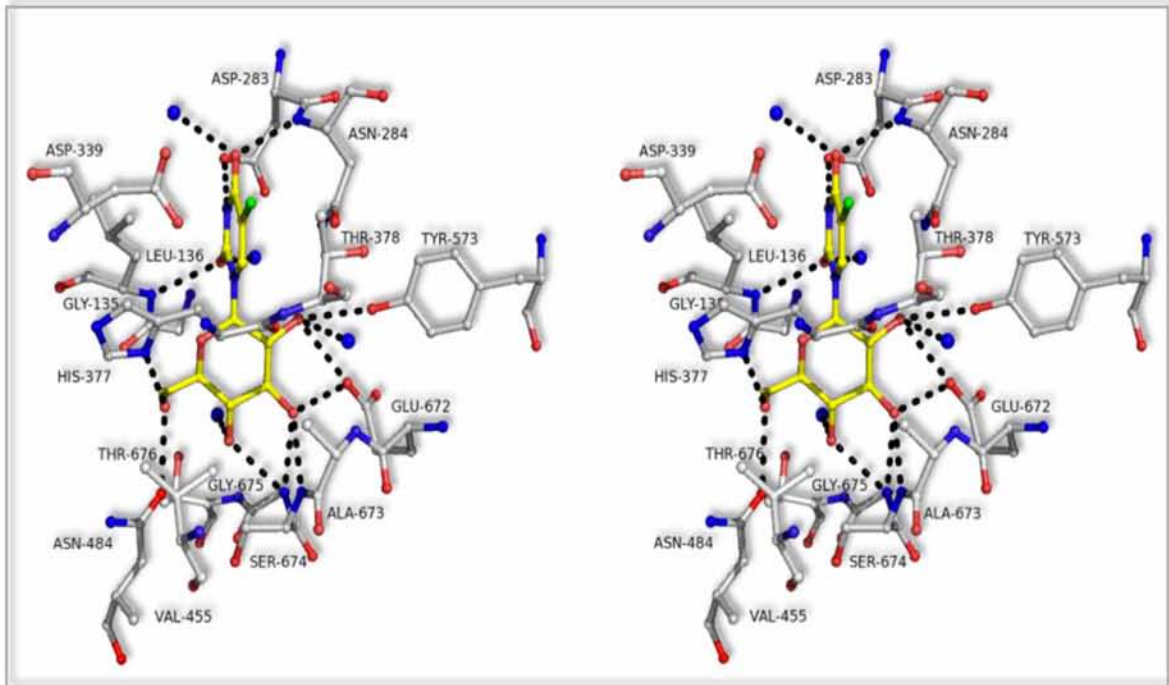
B



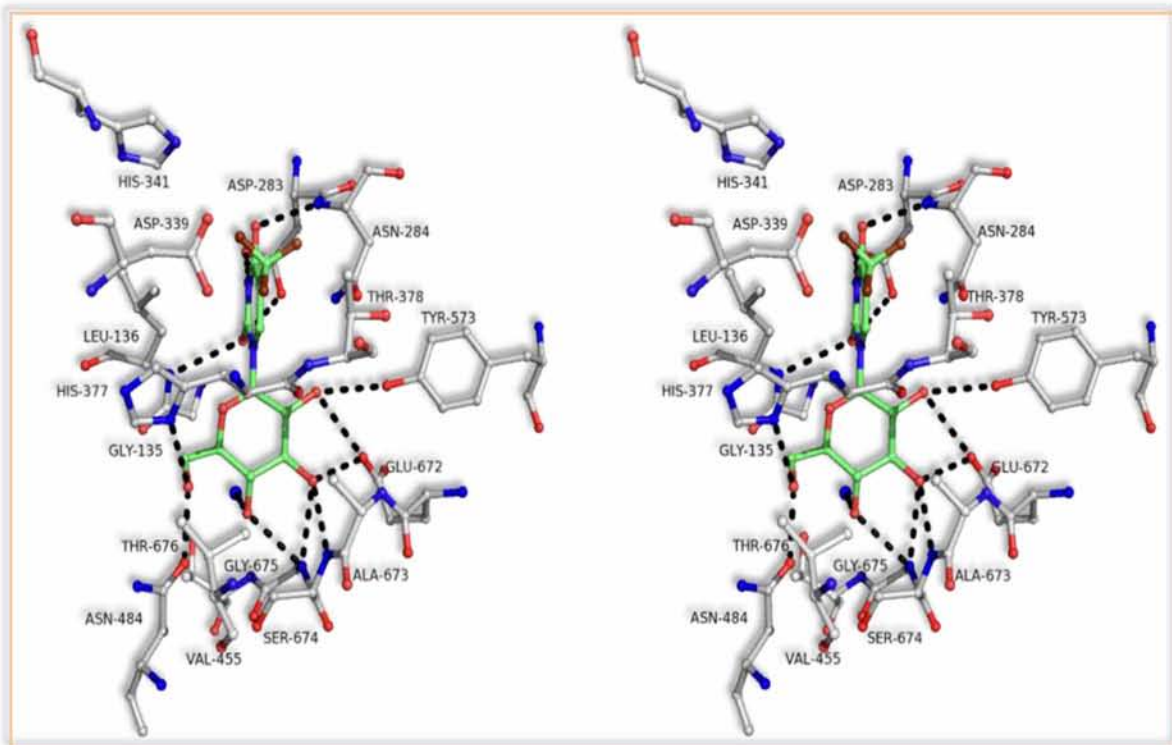
Γ



Δ



E



Εικόνα 7.2: Στερεοσκοπική απεικόνιση της σύνδεσης των αναστολέων Α) **GlcU**, Β) **GlcIU**, Γ) **GlcBrU**, Δ) **GlcCIU**, Ε) **GlcCF₃U** στην mGPb.

Οι μικρές διαφορές στον αριθμό των δεσμών υδρογόνου (Πίνακας 7.2) που σχηματίζουν κατά την πρόσδεση τους οι αναστολείς δεν είναι αρκετές ώστε να εξηγήσουν τις διαφορές τους στην ανασταλτική ισχύ. Από τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων van der Waals των αναστολέων με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου προέκυψε ότι τα αλογόνα των **GlcFU** (Manta et al. 2012), **GlcCIU**, **GlcBrU** και **GlcIU** συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα άτομα O, CB του αμινοξέος His377, OD1 του Asp339, OD1 της Asn και με τα άτομα CB και CG2 της Thr378 (Πίνακας 7.3). Στην περίπτωση της ένωσης **GlcCF₃U** τα τρία φθόρια συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα αμινο-

ξέα Leu136 (CD1), Asn284 (OD1, CA και CG), Asp339 (CG, OD1 και OD2), His377 (CA, CB,C και O), Thr378 (CB, CG2), His 341 (CE1, NE2) και με την Ala383 (CB) (Πίνακας 7.3, Εικόνα 7.2). Συνεπώς οι υποκαταστάτες Cl και Br συμμετέχουν σε συνολικά έξι αλληλεπιδράσεις van der Waals, οι υποκαταστάτες I και F σε 5 ενώ ο τρίφθορο υποκαταστάτης της ένωσης **GlcCF₃U** συνολικά σε 19. Παρόλο που η ένωση **GlcF₃U** σχηματίζει τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις είναι η λιγότερη βιοδραστική σε σύγκριση με τους υπόλοιπους τέσσερις αλλά και σε σύγκριση με την πρόδρομη ένωση **GlcU** που δεν φέρει αλογόνο ως υποκαταστάτη.

Πίνακας 7.3: Εν δυνάμει αλληλεπιδράσεις van der Waals των αλογόνων με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της mGPb στον κρύσταλλο.

Άτομο αναστολέα	GlcCIU	GlcIU	GlcBrU	GlcFU	GlcCF ₃ U
X (Cl, Br, I)	His377 (CB, O)	Asp339 (CG, OD1,OD2)	His377 (O, CB)	His377 (CB,O)	
	Asp339 (OD1)	Thr378 (CB, CG2)	Asp339 (OD1)	Thr378 (CB,CG2)	
	Asn284 (OD1)		Asn284 (OD1)	Asn284 (OD1)	
	Thr378 (CB,CG2)		Thr378 (CB,CG2)		
FAV (F)					Asn284 (CG,OD1,CA) Thr378

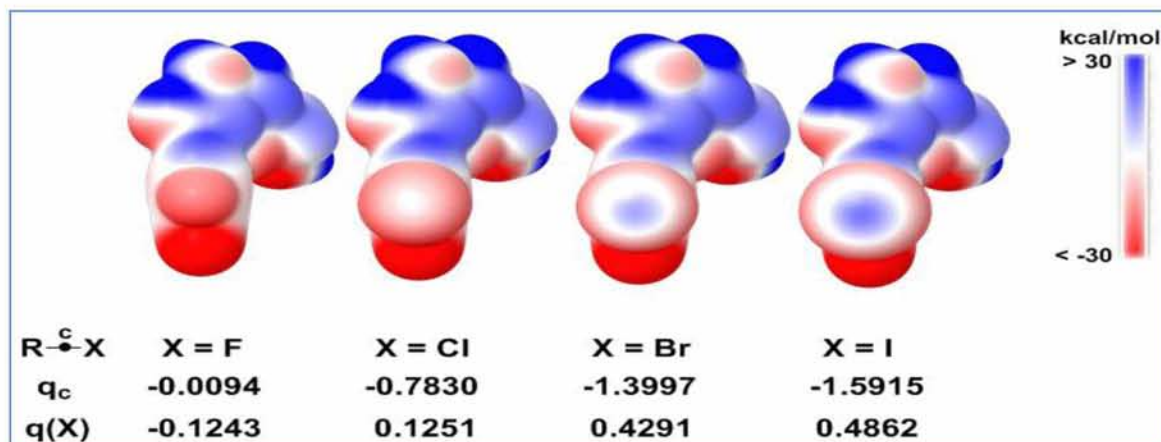
					(CB,CG2), Ala383 (CB)
FAW (F)					Leu 136(CD1) Asp339(CG, OD2) His341(CE1, NE2)
FAU (F)					His377(CA, CB, C, O) Asp339(CG, OD1) Thr378(CB, CG2)
Σύνολο	6	5	6	5	19

Όπως είναι προφανές οι διαφορές στην βιοδραστικότητα των αναστολέων δεν μπορούσαν να εξηγηθούν με βάση τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων τους με την πρωτεΐνη. Έτσι το ενδιαφέρον μας στράφηκε στις ηλεκτροστατικές επιδράσεις των αλογόνων στο ενεργό κέντρο της gmGPb, μέσω του φαινομένου «σ-hole» (Clark et al. 2007, Baumli et al. 2010, Hernandez et al. 2010). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μονήρη ηλεκτρόνια στο άτομο ενός αλογόνου X σχηματίζουν μια περιοχή αρνητικού ηλεκτροστατικού δυναμικού γύρω από μια κεντρική περιοχή του δεσμού R-X, αφήνοντας μια θετικά φορτισμένη περιοχή «σ-hole» στην εξωτερική επιφάνεια του αλογόνου X. Η περιοχή σ-hole των ατόμων Cl, Br, I μπορεί να αλληλεπιδράσει επιλεκτικά με αρνητικά

φορτισμένες περιοχές άλλων μορίων δημιουργώντας έτσι έναν δεσμό αλογόνου, μια μη-ομοιοπολική αλληλεπίδραση ανάμεσα σε ένα άτομο αλογόνου (οξύ Lewis) και μια βάση Lewis. Μελέτες έχουν προσδιορίσει τους γεωμετρικούς περιορισμούς και την ενέργεια που συνεισφέρουν αυτές οι αλληλεπιδράσεις σε 5-180 kJ mol⁻¹. Το F δεν μπορεί να σχηματίσει δεσμό αλογόνου λόγω της υψηλής ηλεκτραρνητικότητας του (Auffinger et al. 2004, Clark et al. 2007). Για να διερευνηθούν με μεγαλύτερη ακρίβεια οι επιδράσεις αυτές, ακολούθησαν μελέτες κβαντικής μηχανικής (QM) με σκοπό την ανάλυση των δεσμών αλογόνου των αναστολέων και την επίδραση τους στη βιοδραστικότητά τους. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών έδειξαν ότι τα ομοιοπολικά

συνδεδεμένα ηλεκτραρνητικά άτομα χλώριο, βρώμιο και ιώδιο (και όχι το φθόριο) εμφανίζουν μια διαφορά δυναμικού στην επιφάνεια του δεσμού R-X (X = αλογόνο) (Ει-

κόνα 7.3). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 7.13 το φαινόμενο *σ-hole* εντείνεται όσο αυξάνεται το μέγεθος του αλογόνου (Cl<Br<I),



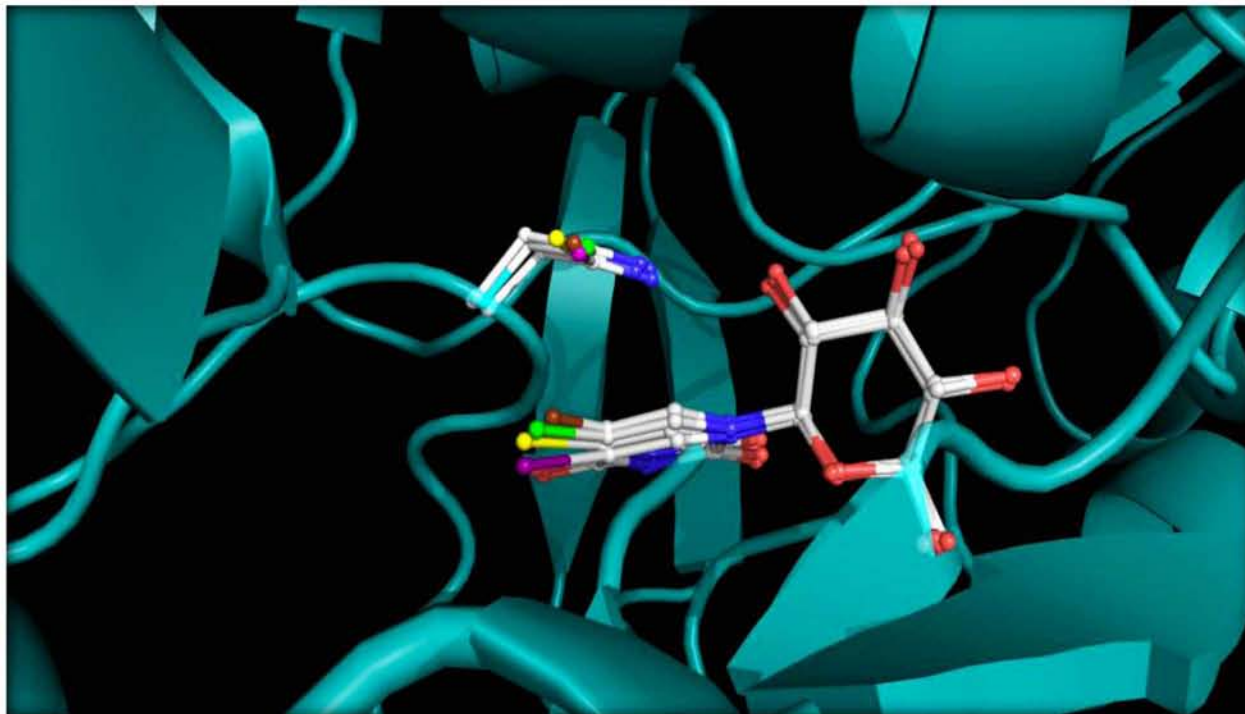
Εικόνα 7.3: Αποτελέσματα μεθόδων μοριακής δυναμικής στις αλογόνο-υποκατεστημένες ενώσεις, όπου φαίνονται τα ηλεκτροστατικά δυναμικά στην επιφάνεια των GlcFU, GlcClU, GlcBrU and GlcIU, καθώς και η περιοχή «*σ-hole*» στην επιφάνεια των αλογόνων. Η περιοχή αυτή απουσιάζει από την επιφάνεια του F, ενώ το φαινόμενο γίνεται πιο έντονο καθώς αυξάνει το μέγεθος του ατόμου.

δημιουργώντας πιο έντονο αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό (δ^-) στην κεντρική περιοχή του δεσμού R-X, και αντίστοιχα πιο έντονο θετικό ηλεκτροστατικό δυναμικό (δ^+) στην εξωτερική επιφάνεια του αλογόνου. Η αρνητικά φορτισμένη κεντρική περιοχή μπορεί να προσελκύσει δεσμούς υδρογόνου ή να απωθήσει βάσεις Lewis ανάλογα με την περίπτωση. Λόγω του φαινομένου *σ-hole* στην επιφάνεια των αλογόνων και το αρνητικό φορτίο που δημιουργείται προκαλείται έντονη άπωση μεταξύ των αναστολέων και της πλευρικής αλυσίδας του Asn284 (άτομο OD1), η οποία γίνεται πιο έντονη όσο αυξάνει το αρνητικό δυναμικό στην επιφάνεια του αλογόνου. Η Asn284 είναι ένα

από τα αμινοξέα που σχηματίζουν το βρόχο 280s. Όσο μεγαλύτερη είναι η διατάραξη στη διαμόρφωση της δομής του βρόχου 280s τόσο μεγαλύτερο και το ενεργειακό κόστος για την πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα της μελέτης QM έδειξαν ότι η άπωση αυτή προκαλεί μετατόπιση του αλογόνου και είναι πιο έντονη για τον αναστολέα που φέρει ως υποκαταστάτη I, ενώ η σειρά που ακολουθείται για τους υπόλοιπους είναι Br > Cl > F. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα της κρυσταλλογραφικής μελέτης των συμπλόκων καθώς η απόσταση μεταξύ του ατόμου OD1 της Asn284 με τα άτομα αλογόνου των αναστολέων αυξάνει σύμφωνα με

το προηγούμενο πρότυπο $F < Cl < Br < I$
(3,4, 3,8, 4, και 4,3Å αντίστοιχα) (Εικόνα

7.14).



Εικόνα 7.4: Υπέρθυση συμπλόκων gpGPb- αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου όπου παρουσιάζεται η άπωση μεταξύ των αλογόνων και των ατόμων της πλευρικής αλυσίδας της Asn284. Η μετατόπιση του υποκαταστάτη είναι πιο έντονη για το ιώδιο (μωβ), ενώ ακολουθούν το βρώμιο (κίτρινο), χλώριο (πράσινο) και το φθόριο (καφέ). Με αντίστοιχα χρώματα παρουσιάζεται και το άτομο OD1 της Asn284 σε κάθε ένα από τα σύμπλοκα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επίσης έδειξαν ότι η κλίση του δακτυλίου της ουρακίλης στο μόριο των αναστολέων διευκολύνει τη θετικά φορτισμένη περιοχή σ-hole στην εξωτερική επιφάνεια των ατόμων Cl, Br, I να σχηματίσει ευνοϊκές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το Asp339 (OD1/OD2) με αποστάσεις 3,65 Å, 3,82 Å και 4,08 Å αντίστοιχα. Αυτές οι αποστάσεις είναι μεγαλύτερες ενός τυπικού δεσμού αλογόνου (Auffinger et al. 2004) αλλά παρόμοιες με εκείνες που παρατηρήθηκαν στις

κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων (3,77 Å-3,99 Å).

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα η ισχυρότερη ανασταλτική δράση των αναστολέων **GlcClU**, **GlcBrU**, **GlcIU** έναντι των αναστολέων **GlcFU**, **GlcF3U** και **GlcU** μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που επάγονται μέσω της θετικά φορτισμένης περιοχής σ-hole κυρίως με το Asp339 (OD1-OD2). Η μειωμένη βιοδραστικότητα του **GlcF3U** μπορεί να αποδοθεί στον χαμηλότερο αριθμό δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει με τα

κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου της mGPb σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες ενώσεις που μελετήθηκαν. Από τη άλλη, η αυξημένη βιοδραστικότητα του **GlcCIU** σε σχέση με τους αναστολείς **GlcBrU** και **GlcIU** που επίσης σχηματίζουν τη περιοχή σ-hole μπορεί να αποδοθεί στο μεγαλύτερο μήκος του δεσμού C-Cl, που έχει ως αποτέλεσμα η απόσταση Cl-Asp339 OD1/OD2 (3,65 Å) να είναι μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη απόσταση των άλλων δυο υποκαταστατών, καθώς η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται πιο ισχυρή όσο μειώνεται η απόσταση μεταξύ του αλογόνου και της βάσης Lewis. Επίσης άλλη μια διαφορά που συνεισφέρει στην μείωση της σταθεράς αναστολής του **GlcCIU** είναι ότι το Cl συμμετέχει επίσης σε δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με το Asp339 (OD1/OD2) ($d=4,08$ Å), αλληλεπιδράσεις που παρατηρήθηκαν στα σύμπλοκα των άλλων δυο ενώσεων, οι οποίες συνεισφέρουν και αυτές στην σταθεροποίηση της ένωσης στο καταλυτικό κέντρο.

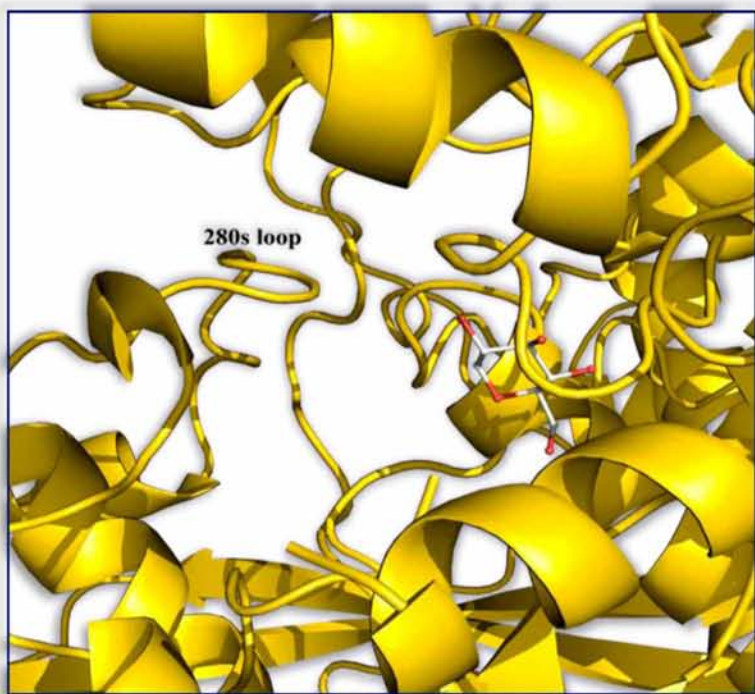
Συμπερασματικά οι C5 αλογονο υποκαταστημένοι γλυκοκυρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης που μελετήθηκαν είναι ισχυροί αναστολείς της mGPb που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου ενώ η ένωση **GlcCIU** με σταθερά αναστολής (K_i) 1,02 μ M είναι ένας από τους πιο ισχυρούς

αναστολείς του καταλυτικού κέντρου που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα. Η υποκατάσταση στη θέση C1 της γλυκόζης είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθεί το μέγεθος του αναστολέα με επακόλουθο την αύξηση των αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου, αυξάνοντας έτσι την ενέργεια σύνδεσης. Ταυτόχρονα διατηρήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις της γλυκοκυρανόζης, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία εκτεταμένη αναδιάταξη στην δομή του καταλυτικού κέντρου. Η αλογονο υποκατάσταση στη θέση C5 της ουρακίλης βελτίωσε την ανασταλτική δράση των ενώσεων έναντι της πρόδρομου ένωσης που δεν έφερε κάποιον υποκαταστάτη στην ίδια θέση, υποδεικνύοντας ότι τα χημικά χαρακτηριστικά των αλογόνων συμβάλλουν στην αύξηση της ανασταλτικής ικανότητας των αναστολέων. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε καθώς τα αλογόνα Cl, Br και I αλλά όχι το F σχηματίζουν μια θετικά φορτισμένη περιοχή σ-hole στην επιφάνεια τους η οποία μπορεί να δημιουργήσει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με αρνητικά φορτισμένες περιοχές άλλων μορίων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ήταν δύσκολο να προβλεφθούν τόσο από την κρυσταλλική δομή των συμπλόκων όσο και από μελέτες μοριακής προσομοίωσης (docking). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι κβαντικής μηχανικής που περιέγραψαν με σχετικά με-

γάλη ακρίβεια την επίδραση αυτών των αλληλεπιδράσεων και επιβεβαίωσαν τα κινητικά πειράματα που είχαν προηγηθεί.

8. Μελέτες C5- αλκυνύλ και αλκυλφουρανό[2,3-d] πυριμιδινό- γλυκοπυρανονουκλεοζιτών

Το καταλυτικό κέντρο της gmGPb είναι μια βαθιά σχισμή στο κέντρο του μονομερούς. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ισχυρή α-



Εικόνα 8.1: Το καταλυτικό κέντρο της gmGPb, όπου παρουσιάζεται ο κενός χώρος της β-εσοχής δίπλα στο βρόχο 280s απέναντι από τη θέση πρόσδεσης της γλυκόζης

νασταλτική δράση ορισμένων αναστολέων οφείλεται στο εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν με ορισμένα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου τα οποία δημιουργούν μια εσοχή εντός του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή αυτή που ονομάζε-

ται β-εσοχή, βρίσκεται απέναντι από τη θέση πρόσδεσης της γλυκόζης κοντά στο βρόχο 280s, δίπλα στο σημείο εισόδου στο καταλυτικό κέντρο και αποτελείται από πολικά και μη πολικά αμινοξέα (Εικόνα 8.1) (Oikonomakos 2002).

Η περιοχή αυτή είναι ιδιαίτερα ελκυστική για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό αναστολέων καθώς μπορούν να σχεδιαστούν ανάλογα γλυκόζης με β-υποκαταστάτη στην ανωμερική θέση του C1 της γλυκόζης που να αξιοποιούν αυτή την περιοχή, αυξάνοντας τις αλληλεπιδράσεις του μορίου με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου (Nagy et al. 2009, Bokor et al. 2010, Praly and Vidal 2010, Somsak 2011, Nagy et al. 2013). Μελέτες έχουν δείξει ότι αναστολείς, οι οποίοι εκμεταλλεύονται την περιοχή της β-εσοχής είναι δραστικοί και *in vivo* μειώνοντας τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα φυσιολογικών και διαβητικών ποντικών (Docsa et al. 2011, Nagy et al. 2013) Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της προηγούμενης μελέτης όπου C5 αλογονοϋποκατεστημένοι γλυκοπυρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης είχαν ισχυρή ανασταλτική δράση αλλά και σε μια προηγούμενη μελέτη η οποία έδειξε ότι ανάλογα *N*-ακετύλ-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνης που έφεραν ως υποκαταστάτες μεγάλου μήκους αλειφατικές αλυσίδες εμφάνισαν ανασταλτική δράση της

τάξης των μM (Somsak et al. 2008), το ενδιαφέρον μας στράφηκε προς νέους αναστολείς οι οποίοι θα μπορούσαν να εκμεταλλευτούν την περιοχή της β -εσοχής, αυξάνοντας τις αλληλεπιδράσεις του υποκαταστάτη με το καταλυτικό κέντρο.

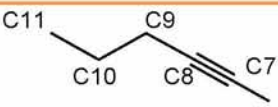
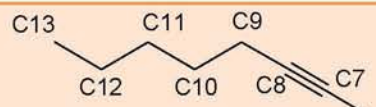
Η ένωση **GlcCIU** που ήταν η πιο βιοδραστική από την προηγούμενη σειρά αναστολέων χρησιμοποιήθηκε ως ένωση οδηγός για τη σύνθεση μιας νέας ομάδας αναστολέων (Εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας) στους οποίους διατηρήθηκε η υποκατάσταση στη θέση C1 της γλυκόζης με ουρακίλη, με στόχο να διατηρηθούν οι αλληλεπιδράσεις οι οποίες αυτές


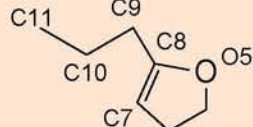
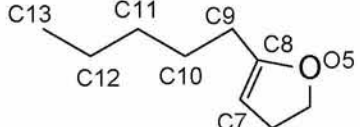
παρατηρήθηκαν στην προηγούμενη μελέτη (Ενότητα 7). Στη θέση C5 της ουρακίλης τα αλογόνα αντικαταστάθηκαν από υδρόφοβες ομάδες διαφορετικού μεγέθους και μήκους ώστε τα νέα μόρια να επεκταθούν εντός της β -εσοχής, αυξάνοντας τις αλληλεπιδράσεις στη περιοχή αυτή. Σκοπός ήταν να βρεθούν αλληλεπιδράσεις λόγω του μεγέθους των υποκαταστατών οι οποίες θα συνέβαλλαν στη σταθεροποίηση των αναστολέων και στην αύξηση της βιοδραστικότητάς τους.

8.1 Κινητικές μελέτες

Στον Πίνακα 8.1 παρουσιάζεται η χημική δομή των ενώσεων καθώς και η σταθερά αναστολής (K_i) που προέκυψε μετά τα κινητικά πειράματα.

Πίνακας 8.1: Ονομασία, χημική δομή και τιμή σταθεράς αναστολής (K_i) των αναστολέων

Ένωση	R	K_i (μM)
2a		$303,0 \pm 6,7$
2b		$3204 \pm 144^*$

2d		4,7 ± 0,4
3a		32,4 ± 0,5
3b		33,4 ± 4,0

*Η τιμή της σταθεράς αναστολής υπολογίστηκε από την εξίσωση Cheng-Prusoff: $K_i = IC_{50}/(1+[S]/K_m)$ (Cheng and Prusoff 1973) με τιμή $IC_{50}=6,1 \pm 0,2$ mM, για σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών έδειξαν ότι όλες οι ενώσεις είναι συναγωνιστικοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε σχέση με υπόστρωμα Glc-1-P, σε σταθερές συγκεντρώσεις γλυκογόνου και AMP. Η πιο βιοδραστική ένωση είναι η **2d** που φέρει έναν αιθύνυλο υποκαταστάτη στη θέση C5 της ουρακίλης ενώ οι ενώσεις **3a** και **3b** που φέρουν πιο ογκώδεις υποκαταστάτες είναι περίπου 5,7 φορές λιγότερο βιοδραστικοί. Τέλος οι ενώσεις **2a** και **2b** παρουσίασαν την χαμηλότερη ανασταλτική δραστηριότητα σε σύγκριση με τους υπόλοιπους, ενώ ο **2b** είναι λιγότερο βιοδραστικός ακόμα και από τον φυσιολογικό αναστολέα α -D-γλυκόζη (K_i 1,7mM) (Martin et al. 1991).

8.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

8.2.1 Συλλογή και βελτιστοποίηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν μέσω διάχυσης του διαλύματος των αναστολέων σε κρυστάλλους της gmGPb. Ο εμποτισμός των κρυστάλλων έγινε με διάλυμα αναστολέων 10 mM στο διάλυμα ανάπτυξης των κρυστάλλων, για 10 h πριν την συλλογή δεδομένων σε θερμοκρασία δωματίου. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων όλων των αναστολέων εκτός του **2d** έγινε με συμβατική πηγή ακτίνων X, με το περιθλασίμετρο Oxford Diffraction SuperNova στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, με τη χρήση του ανιχνευτή CCD 135mm, σε θερμοκρασία δωματίου. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων της ένωσης **2d** έγινε με τη χρήση συγχρο-

τρονικής ακτινοβολίας στο σταθμό X13 του EMBL στο Αμβούργο.

Ο προσδιορισμός της ομάδας χώρου, ο προσδιορισμός του προσανατολισμού του κρυστάλλου, η ολοκλήρωση των περιθλάσεων, η συγχώνευση πλαισίων πειραματικών δεδομένων, η άθροιση των μερικώς καταγεγραμμένων περιθλάσεων και η αναγωγή των δεδομένων έγιναν με το πρόγραμμα Crystals (Agilent Technologies UK Ltd 2011) για τα δεδομένα των οποίων η συλλογή έγινε με συμβατική πηγή ακτίνων X και με το πρόγραμμα HKL (Otwinowski and Minor 1997) για τα δεδομένα της ένωσης **2d**. Η ισοζύγηση και η συγχώνευση των εντάσεων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SCALA του πακέτου προγραμμάτων CCP4 (CCP4 1994). Η βελτιστοποίηση των δομών των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) με το πρόγραμμα REFMAC (CCP4 1994). Το αρχικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση των συμπλόκων και τον υπολογισμό των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $2F_o-F_c$, F_o-F_c ήταν η δομή της GPb (T διαμόρφωση) στην ελεύθερη κατάσταση σε ευκρίνεια 1,9 Å (Leonidas et al. unpublished results).

Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$, στο πρώτο στάδιο της

βελτιστοποίησης έδειξε πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο όλων των συμπλόκων αναστολέων-ενζύμου που υποδήλωνε τη σύνδεση των ενώσεων σε αυτό. Τα μοριακά μοντέλα των αναστολέων κατασκευάστηκαν με το πρόγραμμα PRODRG (Schuttelkopf and van Aalten 2004), και προσαρμόστηκαν στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας μετά από προσαρμογή των γωνιών στρέψης ενώ συμπεριλήφθηκαν στη διαδικασία της βελτιστοποίησης κατά τα τελευταία στάδια. Ακολούθησε ανοικοδόμηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών COOT (Emsley and Cowtan 2004). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στις δομές στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπίζονταν στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ με $\sigma 1.0$ (σ η τυπική απόκλιση της έντασης της περίθλασης). Τέλος πολλαπλοί κύκλοι βελτιστοποίησης με το πρόγραμμα REFMAC είχαν ως αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση των ατομικών συντεταγμένων (positional refinement) και τη βελτιστοποίηση του ατο-

μικού ισοτροπικού συντελεστή θερμοκρασίας B (B factor), βελτιώνοντας την ποιότητα των μοντέλων. Ο έλεγχος της στερεοχημείας των μοντέλων έγινε με το πρόγραμμα MolProbity (Chen et al. 2010). Η αξιολόγηση του μοντέλου έγινε πληρώντας τα κριτήρια που αναφέρονται στις παραγράφους 4.7, 4.9.

Οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις van der Waals του αναστολέα με τα κατάλοιπα του ενζύμου υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα CONTACT (CCP4 1994). Οι δεσμοί υδρογόνου αποδίδονται από το πρόγραμμα CCP4 όταν η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροαρνητικών ατόμων είναι μικρότερη από 3.3 Å και η γωνία που σχηματίζεται με-

ταξύ των δύο αυτών ατόμων και του προηγούμενου (ή επόμενου) είναι μεγαλύτερη από 90°. Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals ορίζονται για μη-υδρογονικά άτομα που απέχουν μεταξύ τους λιγότερο από 4 Å. Οι δομές των συμπλόκων κατατέθηκαν στην PDB με τους κωδικούς που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.2.

Στον πίνακα παρακάτω παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και της βελτιστοποίησης της δομής των συμπλόκων (οι δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου).

Πίνακας 8.2: Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας δεδομένων και βελτιστοποίησης των συμπλόκων mGPb-αναστολέων

Σύμπλοκο mGPb	2b	3b	2d	2a	3a
Στατιστικοί δείκτες συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων					
Ευκρίνεια (Å)	13.7 - 2.65	13.9 - 2.6	40.8 - 2.0	13.7 - 2.45	13.8 - 2.4
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2.79 - 2.65	2.74 - 2.60	2.03 - 2.00	2.58 - 2.45	2.53 - 2.40
Μετρήσεις	116023	105564	475554	184325	325861
Μοναδικές περιθλάσεις	27709 (3782)	30115 (4338)	5856 (1642)	33602 (4314)	38517 (5557)
Πολλαπλότητα	4.2 (1.8)	3.5 (2.3)	3.6 (2.0)	5.5 (4.1)	8.5 (5.5)
R_{sym}	0.100 (0.479)	0.110 (0.467)	0.071 (0.329)	0.109 (0.491)	0.099 (0.475)
Πληρότητα (%)	96.6 (89.5)	98.9 (99.3)	87.6 (50.2)	92.2 (82.4)	99.4 (100)
$\langle I/\sigma I \rangle$	13.3 (1.8)	9.7 (1.7)	7.2 (1.3)	13.8 (2.3)	17.4 (2.7)

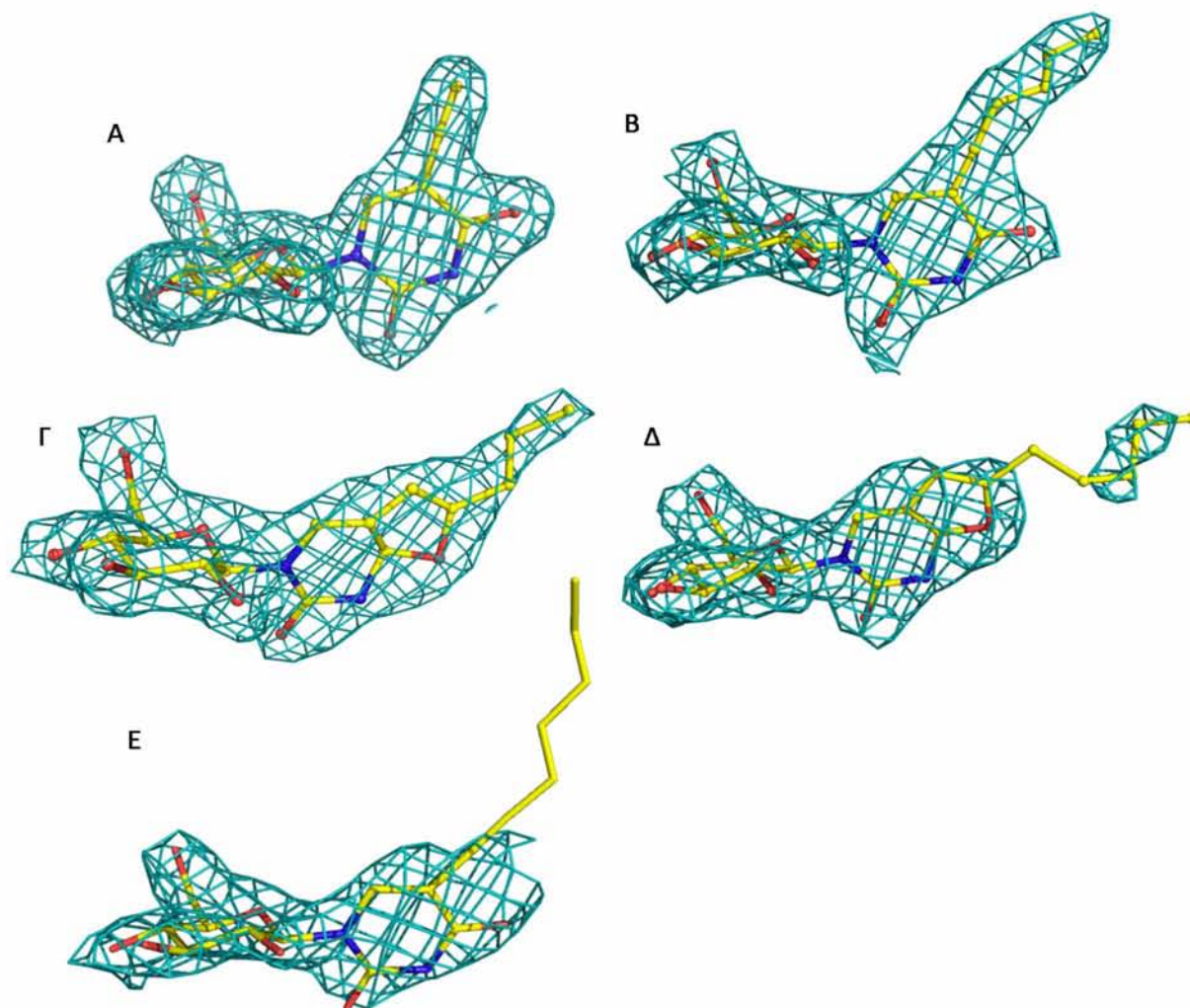
Στατιστικοί δείκτες βελτιστοποίησης

R_{cryst}	0.159 (0.212)	0.158 (0.221)	0.163 (0.204)	0.161 (0.241)	0.163 (0.214)
R_{free}	0.233 (0.328)	0.231 (0.325)	0.201 (0.275)	0.230 (0.312)	0.218 (0.287)
Αριθμός μορίων ύδατος	136	158	247	149	202
Απόκλιση r.m.s. από τις ιδεατές τιμές					
στο μήκος δεσμών (Å)	0.017	0.017	0.024	0.018	0.022
στις γωνίες (°)	1.71	1.71	1.88	1.77	1.9
Μέση τιμή παράγοντα B (Å²)					
Πρωτεϊνικά άτομα	27.8	26.4	32.5	25.8	25.0
Μόρια ύδατος	24.4	23.5	35.7	22.0	25.2
Προσδέτης	54.9	29.8	20.1	25.4	20.9
PDB entry	4EJ2	4EKE	4EL5	4EKY	4EL0

8.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης

Από την εξέταση των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας (F_o-F_c και $2F_o-F_c$), διαπιστώθηκε η ύπαρξη πυκνότητας για όλα τα άτομα των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο. Ακολούθησε ανάλυση των χαρτών όπου προσδιορίστηκε με ακρίβεια ο προσανατολισμός και η θέση κάθε ατόμου των

μορίων των αναστολέων **2d**, **2a** και **3a**. Στις **2b** και **3b** η θέση των ατόμων του C5 υποκαταστάτη δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί με ακρίβεια καθώς δεν υπήρχε ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε αυτή την περιοχή, υποδεικνύοντας ότι αυτοί οι υποκαταστάτες είναι αρκετά ευκίνητοι στην κρυσταλλική δομή (Εικόνα 8.2).



Εικόνα 8.2: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ των Α) **2d**, Β) **2a**, Γ) **3a**, Δ) **3b**, Ε) **2b** στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δομές των μορίων προσαρμόστηκαν στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ με σ 1.0 πριν από την διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Ακολούθησε ανάλυση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν οι αναστολείς με τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου. Όλοι οι αναστολείς προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο με πρόσδεση του τμήματος της β-D-γλυκοκυρανόζης στη θέση πρόσδεσης της α-D-γλυκόζης. Οι αλληλεπιδράσεις που

σχηματίζονται στην περιοχή αυτή είναι ίδιες με αυτές που σχηματίζει η γλυκόζη με την gmGPb (Martin et al. 1990). Επιπλέον τα τμήματα της ουρακίλης σε όλους τους αναστολείς παίρνουν μέρος σε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων με αμινοξικά κατάλοιπα (Πίνακας 8.3), ανάλογο με εκείνο που παρα-

τηρήθηκε στα σύμπλοκα που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη μελέτη (Ενότητα7), αλλά και σε άλλα ανάλογα πυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης (Parageorgiou et al. 1991, Tsirkone et al. 2010). Το ενδιαφέρον μας στράφηκε στις αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν οι C5 υποκαταστάτες με τα αμινοξικά κατάλοιπα, καθώς

αυτές θα μπορούσαν να αποσαφηνίσουν την μεγάλη διαφορά που παρουσιάζουν οι ενώσεις ως προς την ανασταλτική τους ισχύ. Παρακάτω παρουσιάζονται οι εν δυνάμει αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν οι αναστολείς αλλά και η ένωση οδηγός **GlcCIU** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου.

Πίνακας 8.3: Εν δυνάμει δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ατόμων των αναστολέων και των ατόμων των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου

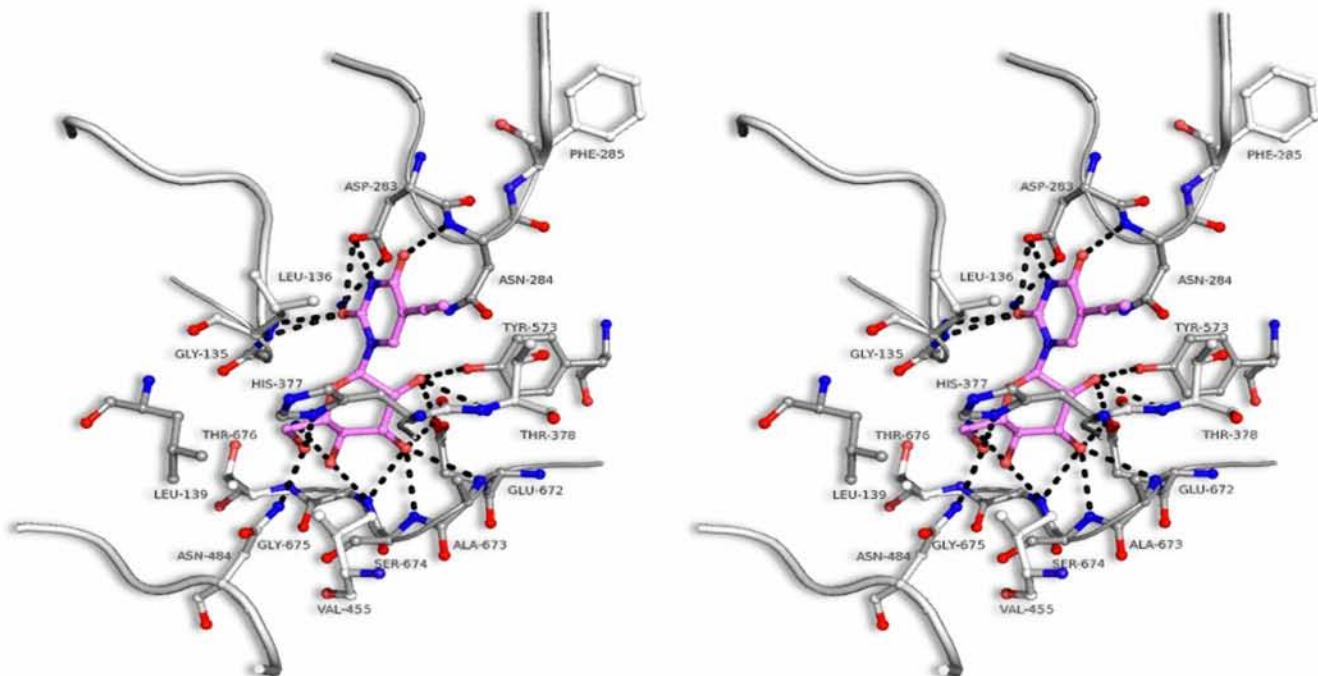
Άτομο αναστο- λέα	Άτομο πρω- τεΐνης	GlcCIU	2a	2b	2d	3a	3b
O2'	Asn284 ND2	3.3	3.3	-	3.1	-	-
	Tyr573 OH	3.1	3.0	3.1	3.0	3.1	3.1
	Glu672 OE1	3.1	3.3	3.3	3.1	3.2	3.0
	Μόριο ύδατος Glu672	2.9	2.9	2.9	2.9	2.8	2.9
O3'	OE1	2.8	2.8	2.8	2.7	2.8	2.7
	Ala673 N	3.1	3.1	3.2	3.2	3.2	3.3
	Ser674 N	2.9	2.8	3.0	3.0	3.0	2.9
	Gly675 N	3.0	3.1	3.1	3.1	3.1	2.9
O4'	Gly675 N	2.8	2.7	2.7	2.8	2.6	2.8
	Μόριο ύδατος	2.6	2.7	2.7	2.7	2.6	2.6
O6'	His377 ND1	2.6	2.7	2.7	2.7	2.7	2.8
	Asn484 OD1	2.9	2.7	2.8	2.8	2.7	2.7
O2	Gly135 N	3.2	3.1	3.2	3.2	3.1	3.0
	Leu136 N	2.9	3.2	3.2	3.1	3.0	2.9
	Asp283 OD1 Μόριο ύδατος	- 2.7	3.2 2.5	- 3.0	- 2.8	- 2.8	- -
N3	Asp283 OD1	2.8	2.8	-	2.6	-	-
	Μόριο	-	-	2.6		3.0	-

	ύδατος						
	Μόριο						
	ύδατος	-	-	3.3		-	-
O4	Asn284 N	2.9	2.9	-	3.0	-	-
	Μόριο						
	ύδατος	3.3	3.3		3.3	-	-
Σύνολο		18	19	16	18	15	13

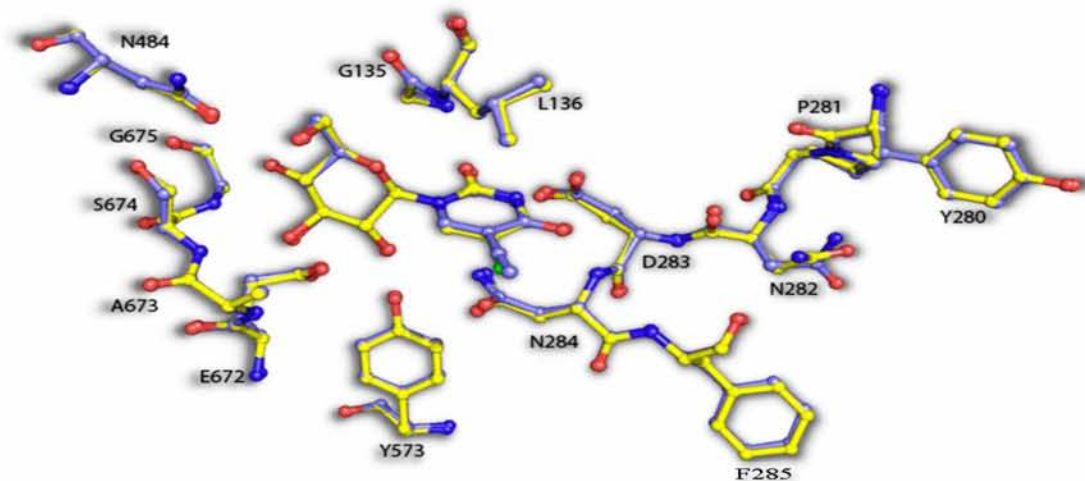
Ο αναστολέας **2d** παρουσιάζει την ισχυρότερη ανασταλτική δράση σε σύγκριση με τους υπόλοιπους που δοκιμάστηκαν σε αυτήν τη σειρά. Η αντικατάσταση του χλωρίου στη θέση C5 της ουρακίλης της ένωσης οδηγού με αιθύνυλο ($\equiv\text{CH}$) υποκαταστάτη δεν βελτίωσε την ανασταλτική ικανότητα του αναστολέα καθώς η ένωση **2d** παρουσιάζει παρόμοια σταθερά αναστολής με την οδηγό ένωση.

Η ένωση **2d** σχηματίζει συνολικά παρόμοιο αριθμό αριθμό αλληλεπιδράσεων με την ένωση οδηγό, 18 δεσμούς υδρογόνου με αμινοξικά κατάλοιπα και μόρια ύδατος της πρωτεΐνης και 84 αλληλεπιδράσεις van der Waals (η **GlcCIU** σχηματίζει 18 και 86 αντίστοιχα) (Εικόνα 8.3, Πίνακας 8.3). Ο αναστολέας επίσης αλληλεπιδρά με αμινοξέα του βρόχου

280s (Asp283-Asn284), σταθεροποιώντας την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου και προωθώντας έτσι την μετάβαση προς τη διαμόρφωση T. Μετά απο υπέρθεση των συμπλόκων **2d**-rmGPb και **GlcCIU**-rmGPb προέκυψε ότι στο σύμπλοκο **2d**-rmGPb εμφανίζεται μια κλίση του πυριμιδινικού δακτυλίου κατά 15° ενώ δεν εμφανίζονται σημαντικές δομικές διαφορές που να διαταράζουν την διαμόρφωση των αμινοξέων ή του δικτύου μορίων ύδατος του καταλυτικού κέντρου σε σύγκριση με την ένωση **GlcGIU** (Εικόνα 8.4). Συνεπώς, η παρόμοια ανασταλτική δράση των δυο ενώσεων μπορεί να αποδοθεί στον παρόμοιο τρόπο σύνδεσης τους στο καταλυτικό κέντρο και στον παρόμοιο αριθμό αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν κατά την πρόσδεση τους.



Εικόνα 8.3: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της ένωσης **2d** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



Εικόνα 8.4: Υπέρθηση του συμπλόκου mGPb-**2d** (μωβ χρώμα) με το συμπλοκο mGPb-GlcCIU (κίτρινο χρώμα) όπου παρουσιάζεται ο παρόμοιος τρόπος σύνδεσης των δυο ενώσεων στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.

Η ένωση **2a**, ύστερα απο την πρόσδεση της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου συμμετέχει σε συνολικά 19 δεσμούς

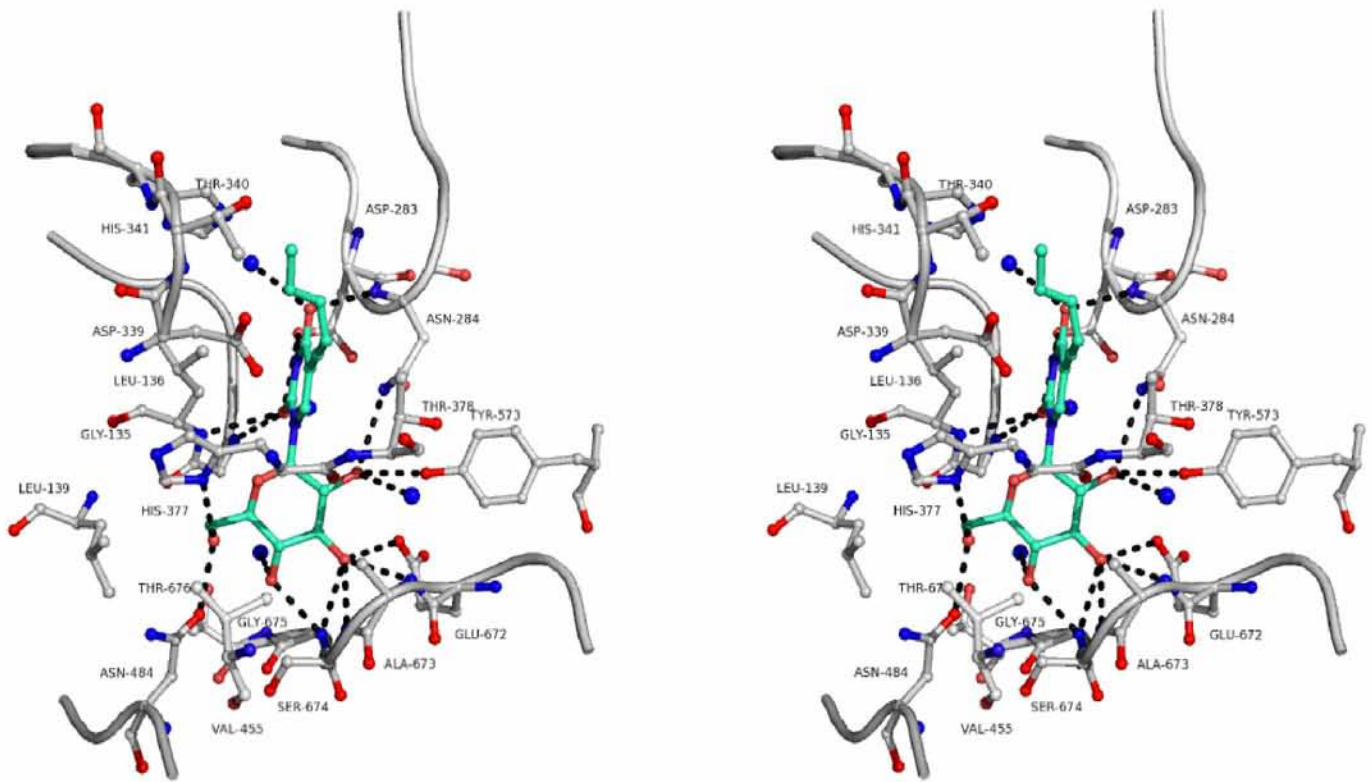
υδρογόνου και 101 αλληλεπιδράσεις van der Walls με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. Οι 17 επιπλέον αλληλεπιδράσεις

van der Waals που σχηματίζει σε σύγκριση με την ένωση οδηγό οφείλονται στον πεντύνυλο υποκαταστάτη στη θέση C5, καθώς λόγω του μήκους του εισχωρεί στην περιοχή της β-εσοχής σχηματίζοντας αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα της περιοχής αυτής (Εικόνα 8.5).

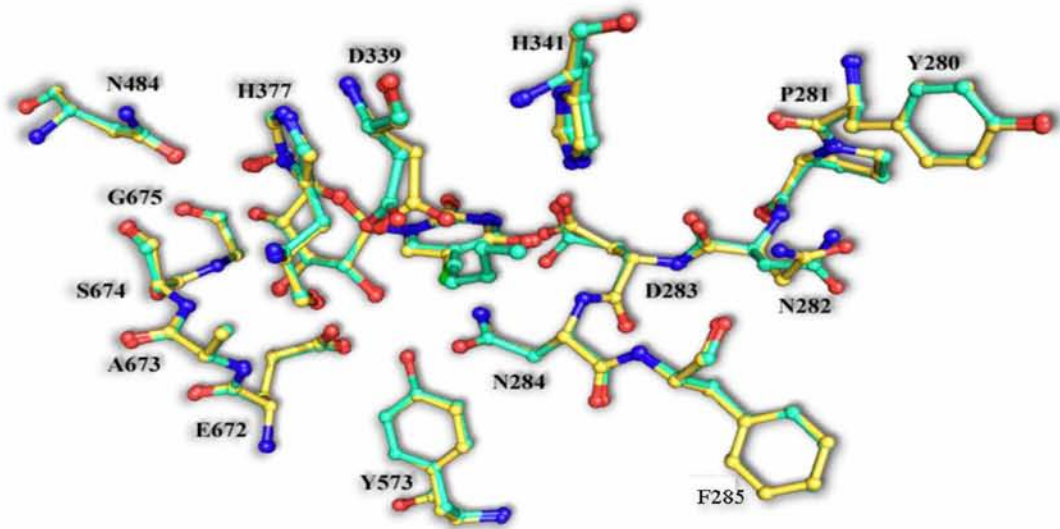
Οι επιπλέον αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει η ένωση **2a**, δεν βελτίωσαν όμως τη βιοδραστικότητα της καθώς μετά από υπέρθεση των συμπλόκων gmGPb-**2a** και gmGPb-GlcCIU πρόκυψε ότι μετά την πρόσδεση της, παρουσιάζονται δομικές μεταβολές στο καταλυτικό κέντρο. Συγκεκριμένα η πεντύνυλο ομάδα στρέφεται προς τις πλευρικές αλυσίδες των Asp339 και His341, με αποτέλεσμα αυτές να εκτοπίζονται από την θέση τους εντός του καταλυτικού κέντρου. Όλα τα άτομα της His341 μετατοπίζονται ~0,4 Å, ενώ η πλευρική αλυσίδα του Asp339 μετατοπίζεται 0.7 Å και περιστρέφεται (μεταβολή ~5° και ~40° των γωνιών στρέψης χ_1 και χ_2 , αντίστοιχα)

(Εικόνα 8.6). Το δίκτυο μορίων ύδατος του καταλυτικού κέντρου παραμένει το ίδιο σε σύγκριση με το σύμπλοκο της ένωσης οδηγού εκτός από δύο μόρια ύδατος που βρίσκονται στην περιοχή του υποκαταστάτη και μετατοπίζονται από τη θέση τους κατά 0,5 Å και 0,4 Å, αντίστοιχα.

Συνολικά η **2a** μετά την πρόσδεση της στο καταλυτικό κέντρο διατηρεί τον ίδιο αριθμό δεσμών υδρογόνου σε σύγκριση με τη **2d**, που παρουσίασε την υψηλότερη βιοδραστικότητα, ενώ οι αυξημένες αλληλεπιδράσεις van der Waals δεν συνέβαλλαν σε περαιτέρω αύξηση. Είναι πιθανό λοιπόν ότι το ενεργειακό κόστος της μετατόπισης του βρόχου 339-341 και της αναδιαμόρφωσης του δικτύου μορίων ύδατος που προκλήθηκε από την προσαρμογή της **2a** εντός του καταλυτικού κέντρου ήταν μεγαλύτερο από την ενέργεια σύνδεσης που προσέφεραν οι επιπλέον αλληλεπιδράσεις van der Waals, με αποτέλεσμα τη μείωση στη σταθερά αναστολής.



Εικόνα 8.5: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της ένωσης **2a** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλέ σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



Εικόνα 8.6: Υπέρθηση του συμπλόκου mGPb-**2a** (γαλάζιο χρώμα) με το σύμπλοκο mGPb-GlcCIU (κίτρινο χρώμα) όπου παρουσιάζεται η μετατόπιση του βρόχου 339-341.

Στο σύμπλοκο **rmGPb-2b**, ο αναστολέας σχηματίζει συνολικά 16 δεσμούς δεσμούς υδρογόνου (δύο λιγότερους από την ένωση οδηγό) και 83 αλληλεπιδράσεις van der Waals (3 λιγότερες από την ένωση οδηγό) με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. Ο πυριμιδινικός δακτύλιος έχει ελαφρώς μετατοπιστεί από τη θέση που κατείχε στο σύμπλοκο **rmGPb- GlcCIU** ώστε η επτύνυλο αλυσίδα του αναστολέα να εισέλθει εντός της β-εσοχής. Ο υποκαταστάτης σχηματίζει συνολικά 31 αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα Asp339, Thr340, His341, Ala383, Leu384 και Glu385 (Εικόνα 8.7) οι οποίες οφείλονται στην προσαρμογή του στην περιοχή της β-εσοχής και οι οποίες δεν παρατηρήθηκαν στο σύμπλοκο της ένωσης οδηγού.

Για να μπορέσει να εξηγηθεί η μεγάλη μείωση στη βιοδραστικότητα του αναστολέα **2b** σε σύγκριση με τον **GlcCIU** ακολούθησε υπέρθεση των συμπλόκων τους. Η μελέτη έδειξε σημαντικές διαφορές στην αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου ανάμεσα στα δύο σύμπλοκα. Το μεγαλύτερο μήκος στον υποκαταστάτη δεν συνέβαλε στην αύξηση των αλληλεπιδράσεων van der Waals όπως παρατηρήθηκε στο σύμπλοκο **rmGPb-2a** προκάλεσε όμως εκτεταμένη αναδιοργάνωση στη δομή του βρόχου 280s, και του δικτύου μορίων ύδατος του καταλυτικού κέντρου. Η

τιμή r.m.s.d. όλων των ατόμων των αμινοξέων του βρόχου 280s (αμινοξέα 282-288) μεταξύ των συμπλόκων **rmGPb-GlcCIU** και **rmGPb-2b** είναι 1,64 Å. Συγκεκριμένα τα Asp283 και Asn284 απομακρύνονται από τον αναστολέα ώστε να αποφύγουν την σύγκρουση με τον C5-επτύνυλο υποκαταστάτη με αποτέλεσμα την επακόλουθη μετατόπιση και των υπόλοιπων καταλοίπων του βρόχου.

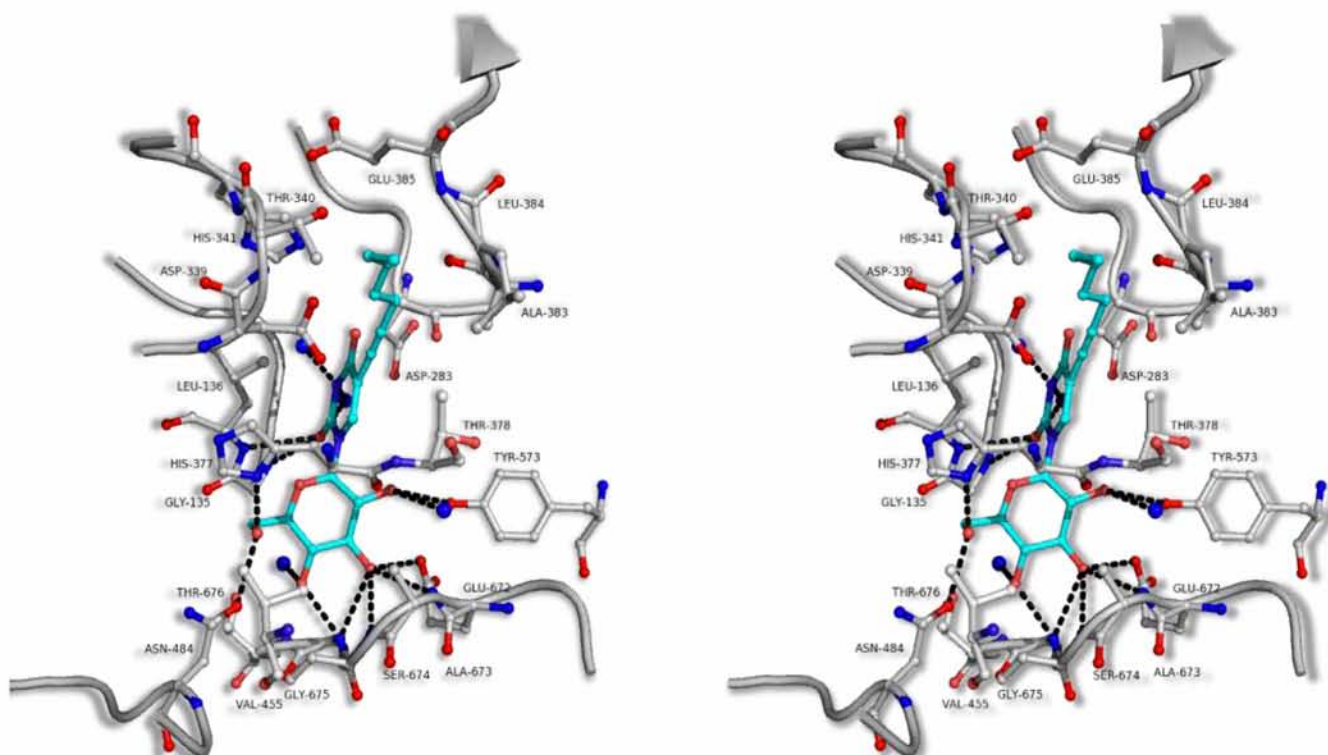
Οι πιο αξιοσημείωτες αλλαγές στις θέσεις των C^α παρατηρήθηκαν για τα Asp283 (0.7 Å), Asn284 (3.1 Å), Phe285 (1.8 Å), Phe286 (1.0 Å), Glu287 (1.1 Å), και Gly288 (1.0 Å). Η Asn284 περιστρέφεται 180° και τοποθετείται ανάμεσα στους φαινολικούς δακτυλίους της Phe285 και Tyr613, κατάλοιπα τα οποία σχηματίζουν το κέντρο αναστολής στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου, με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση του (Εικόνα 8.8). Αυτή η αναδιάταξη και η αποσταθεροποίηση της δομής του βρόχου 280s προκαλεί την μετάπτωση από την διαμόρφωση R στην T της GP και έχει παρατηρηθεί και σε άλλα σύμπλοκα με αναστολείς που φέρουν ογκώδεις βενζολικούς υποκαταστάτες (Oikonomakos et al. 2002, Nagy et al. 2012). Η μετόπιση του βρόχου 280s στο σύμπλοκο **rmGPb-2b** έχει ως αποτέλεσμα επίσης να μην μπορούν να σχηματιστούν δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι

παρατηρήθηκαν στο σύμπλοκο **rmGPb-GlcCIU** ανάμεσα στο O2' της γλυκοπυρανόζης με την Asn284 και τα άτομα N3 και O4 του πυριμιδινικού δακτυλίου με τα Asp283 και Asn284 αντίστοιχα. Επιπρόσθετα το μεγάλο μήκος του υποκαταστάτη προκαλεί μεταβολή του δικτύου μορίων ύδατος του καταλυτικού κέντρου. Πέντε μόρια ύδατος εκτοπίζονται από το καταλυτικό κέντρο εξαιτίας της πρόσδεσης του **2b**, ενώ άλλα δυο μετατοπίζονται ~3.5 Å από την θέση που κατείχαν στο σύμπλοκο **rmGPb-GlcCIU**.

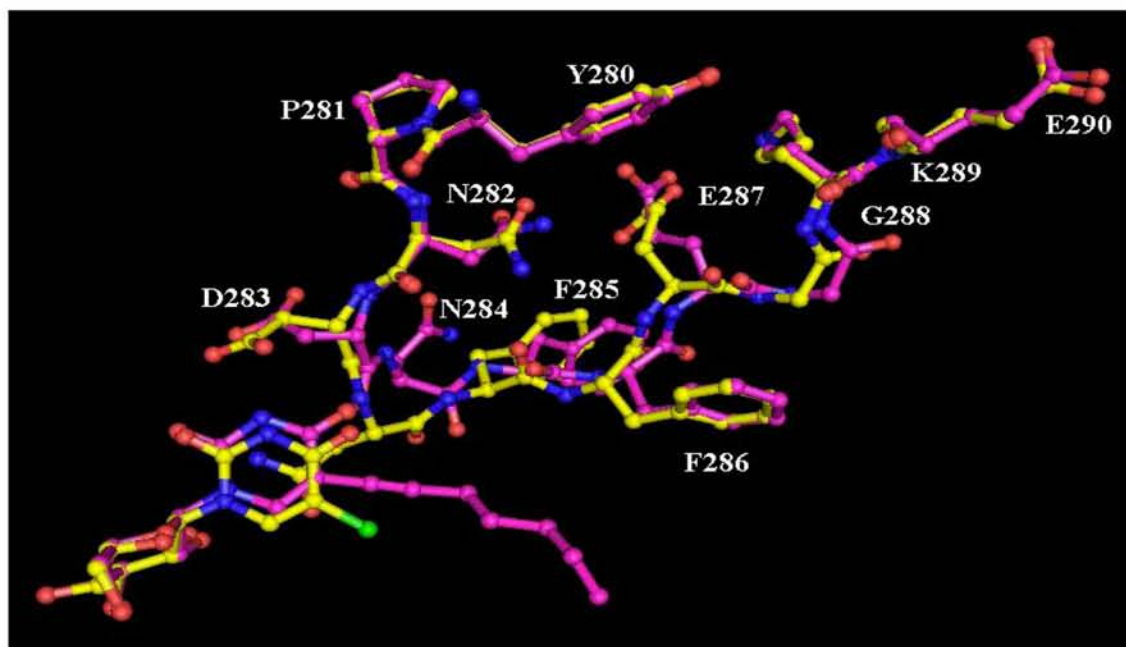
Μελέτη του παράγοντα θερμοκρασίας (B factor) έδειξε ότι όλα τα άτομα του C5 επτύνυλο υποκαταστάτη έχουν τιμές 50% υψηλότερες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα άτομα του αναστολέα. Επίσης λόγω του υδρόφιλου περιβάλλοντος του καταλυτικού κέντρου και της υδρόφοβη φύσης της αλυσίδας ανθράκων του υποκαταστάτη

δημιουργείται μια «ταλάντωση» στην τελική αλυσίδα του αλκυνίου που δυσκολεύει την πρόσδεση του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο. Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν υπάρχει ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην περιοχή του επτύνυλο υποκαταστάτη, υποδεικνύουν ότι η ομάδα αυτή παρουσιάζει υψηλή κινητικότητα στην κρυσταλλική δομή αποτυγχάνοντας έτσι να δημιουργήσει κατάλληλες αλληλεπιδράσεις που θα σταθεροποιούσαν την πρόσδεση του.

Η αδυναμία σχηματισμού επιπλέον αλληλεπιδράσεων van der Waals για να αντισταθμιστεί το ενεργειακό κόστος τόσο της απώλειας 3 δεσμών υδρογόνου όσο και της αναδιοργάνωσης της δομής του καταλυτικού κέντρου αποτελεί μια δομική εξήγηση της αύξησης της σταθεράς αναστολής της ένωσης αυτής.



Εικόνα 8.7: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της ένωσης **2b** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



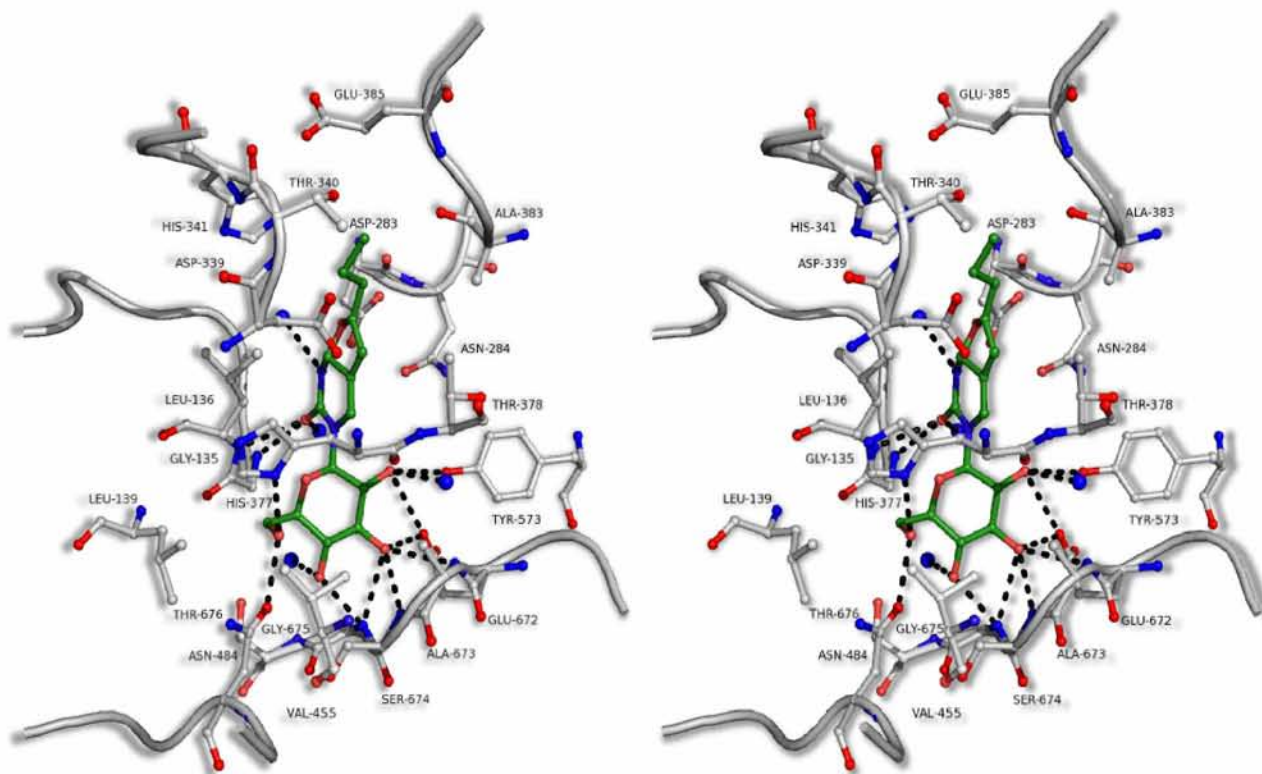
Εικόνα 8.8: Υπέρθηση του συμπλόκου mGPb-**2b** (ροζ) με το σύμπλοκο mGPb-GlcCIU (κίτρινο) όπου παρουσιάζεται η έντονη αναδιοργάνωση του βρόχου 280s.

Στις **3a** και **3b** προστέθηκε στη θέση C5 της ουρακίλης ένας φούρανο- δακτύλιος που έφερε μια πρότυλο και μια πεντύνυλο ομάδα αντίστοιχα, ώστε να μειωθεί η κινητικότητα του υποκαταστάτη και να διατηρηθεί η υδρόφοβη φύση του. Οι κινητικές μελέτες έδειξαν ότι αυτοί οι δυο αναστολείς παρουσιάζουν παρόμοια ανασταλτική ικανότητα. Ανάλυση της κρυσταλικής δομής των συμπλόκων τους έδειξε ότι μετά την πρόσδεση τους οι ενώσεις σχηματίζουν 15 και 13 δεσμούς υδρογόνου και 74 και 78 αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα αμινοξέα της gmGPb αντίστοιχα, σημαντικά λιγότερες δηλαδή από την οδηγό ένωση **GlcCIU** που σχηματίζει 18 και 86.

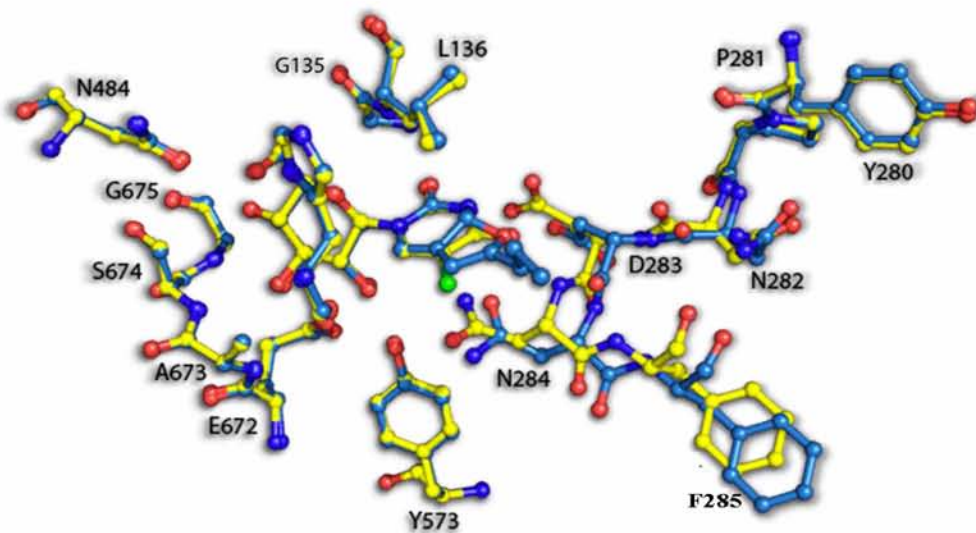
Και οι δυο αναστολείς προκαλούν αλλαγή στη διαμόρφωση του βρόχου 280s, ωστόσο η αλλαγή αυτή είναι λιγότερο εκτεταμένη από αυτή που παρατηρήθηκε στο σύμπλοκο gmGPb-**2b** καθώς η εισαγωγή του φούρανο-δακτυλίου σταθεροποίησε τη δομή του αναστολέα στο καταλυτικό

κέντρο. Η τιμή r.m.s.d. των ατόμων της κύριας αλυσίδας των αμινοξέων του βρόχου 280s (αμινοξέα 282-288) μεταξύ των συμπλόκων της gmGPb-**GlcCIU** και gmGPb-**3a** και gmGPb-**3b** είναι 0,45 Å και 0,71 Å, αντίστοιχα.

Στο σύμπλοκο gmGPb-**3a**, η αναδιοργάνωση του βρόχου 280s είναι ίδια με αυτήν που προκαλείται από την πρόσδεση του **2b** με μοναδική εξαίρεση την Asn284 στην οποία δεν προκαλείται η αναστροφή που παρατηρήθηκε προηγουμένως. Η Asn μετατοπίζεται μακριά από τον αναστολέα ώστε να αποφύγει τη σύγκρουση (1,4 Å) αλλά διατηρεί τον προσανατολισμό της προς το καταλυτικό κέντρο (Εικόνα 8.10). Παρόλα αυτά η μετακίνηση αυτή προκαλεί την απώλεια 3 δεσμών υδρογόνου με τα Asp283 και Asn284 και καθώς δεν σχηματίζει επιπλέον αλληλεπιδράσεις van der Waals ώστε να αντισταθμιστεί το ενεργειακό κόστος, η ανασταλτική του δραστηριότητα μειώνεται 6.8 φορές σε σύγκριση με την **2d**.



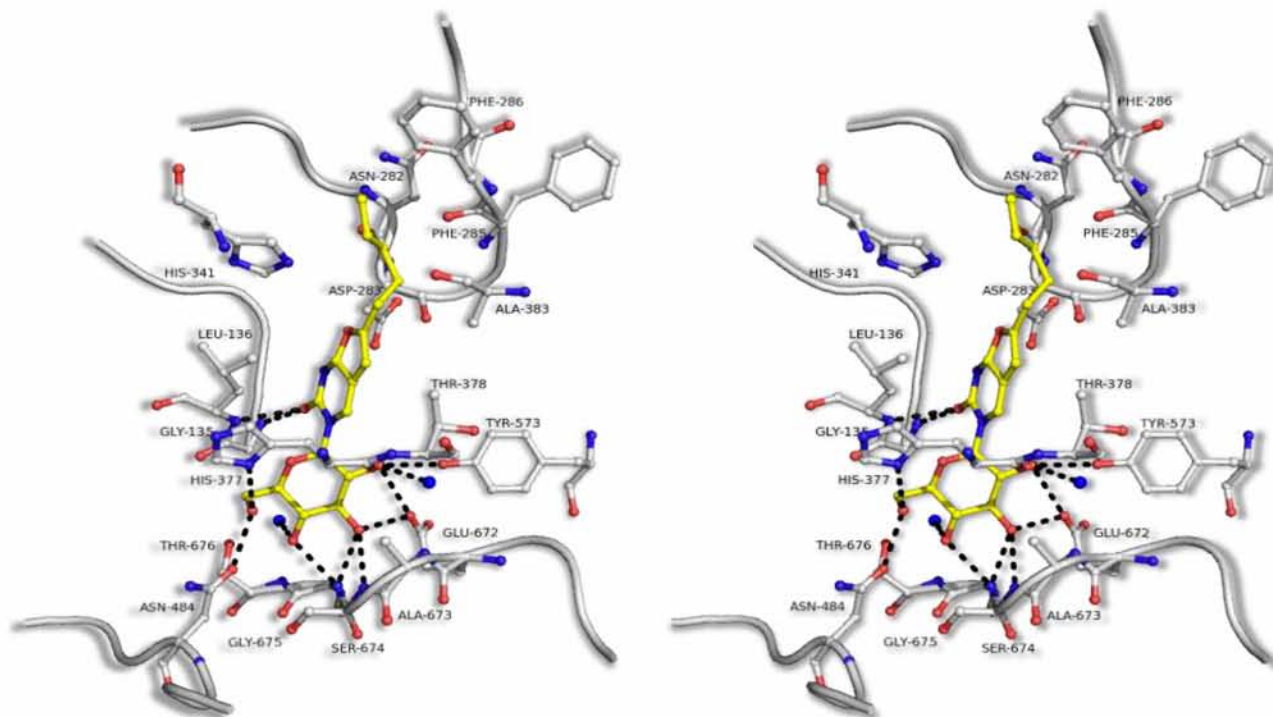
Εικόνα 8.9: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της ένωσης **3a** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



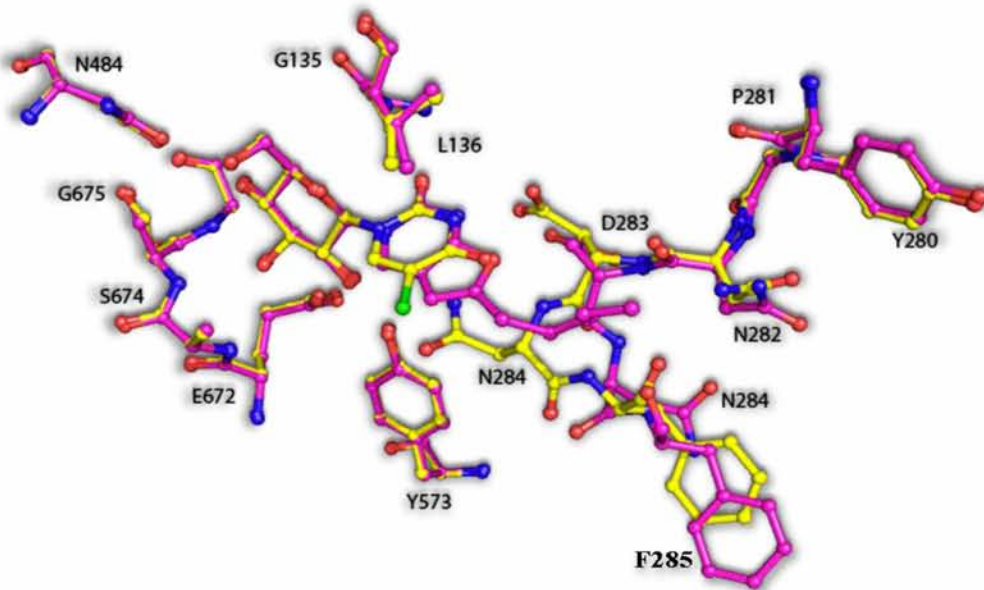
Εικόνα 8.10: Υπέρθηση του συμπλόκου mGPb-**3a** (μπλε) με το σύμπλοκο mGPb-GlcCIU (κίτρινο) όπου παρουσιάζεται η αναδιοργάνωση του βρόχου 280s.

Στο σύμπλοκο mGPb-**3b** η αναδιοργάνωση του βρόχου 280s είναι παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στο σύμπλοκο mGPb-**2b**, συμπεριλαμβανομένης και της αναστροφής της Asn284, με αποτέλεσμα την απώλεια 3 δεσμών με τα αμινοξέα Asp283 και Asn284 σε σύγκριση με το σύμπλοκο της ένωσης οδηγού. Παρόλα αυτά η C5 αλκύνυλο ομάδα προσδένεται σε διαφορετική θέση σε σύγκριση με όλους τους υπόλοιπους αναστολείς. Στη θέση αυτή η αλκύνυλο ομάδα είναι πιο κοντά στο βρόχο 280s με αποτέλεσμα το σχηματισμό αλληλεπιδράσεων van der Waals με τα Asn282, Asp283, Phe285 και Phe286 (Εικόνες 8.11, 8.12). Οι αλληλεπιδράσεις

αυτές παρατηρήθηκαν μόνο στο σύμπλοκο mGPb-**3b**, καθώς κανένας από τους υπόλοιπους αναστολείς δεν συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με κάποιο κατάλοιπο του βρόχου 280s. Εξαιτίας αυτών των αλληλεπιδράσεων η ένωση **3b** σταθεροποιεί το βρόχο 280s στην κλειστή διαμόρφωση προάγοντας έτσι την ανενεργή διαμόρφωση T του ενζύμου. Παρά την εκτεταμένη μετατόπιση που προκαλεί η **3b** στο βρόχο 280s σε σύγκριση με την **3a**, και το ενεργειακό κόστος που την ακολουθεί, η παρόμοια δραστηριότητα των δυο αναστολέων αποδίδεται στην σταθεροποίηση του βρόχου 280s στην κλειστή του διαμόρφωση.



Εικόνα 8.11: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της **3b** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές



Εικόνα 8.12: Υπέρθηση του συμπλόκου mGPb-3b (ροζ) με το σύμπλοκο mGPb-GlcCIU (κίτρινο) όπου παρουσιάζεται η αναδιοργάνωση του βρόχου 280s.

9. Μελέτη N-ακυλ-β-D- γλυκοπυρανοζυ-λαμινών

Τα αποτελέσματα της προηγούμενης μελέτης έδειξαν ότι οι πυρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης που έφεραν στη θέση C5 της ουρακίλης υδρόφοβες ομάδες διαφορετικού μήκους και μεγέθους σχημάτισαν άλλη-λεπιδράσεις με την περιοχή της β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου.

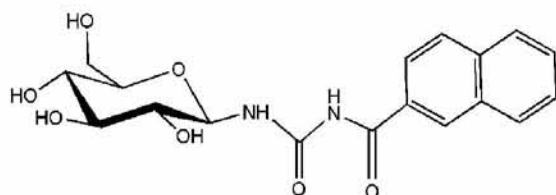
Θέλοντας να επεκτείνουμε περαιτέρω τον υποκαταστάτη εντός την β-εσοχής το ενδιαφέρον μας στράφηκε σε ένα δομικό χαρακτηριστικό πολλών αναλόγων γλυκόζης, τον συνδέτη (linker), ο οποίος συνδέει την περιοχή της γλυκοπυρανόζης με έναν υποκαταστάτη R. Ένας τέτοιος συνδέτης είναι η ομάδα $-NHCO-$, η οποία έχει

χρησιμοποιηθεί σε ανάλογα γλυκόζης και οδήγησε στην ανακάλυψη βιοδραστικών αναστολέων, της τάξης των μM , έναντι της φωσφορύλασης του γλυκόγονου (Watson et al. 1995, Gyorgydeak et al. 2004, Konya et al. 2012).

Η ένωση που παρουσιάζεται στην εικόνα 9.1 και φέρει ως συνδέτη την ομάδα $-NHCO-$ αποτελεί ισχυρό αναστολέα της mGP (K_i 3,7 μM) (Nagy et al. 2012) και χρησιμοποιήθηκε ως κρίωμα για τη σύνθεση μιας νέας ομάδας αναστολέων απο το εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, στους οποίους διατηρήθηκε η ομάδα του συνδέτη και προστέθηκαν επιλεγμένοι υποκαταστάτες R

διαφορετικού μήκος και μεγέθους. Η σάρωση και διαλογή των υποκαταστατών έγινε από την βάση δεδομένων Zinc, η

οποία διαθέτει μια επιλεγμένη συλλογή εμπορικά διαθέσιμων χημικών ενώσεων (Irwin and Shoichet 2005)



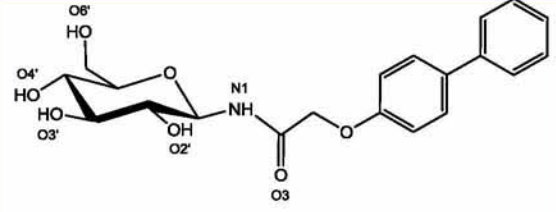
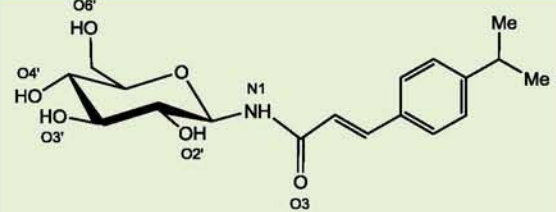
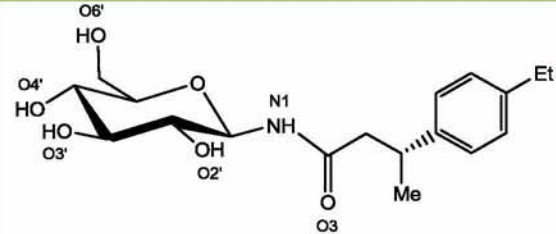
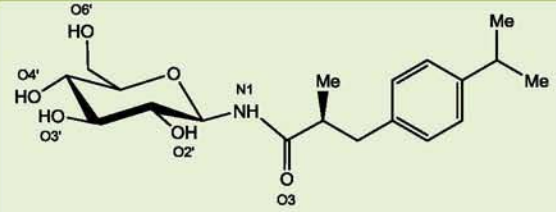
Εικόνα 9.1: Χημική δομή της ένωσης οδηγού

9.1 Κινητικές μελέτες

Στον πίνακα παρακάτω παρουσιάζεται η χημική δομή των ενώσεων καθώς και η σταθερά αναστολής (K_i).

Πίνακας 9.1: Ονομασία, χημική δομή και τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i) των αναστολέων που μελετήθηκαν, καθώς και της ένωσης F, που αποτελεί τον πιο βιοδραστικό αναστολέα που φέρει ως συνδέτη την ομάδα $-NHCO-$.

Ένωση	Χημική δομή	K_i (μM)
F		2,3 (Gyorgydeak et al. 2004)
S1		$5,14 \pm 0,77$
S2		$48,68 \pm 4,49$

S3		$8,25 \pm 0,77$
S6		$4,98 \pm 0,58$
S20		$376,87 \pm 17,04$
S21		$75,29 \pm 6,96$

Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών έδειξαν ότι όλες οι ενώσεις παρουσιάζουν συναγωνιστική αναστολή σε σχέση με υπόστρωμα Glc-1-P, σε σταθερές συγκεντρώσεις γλυκογόνου και AMP. Οι πιο βιοδραστικές ενώσεις είναι η **S1** ($K_i=5,14 \mu\text{M}$) και η **S6** ($K_i=4,98 \mu\text{M}$) που παρουσιάζουν παρόμοια ανασταλτική δράση ενώ ακολουθεί η ένωση **S3** ($K_i=8,25 \mu\text{M}$) με πολύ μικρή διαφορά στη δραστηρότητάς. Οι ενώσεις **S2**, **S20** και **S21** είναι

λιγότερο βιοδραστικές ενώσεις και φαίνεται από τη χημική δομή τους ότι οι αναστολείς που έχουν ένα βαθμό ελευθερίας στην ομάδα του συνδέτη που συνδέει το τμήμα Glc-NHCO με τους αρωματικούς δακτυλίους έχουν μειωμένη ανασταλτική ικανότητα σε σύγκριση με τους αναστολείς στους οποίους ο συνδέτης έχει άκαπτη γεωμετρία κατευθύνοντας έτσι καλύτερα τη θέση των δακτυλίων εντός της β-εσοχής.

Για να δοθεί δομική εξήγηση της αναστολής που προκαλούν και να κατανοηθεί η διαφορά στην ανασταλτική τους δράση, ακολούθησε ο προσδιορισμός της δομής της gmGPb σε σύμπλοκο με κάθε μια από τις ενώσεις αυτές, ώστε να αναλυθούν οι αλληλεπιδράσεις εκείνες οι οποίες είναι απαραίτητες για την αναγνώριση και την πρόσδεση των αναστολέων κυρίως στην περιοχή της β-εσοχής.

9.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

9.2.1 Συλλογή και βελτιστοποίηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν μέσω διάχυσης του διαλύματος των αναστολέων σε σχηματισμένους κρυστάλλους της gmGPb. Ο εμποτισμός των κρυστάλλων έγινε με διάλυμα αναστολέων 10mM στο διάλυμα ανάπτυξης τους στο οποίο είχε επίσης προστεθεί και DMSO (15 % v/v), για 10 h πριν την συλλογή δεδομένων σε θερμοκρασία δωματίου. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων όλων των αναστολέων εκτός του S6 έγινε με συγχροtronική πηγή ακτίνων X, στο σταθμό ID911-2 του Max-lab, στο Lund, σε θερμοκρασία δωματίου. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων της ένωσης S6 έγινε με το περιθλασίμετρο Oxford Diffraction SuperNova στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, με

τη χρήση του ανιχνευτή CCD 135mm, σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο προσδιορισμός της ομάδας χώρου, ο προσδιορισμός του προσανατολισμού του κρυστάλλου, η ολοκλήρωση των περιθλάσεων, η συγχώνευση πλαισίων πειραματικών δεδομένων, η άθροιση των μερικώς καταγεγραμμένων περιθλάσεων και η αναγωγή των δεδομένων έγιναν με το πρόγραμμα Mosflm (Leslie and Powell 2007) για τα δεδομένα των οποίων η συλλογή έγινε με συγχροtronική ακτινοβολία και με το πρόγραμμα CrysAlis (Agilent Technologies UK Ltd 2011) για τα δεδομένα της ένωσης S6.

Η ισοζύγιση και η συγχώνευση των εντάσεων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SCALA του πακέτου προγραμμάτων CCP4 (CCP4 1994). Η βελτιστοποίηση των δομών των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) με το πρόγραμμα REFMAC (CCP4 1994). Το αρχικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση των συμπλόκων και τον υπολογισμό των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $2F_o-F_c$, F_o-F_c ήταν η δομή της gmGPb (διαμόρφωση T) σε ευκρίνεια 1,9 Å (Leonidas et al. unpublished results).

Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας διαφοράς $2F_o-F_c$, έδειξε πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέ-

ντρο όλων των συμπλόκων αναστολέων-ενζύμου που υποδήλωνε τη σύνδεση των ενώσεων σε αυτό. Τα μοριακά μοντέλα των αναστολέων κατασκευάστηκαν με το πρόγραμμα PRODRG (Schuttelkopf and van Aalten 2004), προσαρμόστηκαν στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας μετά από προσαρμογή των γωνιών στρέψης και συμπεριλήφθηκαν στη διαδικασία της βελτιστοποίησης κατά τα τελευταία στάδια της. Ακολούθησε ανοικοδόμηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών COOT (Emsley and Cowtan 2004). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπιζόνταν στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o - F_c$ με σ 1.0 (σ η τυπική απόκλιση της έντασης της περίθλασης). Τέλος πολλαπλοί κύκλοι βελτιστοποίησης με το πρόγραμμα REFMAC είχε ως αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση ατομικών συντεταγμένων (positional refinement) και τη βελτιστοποίηση του ατομικού ιστροπικού συντελεστή θερμοκρασίας B (B factor), βελτιώνοντας την ποιότητα των μοντέλων. Ο έλεγχος της στερεοχη-

μείας των αμινοξικών καταλοίπων έγινε με το πρόγραμμα MolProbity (Chen et al. 2010). Η αξιολόγηση του μοντέλου έγινε πληρώντας τα κριτήρια που αναφέρονται στις παραγράφους 4.7, 4.9.

Οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις van der Waals του αναστολέα με τα αμινοξικά κατάλοιπα του ενζύμου υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα CONTACT (CCP4 1994). Οι δεσμοί υδρογόνου αποδίδονται από το πρόγραμμα CCP4 όταν η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροαρνητικών ατόμων είναι μικρότερη από 3.3 Å και αν η γωνία που σχηματίζεται μεταξύ των δύο αυτών ατόμων και του προηγούμενου (ή επόμενου) είναι μεγαλύτερη από 90°. Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals ορίζονται για μη-υδρογονικά άτομα που απέχουν μεταξύ τους λιγότερο από 4 Å. Τέλος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα γραφικών Rymol (DeLano 2002) για την μοριακή απεικόνιση των τρισδιάστατων μακρομοριακών μορίων. Οι δομές των συμπλόκων κατατέθηκαν στην PDB με τους κωδικούς που παρουσιάζονται στον πίνακα 9.2.

Στον πίνακα παρακάτω παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και της βελτιστοποίησης της δομής των συμπλόκων (οι δείκτες αξιοπιστίας από την

τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου)

Πίνακας 9.2: Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου mGPb-αναστολέων

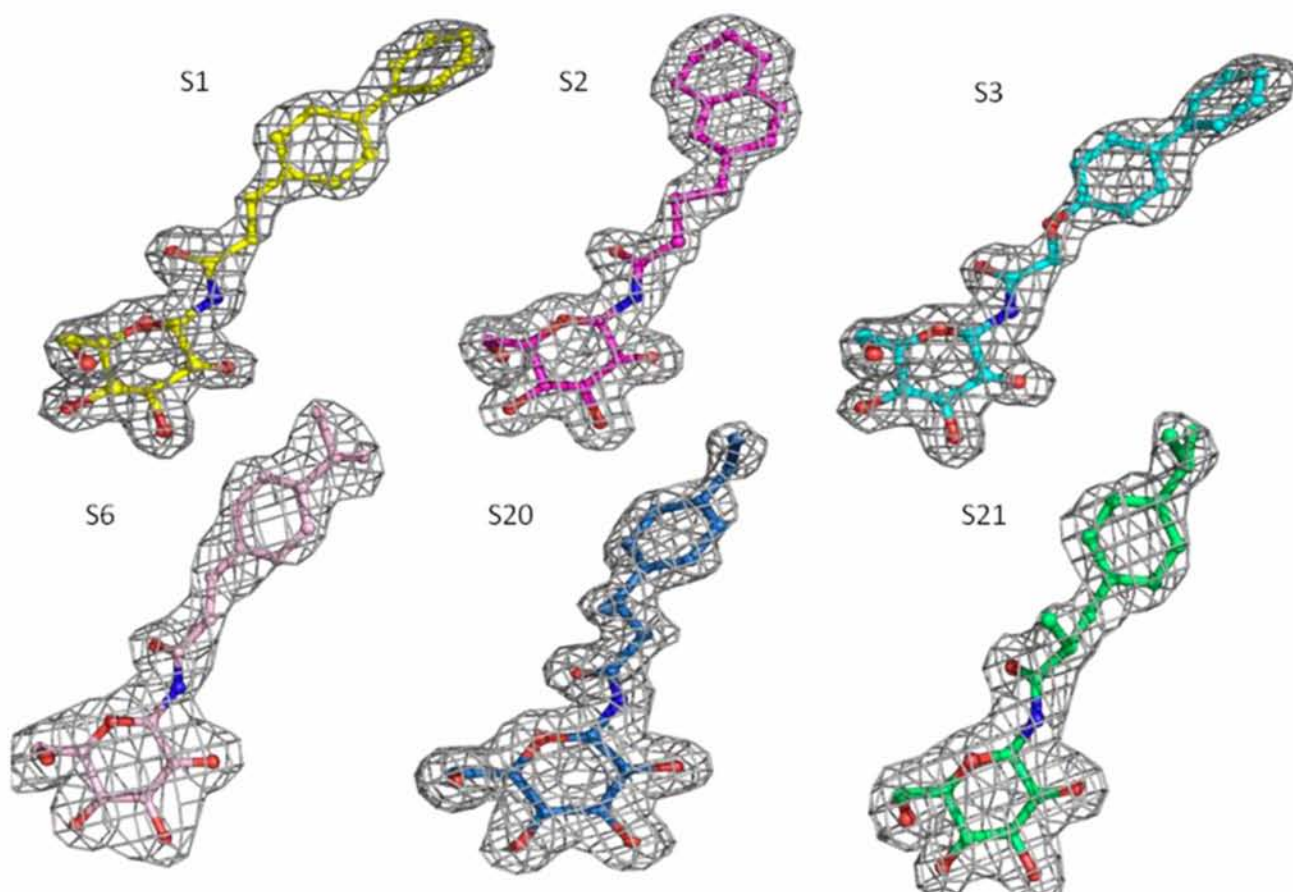
mGPb σύμπλοκο	S1	S2	S3	S6	S20	S21
Στατιστικοί δείκτες συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων						
Ευκρίνεια (Å)	28.83 – 1.99	23.94 – 1.90	23.94 – 2.00	18.23 – 2.45	23.82 – 1.85	23.89 – 2.15
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2.10 – 1.99	2.00 – 1.90	2.11 – 2.00	2.58 – 2.45	1.95 – 1.85	2.27 – 2.15
Μετρήσεις	169449 (17599)	254758 (36440)	104316 (15051)	72136 (10932)	216184 (30152)	242135 (33396)
Μοναδικές περιθλάσεις	63559 (6924)	75897 (10836)	52566 (7918)	33056 (4997)	82325 (11899)	52824 (7533)
Πολλαπλότητα	2.7 (2.5)	3.4 (3.4)	2.0 (1.9)	2.2 (2.2)	2.6 (2.5)	4.6 (4.4)
R_{symm}	0.094 (0.451)	0.055 (0.365)	0.073 (0.347)	0.099 (0.531)	0.056 (0.414)	0.103 (0.452)
Πληρότητα (%)	94.2 (71.3)	98.1 (97.1)	79.7 (83.1)	91.4 (95.6)	98.5 (98.8)	98.4 (97.3)
$\langle I/\sigma I \rangle$	6.2 (2.2)	13.2 (3.2)	7.6 (2.7)	6.3 (1.8)	10.2 (2.3)	8.8 (3.3)
Στατιστικοί δείκτες βελτιστοποίησης						
R_{cryst}	0.165 (0.264)	0.161 (0.242)	0.162 (0.241)	0.187 (0.256)	0.161 (0.271)	0.163 (0.237)
R_{free}	0.189 (0.307)	0.188 (0.254)	0.200 (0.289)	0.234 (0.271)	0.190 (0.286)	0.203 (0.298)
Αριθμός μορίων ύδατος	223	265	295	113	301	208
Απόκλιση r.m.s. από τις ιδεατές τιμές						
στο μήκος δεσμών (Å)	0.008	0.007	0.009	0.005	0.009	0.009
στις γωνίες (°)	1.2	1.2	1.2	1.0	1.3	1.3
Μέση τιμή παράγοντα B (Å²)						

Πρωτεϊνικά άτομα	36.3	31.3	31.0	36.7	32.8	38.9
Μόρια ύδατος	37.4	34.8	36.2	28.7	37.4	37.7
Προσδέτης	38.3	23.6	23.1	27.1	29.6	32.6
PDB code	4MHS	4MI6	4MHO	4MIC	4MI9	4MI3

9.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης

Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας διαφοράς (F_o-F_c και $2F_o-F_c$), όλων των συμπλόκων περιείχε επιπρόσθετη ηλεκτρονική πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, υποδηλώνοντας τη πρόσδεση των

αναστολέων σε αυτό. Ακολούθησε ανάλυση των χαρτών όπου προσδιορίστηκε με ακρίβεια ο προσανατολισμός και η θέση κάθε ατόμου των μορίων των αναστολέων στο σύμπλοκο με την gmGPb (Εικόνα 9.2).



Εικόνα 9.2: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας διαφοράς $2F_o-F_c$ των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δομές των μορίων προσαρμόστηκαν στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ με σ 1.0 πριν από την διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Ακολούθησε ανάλυση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν οι αναστολείς με τα αμινοξικά κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου. Όλοι οι αναστολείς προσδένονται στον καταλυτικό κέντρο με αγκυροβόληση του τμήματος της β-D-γλυκοκυρανόζης στη θέση πρόσδεσης της α-D-γλυκόζης. Οι αλ-

ληλεπιδράσεις που σχηματίζονται από την περιοχή αυτή είναι ίδιες με αυτές που σχηματίζει η γλυκόζη με την rmGPb καθώς και σε άλλα ανάλογα γλυκόζης, αναστολείς της rmGP (Martin et al. 1990, Somsak 2011, Bokor et al. 2013).

Πίνακας 9.3: Εν δυνάμει δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ατόμων των αναστολέων και των ατόμων των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου.

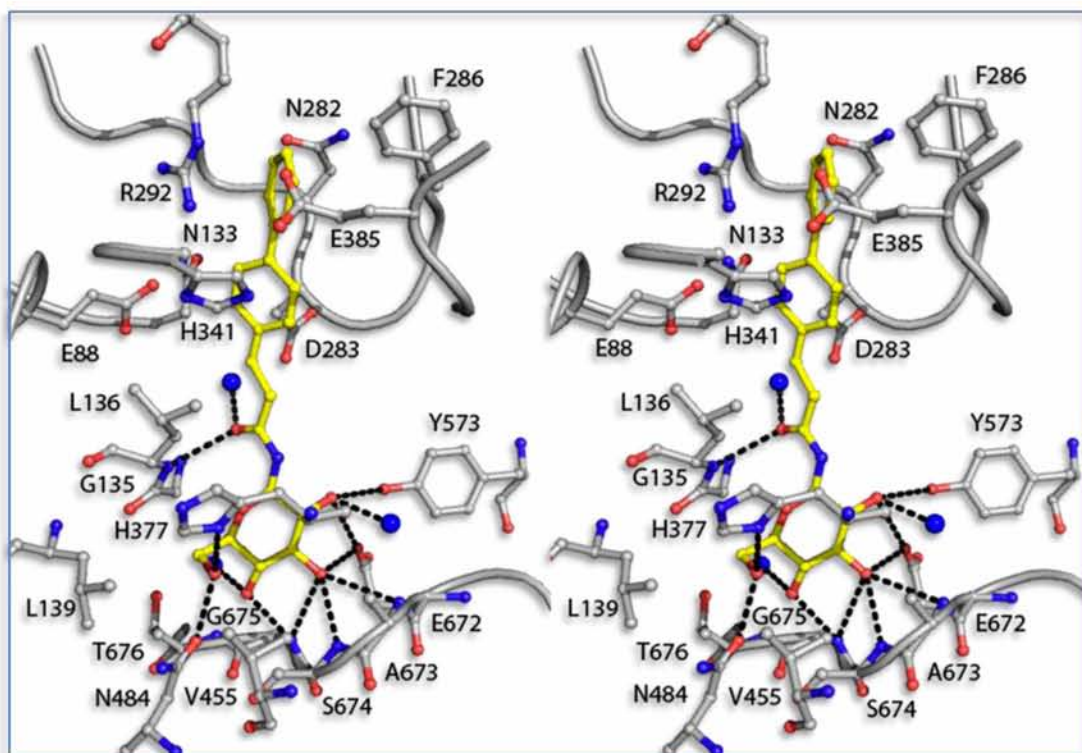
Άτομο αναστολέα	Άτομο πρω-τεΐνης	Απόσταση (Å)					
		S1	S2	S3	S6	S20	S21
O2'	Tyr573 OH	3.2	3.1	3.1	-	3.1	3.2
	Glu672 OE1	3.2	3.2	3.1	3.1	3.0	3.1
	Μόριο ύδατος	2.6	2.6	2.7	2.7	3.2	2.8
	Μόριο ύδατος	-	2.8	2.9	-	2.8	2.7
O3'	Glu672 OE1	2.8	2.8	2.8	2.6	2.8	2.8
	Ala673 N	3.3	3.3	3.3	-	3.3	-
	Ser674 N	3.0	3.0	3.1	3.1	3.0	2.9
	Gly675 N	3.2	3.1	3.3	3.0	3.1	3.0
O4'	Gly675 N	2.8	2.9	2.8	2.8	2.9	2.9
	Μόριο ύδατος	2.7	2.7	2.6	2.6	2.6	2.7
O6'	His377 ND1	2.7	2.7	2.6	2.6	2.7	2.8
	Asn484 OD1	2.7	2.8	2.9	2.9	2.8	2.7
O3	Leu136 N	3.0	-	3.0	3.0	3.2	-
	Μόριο ύδατος	2.8	2.8	3.0	3.1	2.6	-
	Μόριο ύδατος	-	-	3.2	2.9	-	2.7
N1	His377 O	-	2.9	-	-	-	3.3
	Μόριο ύδατος	-	-	2.8	-	-	-
Σύνολο		13	14	16	12	14	13

Οι μικρές διαφορές στον αριθμό των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζουν κατά την πρόσδεση τους οι αναστολείς δεν είναι αρκετές για να εξηγήσουν τις διαφορές στην ανασταλτική τους ικανότητα. Καθώς λοιπόν όλοι οι αναστολείς σχηματίζουν παρόμοιο αριθμό δεσμών υδρογόνων, το ενδιαφέρον στράφηκε προς τις αλληλεπιδράσεις van der Waals που σχηματίζουν οι αναστολείς, καθώς η διαλογή των υποκαταστατών έγινε με σκοπό να αυξηθούν οι μη πολικές αλληλεπιδράσεις της ομάδας R με τα αμινοξέα της β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου.

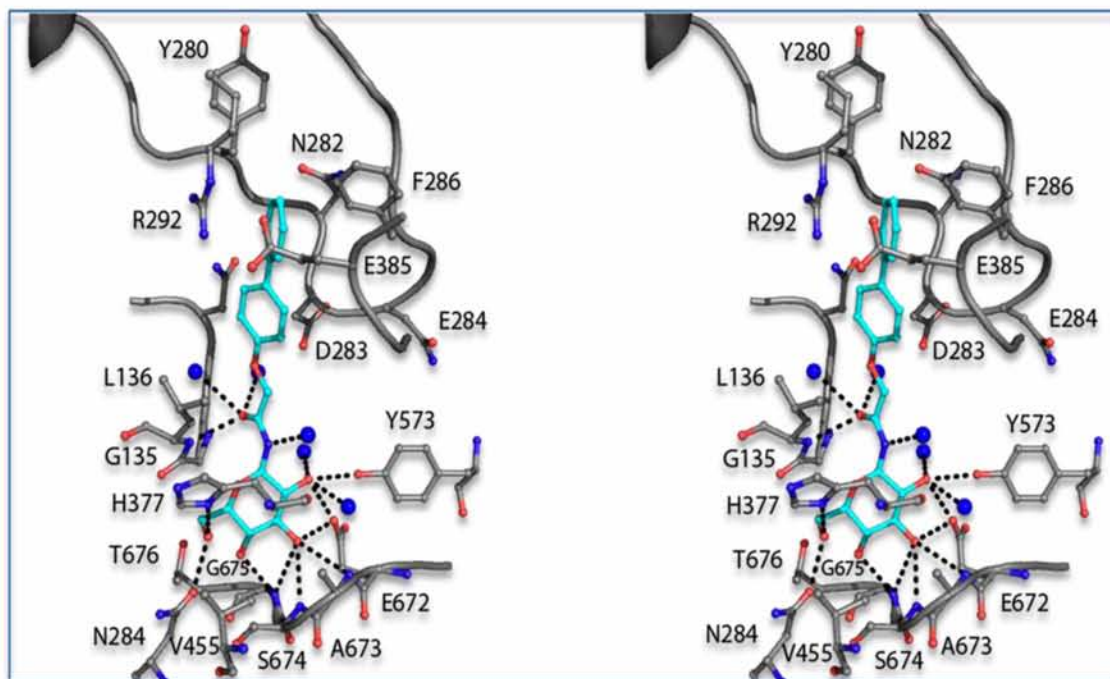
Οι πιο βιοδραστικοί αναστολείς **S1** (K_i 5,14 μ M) και **S6** (K_i 4,98 μ M), οι οποίοι παρουσιάζουν παρόμοια δραστηριότητα σχηματίζουν τον ίδιο αριθμό αλληλεπιδράσεων (100), ενώ ο αμέσως επόμενος σε σειρά δραστηριότητας αναστολέας **S3** (K_i 8,25 μ M), συμμετέχει σε ελάχιστα λιγότερες αλληλεπιδράσεις van der Waals (91). Το ίδιο πρότυπο εμφανίζεται και στους επόμενους δυο σε σειρά αναστολείς **S2** (K_i 48,68 μ M) και **S21** (K_i 75,29 μ M), που σχηματίζουν 78 και 71 αλληλεπιδράσεις αντίστοιχα. Μοναδική

εξαίρεση αποτελεί ο **S20** (K_i 376,87 μ M), ο οποίος σχηματίζει 71 μη πολικές αλληλεπιδράσεις, όπως και ο **S21**, ο οποίος όμως εμφανίζει μια σταθερά αναστολής 5 φορές υψηλότερη από αυτή του **S21**.

Ανάλυση της κρυσταλικής δομής των συμπλόκων της pmGPb με όλους τους αναστολείς έδειξε ότι οι ενώσεις **S1** και **S3** προσδένονται με παρόμοιο τρόπο στο καταλυτικό κέντρο, ενώ οι υποκαταστάτες R και των δυο ενώσεων συμμετέχουν εντός της β-εσοχής σε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων με τα Glu88, Asn133, Tyr280, Asn282, Asp283, Phe286, Arg292, His341, και Glu385 (Εικόνες 9.3, 9.4). Η αντικατάσταση του C=C διπλού δεσμού (**S1**) με την ομάδα CH₂-O (**S3**), στον συνδέτη, δεν προκάλεσε κάποια σημαντική μεταβολή καθώς το οξυγόνο δεν σχηματίζει κανέναν δεσμό υδρογόνου με τα αμινοξέα της περιοχής. Παράλληλα το οξυγόνο αυτό στο σύμπλοκο pmGPb-**S3** σχηματίζει τις ίδιες αλληλεπιδράσεις van der Waals με το αντίστοιχο άτομο άνθρακα στο σύμπλοκο pmGPb-**S1**.



Εικόνα 9.3 Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της ένωσης **S1** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.

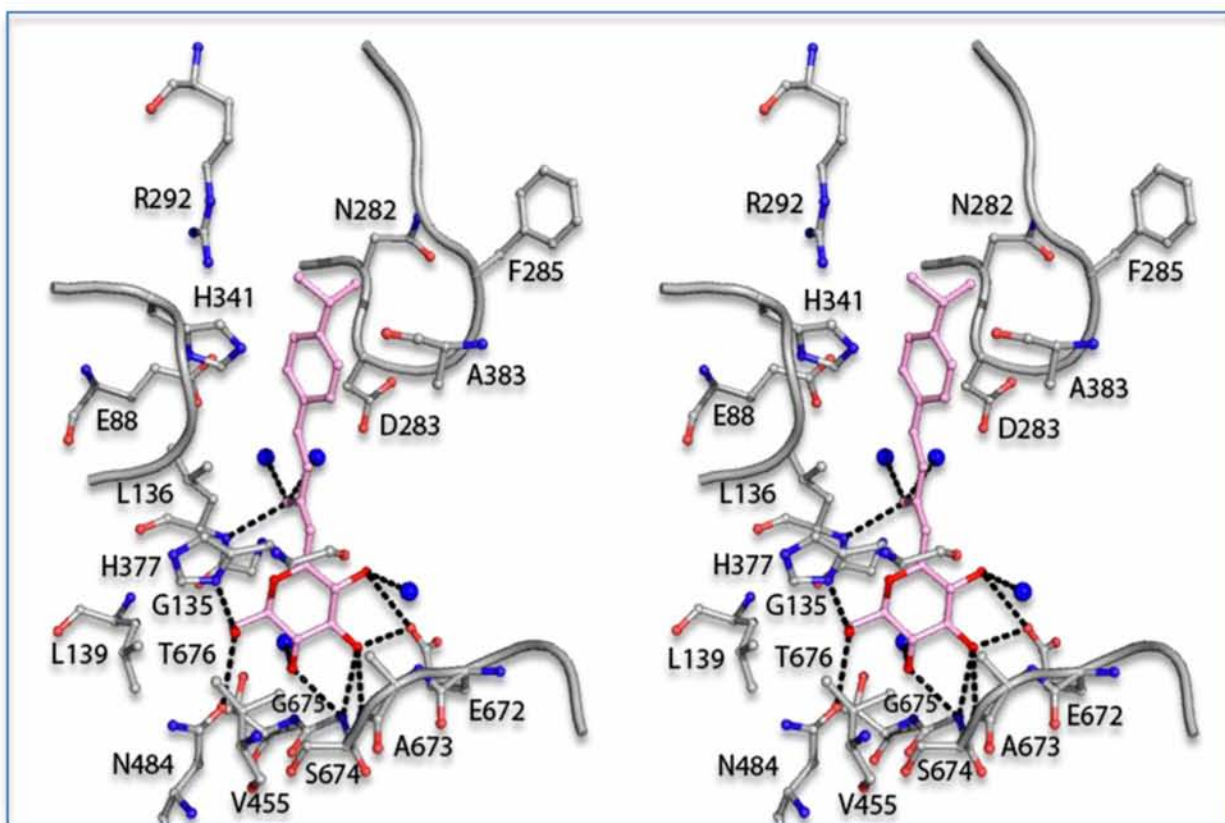


Εικόνα 9.4: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της ένωσης **S3** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.

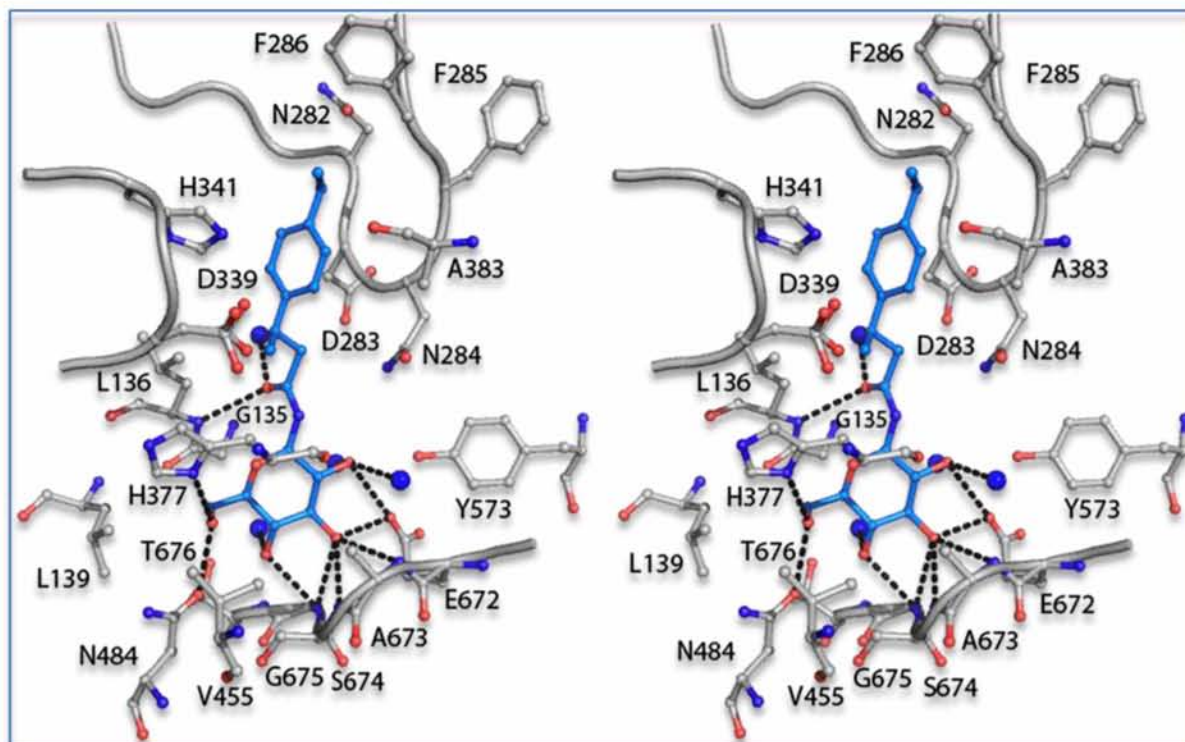
Οι **S6**, **S20**, και **S21** προσδένονται με παρόμοιο τρόπο στην β-εσοχή του καταλυτικού κέντρου αλλά με σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τους **S1** και **S3**, καθώς οι υποκαταστάτες R βρίσκονται πιο κοντά στην περιοχή του βρόχου 280s στην δομή της gmGPb στην ελεύθερη κατάσταση. Η απόσταση μεταξύ των φαινολικών δακτυλίων των **S6**, **S20** και **S21** με τον βρόχο είναι 1,6, 1,8 και 2,6 Å αντίστοιχα.

Η ισοπρόπυλο- ομάδα (**S6**, **S21**) και η αίθυλο-ομάδα (**S20**) των φαινολικών δακτυ-

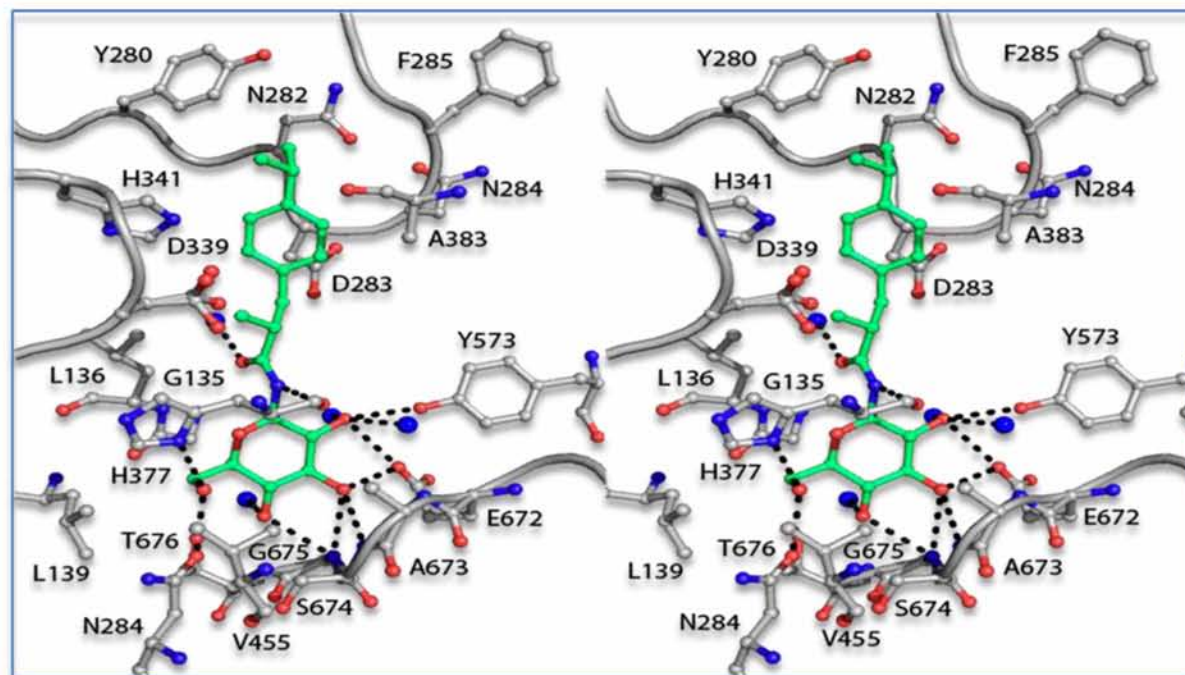
λίων εντοπίζονται στην ίδια θέση στην κρυσταλλική δομή (με μια απόκλιση 0,5 Å) και συμμετέχουν σε παρόμοιες αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα Tyr280, Asn282, Phe285, His341, και Ala383 (Εικόνες 9.5, 9.6, 9.7). Η μεθυλική ομάδα του συνδέτη των **S20** και **S21** προβάλλει προς την ίδια κατεύθυνση και στα δυο σύμπλοκα συμμετέχοντας σε αλληλεπιδράσεις van der Waals με τις πλευρικές αλυσίδες των Leu136 και Asp339.



Εικόνα 9.5: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της **S6** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



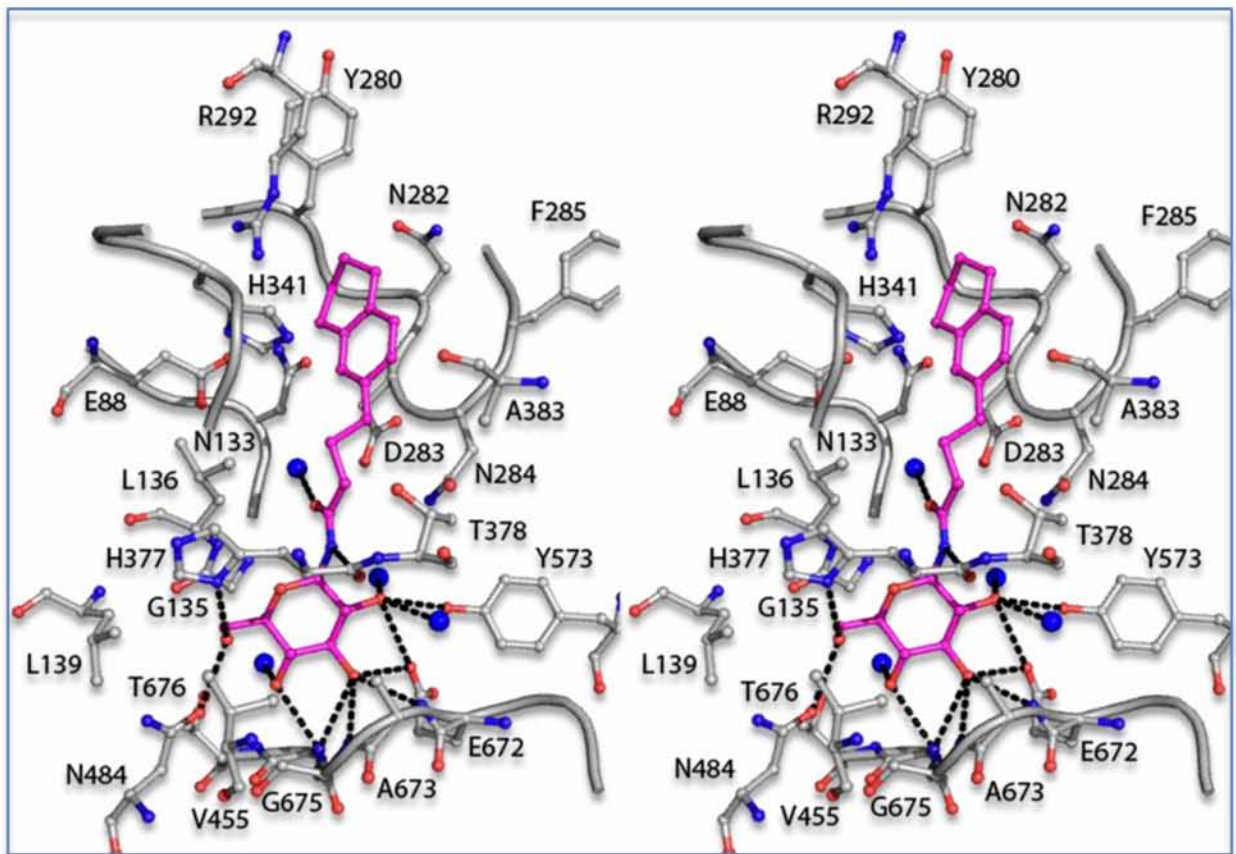
Εικόνα 9.6: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της **S20** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



Εικόνα 9.7: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της **S21** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.

Ο S2 προσδέεται ακολουθώντας το ίδιο πρότυπο με τον S1 αλλά ο συνδέτης έχει διαφορετικό προσανατολισμό ώστε να μπορέσει να τοποθετήσει τον υποκαταστάτη στην ίδια θέση όπου προσδέονται οι δυο φαινολικοί δακτυλίοι των S1 και S3 συμμετέχοντας έτσι στις ίδιες αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα Glu88, Asn133,

Tyr280, Asn282, Asp283, Phe286, Arg292, His341 και Glu385 (Εικόνα 9.8). Φαίνεται λοιπόν ότι ο συνδέτης είναι αρκετά ευέλικτος και υιοθετεί τέτοια διαμόρφωση η οποία επιτρέπει στον R-υποκαταστάτη να προσδεθεί στην καταλληλότερη θέση εντός της υδρόφοβης περιοχής της β-εσοχής.



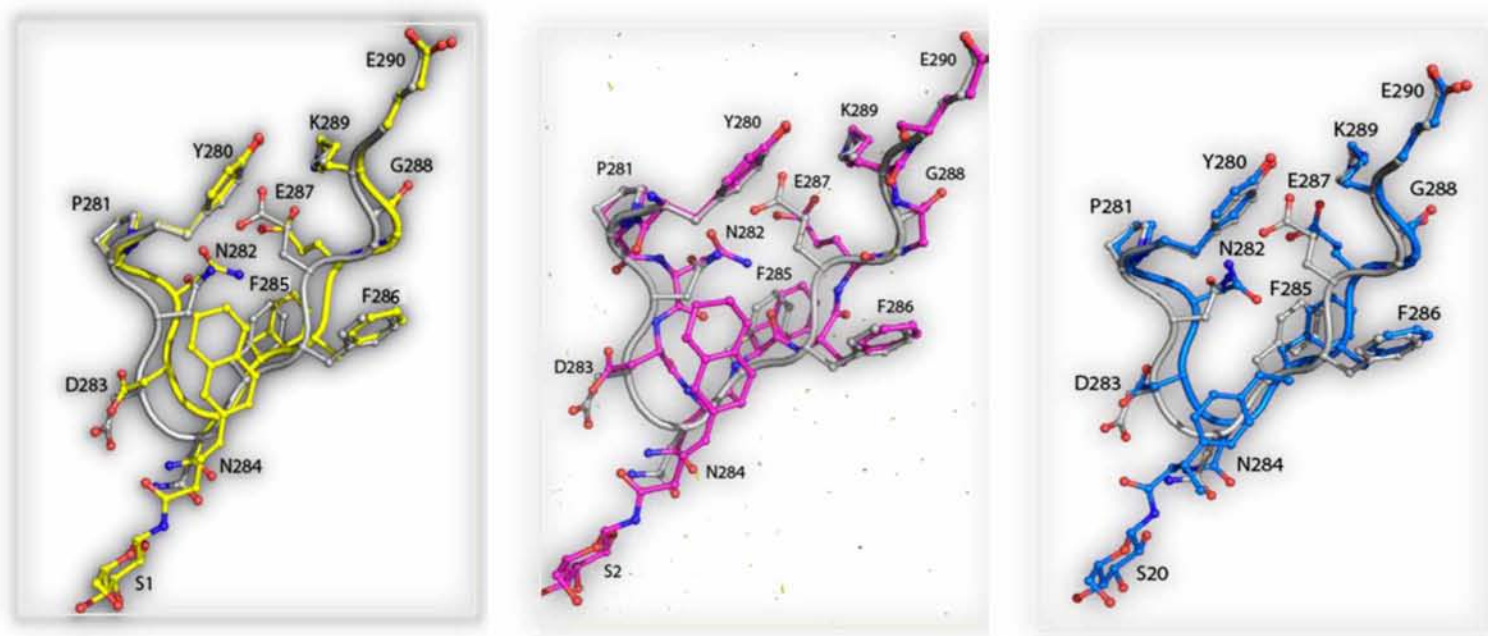
Εικόνα 9.8: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της S2 με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές

Όλοι οι αναστολείς μετά την πρόσδεση τους στο καταλυτικό κέντρο, προκαλούν μεταβο-

λή στη δομή του βρόχου 280s. Φαίνεται λοιπόν πως η παρουσία της R-ομάδας στους

αναστολείς προκαλεί την μετακίνηση του βρόχου από το καταλυτικό κέντρο ώστε να δημιουργηθεί χώρος για την πρόσδεση του αναστολέα. Η υπέρθεση των συμπλόκων των αναστολέων με τη δομή της ελεύθερης mGPb έδειξε πως οι δυο δομές διαφέρουν με τιμή της r.m.s.d. 1.5, 1.2, 2.0, 2.2, 1.2 και 1.2 Å για όλα άτομα των καταλοίπων 282-288 για τα σύμπλοκα **S1**, **S2**, **S3**, **S6**, **S20** και **S21** αντίστοιχα. Απο τις παραπάνω τιμές φαίνεται ότι οι **S1**, **S2** και **S20** προκαλούν

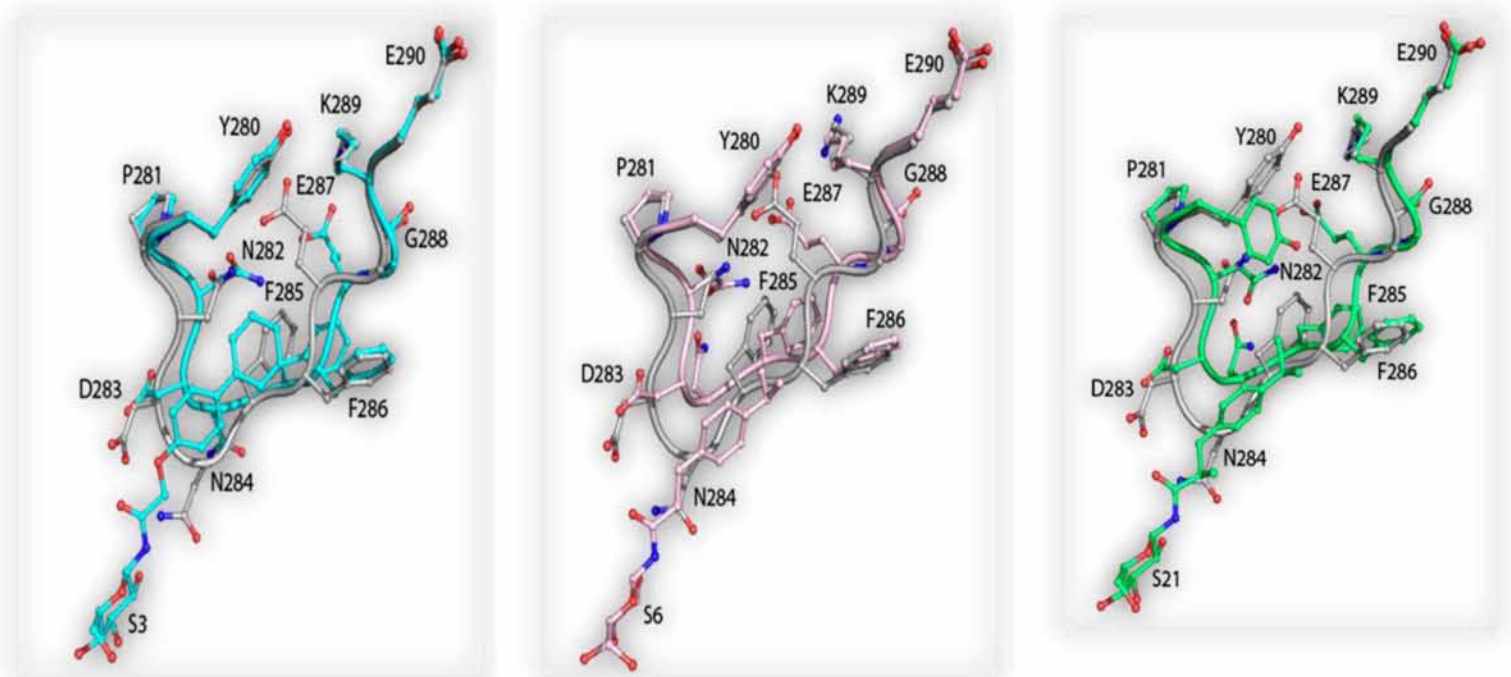
μια μικρή μετατόπιση του βρόχου 280s, ενώ αντίθετα οι **S3**, **S6** και **S21** προκαλούν μια εκτεταμένη διατάραξη στη δομή του. Συγκεκριμένα οι **S1**, **S2** και **S20** προκαλούν περίπου τις ίδιες δομικές μεταβολές στη δομή του βρόχου, με τις πιο εκτεταμένες αλλαγές να αφορούν τα Asn282, Asp283, Asn284, Phe285 και Glu287, χωρίς ωστόσο κανένα απο αυτά να αλλάζει τον προσανατολισμό του (Εικόνα 9.9).



Εικόνα 9.9: Υπέρθεση των συμπλόκων mGPb-S1 (κίτρινο), mGPb-S2 (ροζ), mGPb-S20 (μπλε) με την ελεύθερη mGPb (γκρι).

Στα σύμπλοκα των **S3**, **S6** και **S21** η Asp283 και η Asn284 απομακρύνονται από την θέση τους ώστε να αποφύγουν τη σύγκρουση με τον υποκαταστάτη των αναστολέων, με συνεπακόλουθη μετατόπιση και των υπόλοιπων καταλοίπων του βρόχου. Η Asn284 περιστρέφεται 180° και τοποθετείται ανάμεσα στους φαινολικούς δακτυλίους των Phe285 και Tyr613, δυο αμινοξέα τα οποία συγκροτούν το κέντρο αναστολής,

με αποτέλεσμα την καταστροφή του (Εικόνα 9.10). Αυτή η αναδιάταξη και αποσταθεροποίηση της δομής του βρόχου 280s προκαλεί τη μετάπτωση από την διαμόρφωση R στην T της GP και παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του αναστολέα **2b** της προηγούμενης μέλετης αλλά και σε άλλα σύμπλοκα με αναστολείς που φέρουν ογκώδεις βενζολικούς υποκαταστάτες (Oikonomakos et al. 2002, Nagy et al. 2013)



Εικόνα 9.10:Υπέρθωση των συμπλόκων mGPb-S3 (γαλάζιο), mGPb-S6 (ροζ), mGPb-S21 (πράσινο) με την ελεύθερη mGPb (γκρι).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι το μεγάλο μήκος των υποκαταστατών που προστέθηκε σε συνδυασμό με

την ομάδα του συνδέτη βελτίωσε την ανασταλτική δράση των ενώσεων καθώς αυξήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα της

β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου. Η δραστηριότητα όλων των αναστολέων μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με τις αλληλεπιδράσεις van der Waals, καθώς όσο αυξάνονται οι μη πολικές αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν με κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου τόσο αυξάνεται η βιοδραστικότητα τους.

Η υψηλότερη βιοδραστικότητα που παρατηρήθηκε στους αναστολείς **S1**, **S3** και **S6** μπορεί να αποδοθεί στον υψηλό αριθμό αλληλεπιδράσεων van der Waals που σχηματίζουν σε σύγκριση με τους υπόλοιπους αναστολείς. Στην περίπτωση των **S3** και **S6** ειδικότερα ο μεγάλος αριθμός των αλληλεπιδράσεων προσέφερε την απαραίτητη ενέργεια ώστε να αντισταθμιστεί το ενεργειακό κόστος της μετατόπισης του βρόχου 280s με αποτέλεσμα την αύξηση στην βιοδραστικότητα τους.

Οι αναστολείς **S2** και **S21** ακολουθούν στην σειρά δραστηριότητας λόγω της ελάττωσης του αριθμού των αλληλεπιδράσεων. Ειδικότερα στην περίπτωση του **S2** φαίνεται ξεκάθαρα ο ρόλος των αλληλεπιδράσεων αυτών, καθώς αν και η μετατόπιση του βρόχου 280s είναι πιο εκτεταμένη όπως και το ενεργειακό κόστος που την ακολουθεί σε σύγκριση με τον **S21**, εντούτοις οι επιπλέον 7 αλληλεπιδράσεις van der Waals συνέβαλαν στην υψηλότερη σταθερά αναστολής από αυτή του **S21**.

Ο **S20** είναι ο λιγότερο βιοδραστικός αναστολέας της παρούσας μελέτης και σχηματίζει τις ίδιες αλληλεπιδράσεις van der Waals με τον **S21**. Η διαφορά στην δραστηριότητά τους μπορεί να αποδοθεί στο διαφορετικό τρόπο σύνδεσης τους στο καταλυτικό κέντρο, καθώς ο **S20** προκαλεί εκτεταμένη αναδιοργάνωση στη δομή του βρόχου 280s ειδικά στα Asp283 και Asn284. Το γεγονός ότι ο **S20** δεν σχηματίζει επιπλέον αλληλεπιδράσεις που θα αντισταθμίσουν το ενεργειακό κόστος της μετατόπισης έχει ως αποτέλεσμα η σταθερά αναστολής του να μειώνεται 5 φορές σε σύγκριση με τον **S21**.

Σύγκριση της δομής των αναστολέων **S1** και **S3** με την δομή της ένωσης που χρησιμοποιήθηκε ως κρίωμα (Εικόνα 9.1) (PDB ID: 2QLN) για το σχεδιασμό των αναστολέων, έδειξε ότι οι ενώσεις προσδένονται με παρόμοιο τρόπο στο καταλυτικό κέντρο. Ωστόσο στη δομή των **S1**, **S3** απουσιάζει το δεύτερο οξυγόνο στην ομάδα του συνδέτη που υπάρχει στην ένωση οδηγό, με αποτέλεσμα ο **S1** και ο **S3** να μη συμμετέχουν στις επιπλέον αλληλεπιδράσεις μέσω μορίων ύδατος με τα Gly134, Gly135, Gly137, Asp283. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι πιθανόν υπεύθυνες για την ελαχίστα χαμηλότερη τιμή της σταθεράς αναστολής

της ένωσης οδηγού σε σύγκριση με τον **S1** και **S3**.

Η ένωση **F** που παρουσιάζεται στον Πίνακα 9.2, αποτελεί την πιο βιοδραστική ένωση που έχει βρεθεί με συνδέτη την ομάδα NHCO . Καθώς δεν υπάρχει κρυσταλλική δομή του συμπλόκου gmGPb-F , δεν ήταν δυνατή η δομική σύγκριση, ώστε να αποσαφηνιστεί η διαφορά στην βιοδραστικότητα τους. Παρόλα αυτά φαίνεται πως η παρουσία του διπλού δεσμού C=C δίπλα στον συνδέτη -NHCO- και η 2-νάφθυλο-ομάδα του υποκαταστάτη **R** είναι ο λόγος της αυξημένης βιοδραστικότητας του σε σύγκριση με τους αναστολείς που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη.

10. Μελέτη αναλόγων N-ακυλ-β-D-γλυκοκυρανοζυλουργίας

Τα αποτελέσματα της προηγούμενης μελέτης έδειξαν ότι η ισχυρή ανασταλτική ικανότητα των N-ακυλ-β-D-γλυκοκυρανοζυλαμινών οφείλεται στην ομάδα του συνδέτη (NHCO), η οποία συνδέει την γλυκοκυρανόζη με υποκαταστάτες **R** διαφορετικού μεγέθους και μήκους. Η ύπαρξη του συνδέτη έχει ως αποτέλεσμα ο υποκαταστάτης να επεκτείνεται περαιτέρω εντός της β-εσοχής σχηματίζοντας ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με τα κατάλοιπα της περιοχής που συνεισφέρουν στην ενέργεια

σύνδεσης των αναστολέων, οδηγώντας έτσι σε ελάττωση της σταθεράς αναστολής. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες με αναστολείς που έφεραν παραλλαγές στο μήκος του συνδέτη οι οποίες έδειξαν ότι πιο βιοδραστικοί ήταν αυτοί που έφεραν πιο εκτεταμένη δομή αυξάνοντας το μήκος του συνδέτη με την ομάδα -NHCONHCO- καθοδηγώντας τον **R**-υποκαταστάτη πιο βαθιά στην περιοχή της β-εσοχής (Somsak et al. 2008, Praly and Vidal 2010, Somsak 2011, Hayes et al. 2014).

Ο συνδέτης -NHCONHCO- έχει το βέλτιστο μήκος και τη στερεοχημεία καθώς αναστολείς που φέρουν μικρότερο μήκος συνδέτη είναι λιγότερο βιοδραστικοί, ενώ αυτοί με μεγαλύτερο μήκος προκαλούν διατάραξη στη δομή του καταλυτικού κέντρου (Hayes et al. 2014). Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αυξηθεί το μήκος του συνδέτη -NHCO- που χρησιμοποιήθηκε στην προηγούμενη ομάδα αναστολέων, ώστε να επεκτεθεί περαιτέρω ο υποκαταστάτης **R** εντός της β-εσοχής αυξάνοντας τις αλληλεπιδράσεις με την περιοχή αυτή.

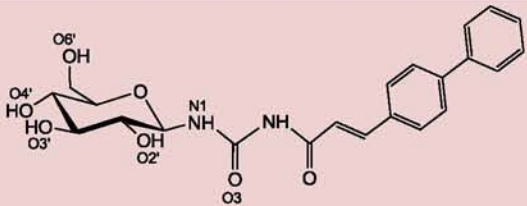
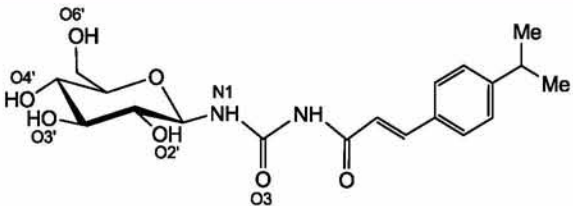
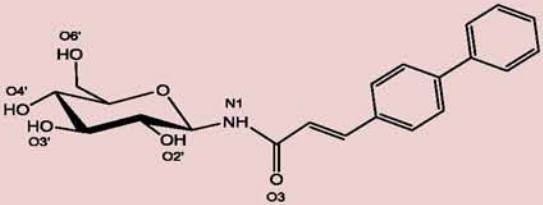
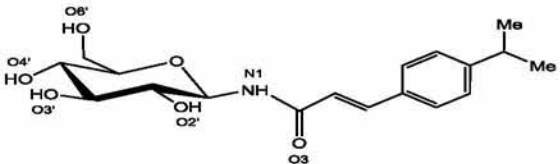
Οι δυο πιο βιοδραστικές ενώσεις της προηγούμενης μελέτης **S1** και **S6** χρησιμοποιήθηκαν ως ικρίωμα για την σύνθεση δυο νέων αναστολέων από το εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστή-

μιο Θεσσαλίας στους οποίους ο συνδέτης –NHCO– αντικαταστάθηκε από τον –NHCONHCO– ενώ διατηρήθηκαν οι ίδιοι υποκαταστάτες R.

10.1 Κινητικές μελέτες

Στον πίνακα παρακάτω παρουσιάζεται η χημική δομή των υπο μελέτη ενώσεων καθώς και οι σταθερά αναστολής (K_i) για την gmGPb.

Πίνακας 10.1: Ονομασία, χημική δομή και τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i) των αναστολέων που μελετήθηκαν, καθώς και της ενώσεων **S1**, **S6** που χρησιμοποιήθηκαν ως κρίωμα.

Ένωση	Χημική δομή	K_i (μM)
4a		$4,95 \pm 0,29$
4b		$2,53 \pm 0,07$
S1		$5,14 \pm 0,77$
S6		$4,98 \pm 0,58$

Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών έδειξαν ότι και δυο οι ενώσεις, **4a** και **4b** είναι ισχυροί αναστολείς και παρουσιάζουν συναγωνιστική αναστολή σε

σχέση με υπόστρωμα Glc-1-P, σε σταθερές συγκεντρώσεις γλυκογόνου και AMP. Το μεγαλύτερο μήκος του συνδέτη φαίνεται ότι δεν βελτίωσε την δραστικότητα του

αναστολέα **4a** σε σύγκριση με την ένωση οδηγό **S1** καθώς παρουσιάζουν παρόμοια σταθερά αναστολής (K_i) (4,15 και 5,14 μM αντίστοιχα). Ωστόσο ο **4b** είναι πιο βιοδραστικός από τη αντίστοιχη ένωση οδηγό **S6** καθώς η σταθερά αναστολής (K_i) μειώθηκε περίπου 2 φορές (2,53 και 4,98 μM αντίστοιχα). Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι το μεγαλύτερο μήκος στο συνδέτη βελτίωσε την ανασταλτική δράση μόνο της ένωσης με τον ισοπρότυλο-φαίνυλο-υποκαταστάτη.

Για να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής που προκαλούν οι **4a** και **4b** και να κατανοηθεί η διαφορά στην ανασταλτική τους δράση, τόσο μεταξύ τους όσο και με τις ενώσεις οδηγούς, ακολούθησε ο προσδιορισμός της δομής της gmGPb σε σύμπλοκο με κάθε μια από τις ενώσεις, ώστε να αναλυθούν οι αλληλεπιδράσεις εκείνες οι οποίες είναι απαραίτητες για την αναγνώριση και την πρόσδεση των αναστολέων κυρίως στην περιοχή της β -εσοχής.

10.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

10.2.1 Συλλογή και βελτιστοποίηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν μέσω διάχυσης του διαλύματος των αναστολέων σε σχηματισμένους κρυστάλλους της gmGPb. Ο εμποτισμός των

κρυστάλλων με διάλυμα αναστολέων (10 mM) στο διάλυμα ανάπτυξης των κρυστάλλων στο οποίο είχε προστεθεί DMSO (15 % v/v), για 5 h πριν την συλλογή δεδομένων σε θερμοκρασία δωματίου. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων όλων των αναστολέων έγινε με συγχροτρονική πηγή ακτίνων X, στο σταθμό ID911-2 του Max-lab, στο Lund, σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο προσδιορισμός της ομάδας χώρου, ο προσδιορισμός του προσανατολισμού του κρυστάλλου, η ολοκλήρωση των περιθλάσεων, η συγχώνευση πλαισίων πειραματικών δεδομένων, η άθροιση των μερικώς καταγεγραμμένων περιθλάσεων και η αναγωγή των δεδομένων έγιναν με το πρόγραμμα Mosflm (Leslie and Powell 2007). Η ισοζύγηση και η συγχώνευση των εντάσεων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SCALA του πακέτου προγραμμάτων CCP4 (CCP4 1994). Η βελτιστοποίηση των δομών των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum – likelihood) με το πρόγραμμα REFMAC (CCP4 1994). Το αρχικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση των συμπλόκων και τον υπολογισμό των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $2F_o - F_c$, $F_o - F_c$ ήταν η δομή της gmGPb (διαμόρφωση T) σε ευκρίνεια 1,9 Å (Leonidas et al. unpublished results).

Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας διαφοράς $2F_o-F_c$, στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης έδειξε πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο όλων των συμπλόκων αναστολέων-ενζύμου που υποδήλωνε τη σύνδεση των ενώσεων σε αυτό. Τα μοριακά μοντέλα των αναστολέων κατασκευάστηκαν με το πρόγραμμα PRODRG (Schuttelkopf and van Aalten 2004), προσαρμόστηκαν στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας μετά από προσαρμογή των γωνιών στρέψης και συμπεριλήφθηκαν στη διαδικασία της βελτιστοποίησης κατά τα τελευταία στάδια. Ακολούθησε ανοικοδόμηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, διεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών COOT (Emsley and Cowtan 2004). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπιζόνταν στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ με σ 1.0 (σ η τυπική απόκλιση της έντασης της περίθλασης). Τέλος πολλαπλοί κύ-

κλοι βελτιστοποίησης με το πρόγραμμα REFMAC είχε ως αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση ατομικών συντεταγμένων (positional refinement) και τη βελτιστοποίηση του ατομικού ιστροπικού συντελεστή θερμοκρασίας B (B factor), βελτιώνοντας την ποιότητα των μοντέλων. Ο έλεγχος της στερεοχημείας των αμινοξικών καταλοίπων έγινε με το πρόγραμμα MolProbity (Chen et al. 2010). Η αξιολόγηση του μοντέλου έγινε πληρώντας τα κριτήρια που αναφέρονται στις παραγράφους 4.7, 4.9.

Οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις van der Waals του αναστολέα με τα αμινοξικά κατάλοιπα του ενζύμου υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα CONTACT (CCP4 1994). Οι δεσμοί υδρογόνου αποδίδονται από το πρόγραμμα CCP4 όταν η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροαρνητικών ατόμων είναι μικρότερη από 3.3 Å. Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals ορίζονται για μη-υδρογονικά άτομα που απέχουν μεταξύ τους λιγότερο από 4 Å. Τέλος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα γραφικών Rymol (DeLano 2002) για την μοριακή απεικόνιση των τρισδιάστατων μακρομοριακών μορίων. Οι δομές των συμπλόκων κατατέθηκαν στην PDB με τους κωδικούς που παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.2.

Στον Πίνακα 10.2 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και της βελτιστοποίησης της δομής των συμπλόκων (οι

δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου).

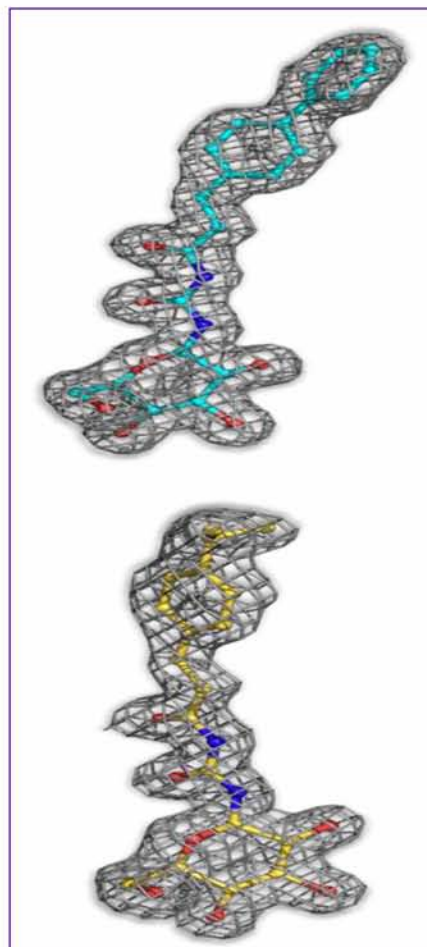
Πίνακας 10.2: Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου gmGPb-αναστολέων.

gmGPb σύμπλοκο	4a	4b
Στατιστικοί δείκτες συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων		
Ευκρίνεια (Å)	38.36 – 1.80	38.88 – 1.80
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	1.85 – 1.80	1.85 – 1.80
Μετρήσεις	412305 (58512)	231307 (33365)
Μοναδικές περιθλάσεις	90140 (6609)	81770 (12263)
Πολλαπλότητα	4.6 (4.5)	2.8 (2.7)
R_{sym}	0.078 (0.324)	0.130 (0.347)
Πληρότητα (%)	99.7 (99.9)	91.5 (94.6)
$\langle I/\sigma I \rangle$	11.6 (4.2)	5.5 (1.8)
Στατιστικοί δείκτες βελτιστοποίησης		
R_{crist}	0.174 (0.256)	0.194 (0.261)
R_{free}	0.198 (0.295)	0.230 (0.296)
Αριθμός μορίων ύδατος	364	384

<i>Απόκλιση r.m.s. από τις ιδεατές τιμές</i>		
στο μήκος δεσμών (Å)	0.009	0.009
στις γωνίες (°)	1.3	1.4
<i>Μέση τιμή παράγοντα B (Å²)</i>		
Πρωτεϊνικά άτομα	29.4	32.6
Μόρια ύδατος	37.9	40.3
Προσδέτης	22.9	22.5
PDB code	4YI3	4YI5

10.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης

Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας διαφοράς (F_o-F_c και $2F_o-F_c$), των συμπλόκων περιείχε επιπρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, υποδηλώνοντας τη πρόσδεση των αναστολέων σε αυτό. Ακολούθησε ανάλυση των χαρτών όπου προσδιορίστηκε με ακρίβεια με ακρίβεια ο προσανατολισμός και η θέση κάθε ατόμου των μορίων των αναστολέων **4a** και **4b** στο σύμπλοκο με την pmGPb (Εικόνα 10.1). Ακολούθησε ανάλυση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν οι αναστολείς με τα αμινοξικά κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου του μορίου. Όλοι οι αναστολείς προσδένονται στον καταλυτικό κέντρο με αγκυροβό-



Εικόνα 10.1: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας διαφοράς $2F_o-F_c$ των αναστολέων **4a** (γαλάζιο) και **4b** (κίτρινο) στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δομές των μορίων προσαρμόστηκαν στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ με σ 1.0 πριν από την διαδικασία της βελτιστοποίησης

ληση του τμήματος της β-D-γλυκοπυρανόζης στη θέση πρόσδεσης της α-D-γλυκόζης, όπως

παρατηρήθηκε και σε όλους τους υπόλοιπους αναστολείς της παρούσας διατριβής.

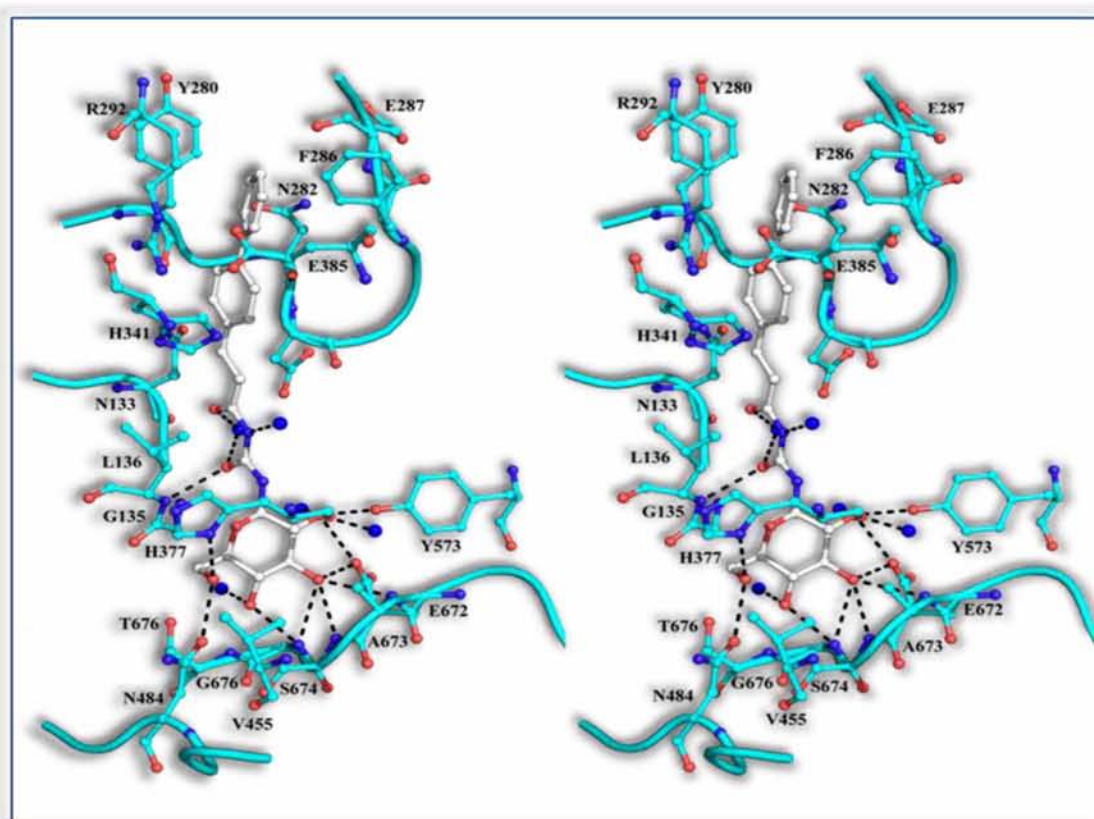
Πίνακας 10.3: Εν δυνάμει δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ατόμων των αναστολέων **4a**, **4b** και των ατόμων των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου. Συγκριτικά αναφέρονται και εν δυνάμει δεσμοί υδρογόνου των **S1** και **S6**.

Άτομο αναστο- λέα	Άτομο πρω- τεΐνης	Απόσταση (Å)			
		S1	S6	4a	4b
O2'	Tyr573 OH	3.2	-	3.1	3.1
	Glu672 OE1	3.2	3.1	3.2	3.2
	Μόριο ύδατος	2.6	2.7	2.8	2.8
	Μόριο ύδατος	-	-	2.7	2.9
O3'	Glu672 OE1	2.8	2.6	2.8	2.9
	Ala673 N	3.3	-	3.3	3.3
	Ser674 N	3.0	3.1	3.0	3.1
	Gly675 N	3.2	3.0	3.3	3.3
O4'	Gly675 N	2.8	2.8	2.8	2.9
	Μόριο ύδατος	2.7	2.6	2.7	2.6
O6'	His377 ND1	2.7	2.6	2.7	2.7
	Asn484 OD1	2.7	2.9	2.8	2.9
N1	Μόριο ύδατος	-	-	-	2.9
O3	Leu136 N	3.0	3.0	3.0	3.0
	Μόριο ύδατος	2.8	3.1	3.2	3.2
	Μόριο ύδατος	-	2.9	-	3.2
	Μόριο ύδατος	-	-	-	3.3
N4	Μόριο ύδατος	-	-	2.7	3.2
O6	Μόριο ύδατος	-	-	2.9	2.8
	Μόριο ύδατος	-	-	2.8	2.7
Σύνολο		13	12	17	20

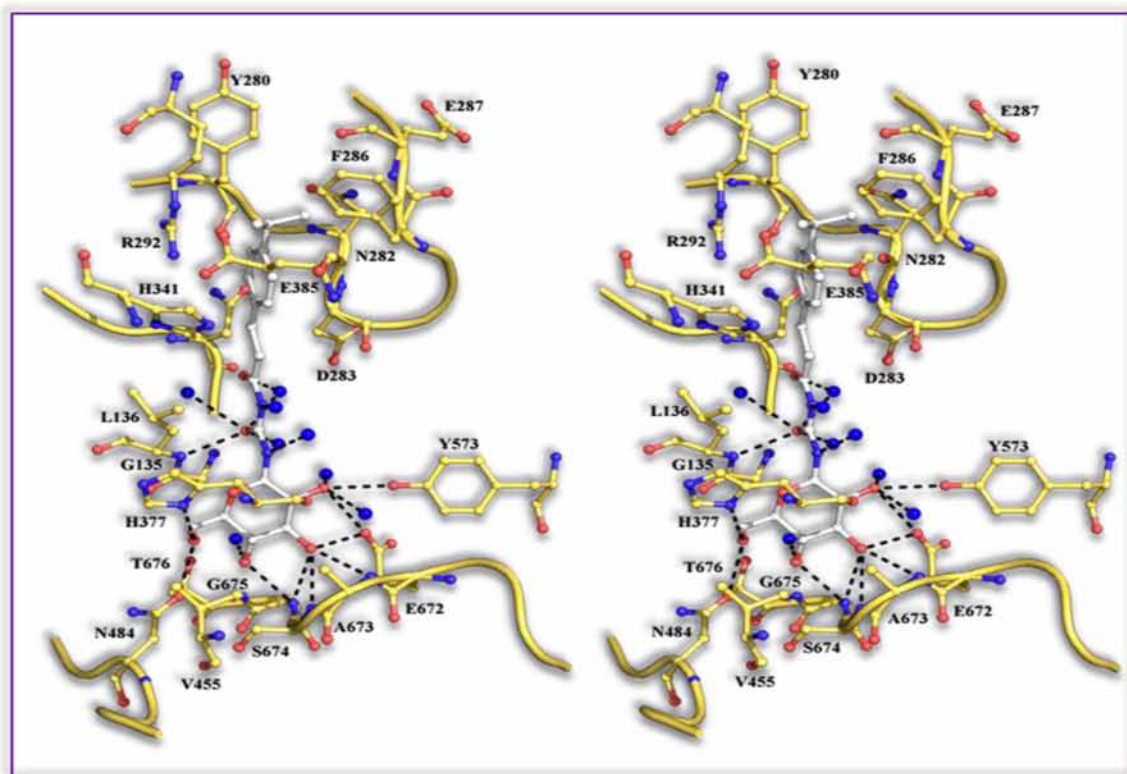
Οι αναστολείς **4a** και **4b** μετά την πρόσδεση τους σχηματίζουν περισσότερους δεσμούς υδρογόνου (17, 20 αντίστοιχα) και αλληλεπιδράσεις van der Waals (125, 103) σε σύγκριση με τις ενώσεις οδηγούς S1 και S6 (12, 13 δεσμοί υδρογόνου και 100 αλληλεπιδράσεις van der Waals). Ενούτοις ο μεγαλύτερος αριθμός αλληλεπιδράσεων φαίνεται πως δεν οδηγεί σε βελτίωση της δραστηριότητας των **4a** και **4b** αφού δεν

παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στις τιμές της σταθεράς αναστολής τους.

Οι **4a** και **4b** προσδέονται με παρόμοιο τρόπο στο καταλυτικό κέντρο και οι αλειφατικές αλυσίδες του υποκαταστάτη και των δυο ενώσεων συμμετέχουν σε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων van der Waals εντός της β-εσοχής με τα αμινοξέα Glu88, Asn133, Tyr280, Asn282, Asp283, Phe286, Arg292, His341, και Glu385 ενώ ο **4a** συμμετέχει σε επιπλέον αλληλεπιδράσεις με το Glu287 (Εικόνες 10.2, 10.3).



Εικόνα 10.2: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της ένωσης **4a** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



Εικόνα 10.3: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων της **4b** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.

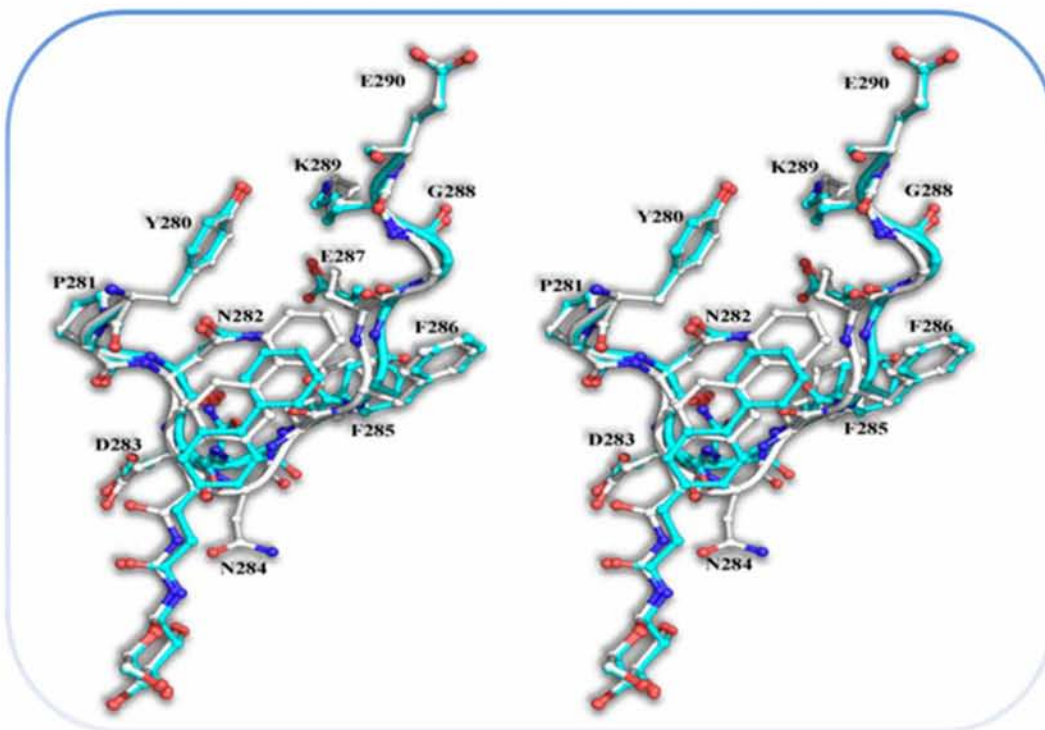
Οι δυο αναστολείς μετά την πρόσδεση τους προκαλούν σημαντική αλλαγή στη διαμόρφωση του βρόχου 280s σε σύγκριση με τη δομή της mGPb απουσία αναστολέα. Η παρουσία της μακριάς αλειφατικής αλυσίδας εκτοπίζει το βρόχο από το καταλυτικό κέντρο. Υπέρθωση των συμπλόκων των αναστολέων με τη δομή της mGPb στην ελεύθερη κατάσταση έδειξε τη μετατόπιση για τα άτομα των αμινοξέων του βρόχου 280s ενώ προέκυψε και τιμή r.m.s.d. 3,2 Å και για τα σύμπλοκα των **4a**, **4b**. Συγκρίνοντας την τιμή αυτή με την τιμή που

προέκυψε από την μεταβολή στη διαμόρφωση που προκαλείται από τη σύνδεση των **S1** και **S6** (1,5 και 2,2Å, αντίστοιχα) είναι προφανές ότι οι νέοι αναστολείς προκαλούν μια πιο εκτεταμένη δομική μεταβολή στο βρόχο σε σύγκριση με τις αρχικές ενώσεις. Και στα δυο σύμπλοκα το κατάλοιπο Asn284 περιστρέφεται 180° και απομακρύνεται από τη θέση που κατείχε εντός της β-εσοχής (3,8 Å για την θέση του C^α) και τοποθετείται ανάμεσα στους φαινολικούς δακτυλίους της Phe285 και Tyr613, κατάλοιπα τα οποία σχηματίζουν το κέντρο

αναστολής, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της εισόδου ενός μεγάλου καναλιού το οποίο οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Η αλλαγή στην διαμόρφωση της Asn284 έχει ως επακόλουθο την μετατόπιση και των υπόλοιπων καταλοίπων του βρόχου εκτός της περιοχής της β-εσοχής. Αυτή η αναδιάταξη και η αποσταθεροποίηση της δομής του βρόχου 280s προκαλεί την μετάπτωση από τη διαμόρφωση R στην T της GP και παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των αναστολέων **2b**, **S3**, **S6** και **S21** αλλά και σε άλλα σύμπλοκα με αναστολείς που φέρουν ογκώδεις βενζολικούς υποκαταστάτες. Ακολούθησε υπέρθεση των συμπλόκων **4a-S1** και **4b-S6** με σκοπό να δοθεί μια δομική εξήγηση της ομοιότητας (**4a**) και της βελτίωσης (**4b**) της ανασταλτικής δραστηριότητας των αναστολέων.

Οι **4a** και **S1** συμμετέχουν σε ένα παρόμοιο δίκτυο δεσμών υδρογόνου με αμινοξικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου. Η επιπλέον ομάδα $-NHCO-$ στον συνδέτη της ένωσης **4a** επιτρέπει τον σχηματισμό επιπλέον δεσμών υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος, που δεν παρατηρούνται στο σύμπλοκο της **S1**, με τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Asp283 και Asp339 και τις

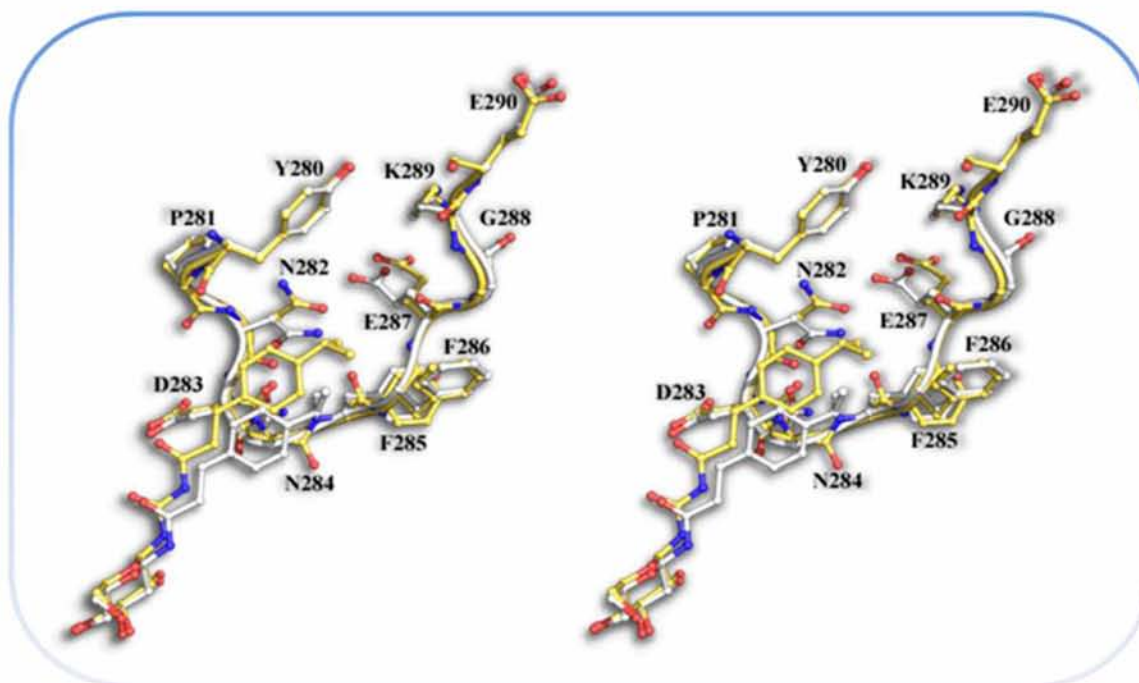
κύριες αλυσίδες των Gly134, Leu136, και Gly137. Παρά το γεγονός ότι ο σύνδετης τοποθετεί τη διφαινυλο-ομάδα της **4a** πιο βαθιά στη β-εσοχή οι δυο αναστολείς σχηματίζουν παρόμοιο αριθμό αλληλεπιδράσεων van der Waals. Μια άλλη σημαντική διαφορά στον τρόπο σύνδεσης των δυο αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο είναι η έκταση της μετατόπισης του βρόχου 280s που προκαλούν. Ο **S1** προκαλεί μικρή μετατόπιση του βρόχου ενώ ο **4a** μετά την πρόσδεση επάγει μια εκτεταμένη αλλαγή της διαμόρφωσης όλων των αμινοξέων του βρόχου (r.m.s.d. 1,72 Å ύστερα από υπέρθεση των καταλοίπων 282-287 των δυο συμπλόκων) (Εικόνα 10.4). Αυτή η δομική μεταβολή προκαλείται από την τοποθέτηση της διφαινυλο-αλειφατικής ομάδας πιο βαθιά στη β-εσοχή λόγω του μεγαλύτερου μήκους του συνδέτη. Ωστόσο οι επιπλέον δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος που σχηματίζει η ένωση **4a** σε αντίθεση με την **S1**, φαίνεται ότι αντισταθμίζουν το ενεργειακό κόστος της εκτεταμένης μετατόπισης του βρόχου 280s με αποτέλεσμα η δραστηριότητα των δυο αναστολέων να είναι παρόμοια.



Εικόνα 10.4: Στερεοσκοπική απεικόνιση της υπέρθεσης της δομής των συμπλόκων **4a** (λευκό)-S1 (γαλάζιο).

Οι ενώσεις **4b** και **S6** σχηματίζουν επίσης παρόμοιο αριθμό δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων van der Waals. Η επιπλέον ομάδα $-NHCO-$ στον συνδέτη της ένωσης **4b** επιτρέπει, και σε αυτή την περίπτωση, τον σχηματισμό επιπλέον δεσμών υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος, που δεν παρατηρούνται στο σύμπλοκο του **S6**, με τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Glu88 και Asp283 και τις κύριες αλυσίδες των Gly134 και Leu136. Η δομική μεταβολή που προκαλείται από την πρόσδεση των δυο

αναστολέων στο βρόχο 280s είναι παρόμοια, και ο βρόχος υιοθετεί την ίδια διαμόρφωση και στα δυο σύμπλοκα (rmsd 0,98 Å ύστερα από υπέρθεση των καταλοίπων 282-287 των δυο συμπλόκων) (Εικόνα 10.5). Συνεπώς η αύξηση στην ανασταλτική ισχύ της ένωσης **4b** σε σύγκριση με την **S6**, μπορεί να αποδοθεί στους επιπρόσθετους δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος που σχηματίζει, οι οποίοι απουσιάζουν από το σύμπλοκο της gmGPb-S6.



Εικόνα 10.5: Στερεοσκοπική απεικόνιση της υπέρθεσης της δομής των συμπλόκων **4b** (γαλάζιο) – S6 (γκρι).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως σύγκριση της δομής των **S1** και **S6** με τη δομή της ένωσης **F** (Πίνακας 9.1) έδειξε ότι η απουσία του δεύτερου οξυγόνου στη ομάδα του συνδέτη και ως εκ τούτου η απώλεια των αλληλεπιδράσεων μέσω μορίων ύδατος με τα αμινοξέα Gly134, Gly135, Gly137, Asp283 που σχηματίζονται μέσω αυτού του οξυγόνου στο σύμπλοκο gmGPb-F, είναι πιθανόν η αιτία της ισχυρότερης ανασταλτικής δραστηριότητας της ένωσης **F** (2,3μM) έναντι των **S1** και **S6**. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις δημιουργούνται στο σύμπλοκο της ένωσης **4b**, με αποτέλεσμα οι δύο ενώσεις να εμφανίζουν ίδια δραστηριότητα. Ακολούθησε συγκριτική δο-

μική ανάλυση των **4a** και **4b** με τις **26** και **25** (Nagy et al. 2012) αντίστοιχα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.4. Οι ενώσεις αυτές είναι δομικά οι πιο όμοιες ενώσεις με την **4a** και **4b** που έχουν μελετηθεί για την ανασταλτική δράση τους έναντι της gmGPb.

Πίνακας 10.4: Χημική δομή και σταθερά αναστολής των ενώσεων **25** και **26**

Ένωση	Χημική Δομή	K_i (μM)
25		2.3 (Nagy et al. 2012)
26		3.7 (Nagy et al. 2012)

Οι **4a** και **26** προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο με παρόμοια διαμόρφωση με μόνη διαφορά στον διφαίνυλο- δακτύλιο, ο οποίος εμφανίζει μια κλίση 37°. Οι μικρές δομικές διαφορές που εμφανίζονται μεταξύ των δυο συμπλόκων στην περιοχή της β-εσοχής περιλαμβάνουν την εκτόπιση ενός μορίου ύδατος από το δεύτερο φαίνυλο δακτύλιο της **4a** και μια μικρή μετακίνηση των αμινοξέων 286-287 (0,2-0,5 Å) από την εσοχή ώστε προσθεθεί ο αναστολέας. Η παρουσία του C=C διπλού δεσμού, στη **4a**, δίπλα από την ομάδα -NHCO- του συνδέτη μειώνει την κινητικότητα του υποκαταστάτη με αποτέλεσμα η ισοπρότυλο-φαίνυλο-ομάδα να τοποθετείται βαθύτερα εντός της β-εσοχής. Παρόλα αυτά η διαφορά στον αριθμό αλληλεπιδράσεων van der Waals που σχηματίζουν οι **4a** και **26** είναι μικρή (125 και 113 αντίστοιχα). Οι **4b** και **25** προσδένονται με παρόμοια διαμόρφωση με μόνη διαφορά τον ισοπρότυλο-φαίνυλο δακτύλιο της **4b** ο οποίος εμφανίζει μια κλίση 34°, σε σύγκριση με τη θέση του μεθυλο-φαίνυλο-δακτύλιου της **25**. Μετά την πρόσδεση του ο **4b** εκτοπίζει τρία συντηρημένα μόρια ύδατος και σχηματίζει δυο επιπλέον δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος και εννέα αλληλεπιδράσεις van der Waals σε σύγκριση με τον **25** ενώ, η διαμόρφωση της β-εσοχής δεν εμφανίζει σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δύο σύμπλοκα.

Η επέκταση της ομάδας του συνδέτη μεταξύ της γλυκοπυρανόζης και της αλειφατικής αλυσίδας με την προσθήκη της -NHCO- ομάδας βελτίωσε την ανασταλτική δράση των αναστολέων που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη μελέτη. Οι νέοι αναστολείς **4a** και **4b** παρουσίασαν ισχυρή ανασταλτική δραστηριότητα με σταθερά αναστολής (K_i) 4,9μM και 2,5μM αντίστοιχα. Μετά την πρόσδεση τους και οι δυο σχηματίζουν επιπλέον αλληλεπιδράσεις σε σύγκριση με τις ενώσεις **S1** και **S6** αλλά και με τις ενώσεις **25**, **26** που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Η δραστηριότητα τους ωστόσο δεν σημείωσε σημαντική αύξηση, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο ενεργειακό κόστος της εκτόπισης συντηρημένων μορίων ύδατος από το καταλυτικό κέντρο. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν το σημαντικό ρόλο των μορίων ύδατος στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό αναστολέων, καθώς σχηματίζουν κρίσιμες αλληλεπιδράσεις οι οποίες συντελούν στην αναγνώριση και την πρόσδεση των ενώσεων στο καταλυτικό κέντρο.

11. Μελέτες C-1,2,4-τριάζολο γλυκοπυρανονουκλεοζιτών

Όπως αναφέρθηκε ένα σημαντικό δομικό χαρακτηριστικό των αναστολέων της GP είναι η ομάδα του συνδέτη η οποία συνδέει μια ομάδα R με την γλυκοπυρανόζη. Η αντικατάσταση της ομάδας -NHCO- από ετεροκυκλικούς δακτυλίους οδήγησε σε βελτίωση της

βιοδραστικότητας των αναστολέων για την rmGP (Benlifa et al. 2006, Benlifa et al. 2009, Chrysina et al. 2009, Toth et al. 2009, Bokor et al. 2010, Bokor et al. 2013).

Αναστολείς οι οποίοι έφεραν ως συνδέτη την 1,2,4-οξαδιαζόλη εμφάνισαν ισχυρή ανασταλτική ισχύ (11-38μM) (Benlifa et al. 2006, Toth et al. 2009) ενώ αντίθετα η χρήση της 1,3,4-οξαδιαζόλης οδήγησε σε αναστολείς με μειωμένη βιοδραστικότητα (Chrysina et al. 2005, Kun et al. 2011). Ανάλογες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και με άλλες ομάδες όπως το βενζιμιδαζόλιο και το βενζοθειαζόλιο (Chrysina et al. 2005), η σπίρο-υδαντοΐνη (Oikonomakos et al. 2002) και η σπίρο-οξαθειαζόλη (Elek et al. 2005) ενώ η ένωση που φέρει ως συνδέτη την σπίρο-οξαθειαζολίνη και την 2-νάφθυλο ομάδα ως υποκαταστάτη R αποτελούσε τον πλέον ισχυρό αναστολέα ($K_i=160$ nM) του καταλυτικού κέντρου (Nagy et al. 2009) έως σήμερα. Η υψηλή βιοδραστικότητα αυτών των ενώσεων αποδίδεται στον δεσμό υδρογόνου που σχηματίζει ο συνδετής με το άτομο O της κύριας αλυσίδας του His377.

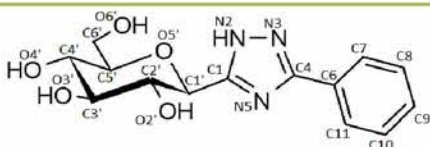
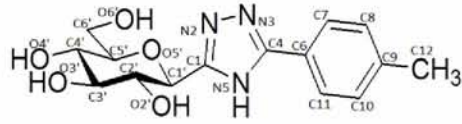
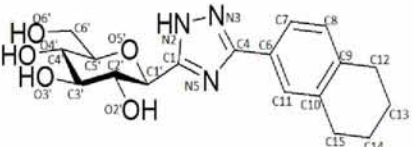
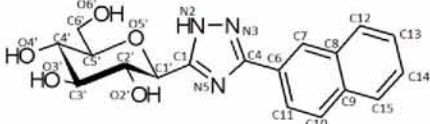
Μελέτες αναστολέων που έφεραν ως συνδέτη τον 1,2,3- τριαζολικό δακτύλιο απέκάλυψαν πως η χρήση του οδηγεί σε σημαντική αύξηση της αναστολής (K_i της τάξης των μM) με τον αναστολέα που έφερε ως υποκαταστάτη την 2-νάφθυλο ομάδα να αποτελεί τον πιο βιοδραστικό της ομάδας (Chrysina et al. 2009, Bokor et al. 2010). Περαιτέρω υποκατάσταση

στη θέση 4 ή 5 του δακτυλίου δεν βελτίωσε τη ανασταλτική ισχύ (Goyard et al. 2014, Goyard et al. 2015). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης οδήγησαν στη σύνθεση μιας νέας ομάδας αναστολέων που έφεραν ως συνδέτη τον 1,2,4-τριαζολικό δακτύλιο και ως υποκαταστάτες αλειφατικές ομάδες διαφορετικού μεγέθους. Οι αναστολείς αυτοί εμφάνισαν σταθερά αναστολής (K_i) της τάξης nM έναντι της rmGPb (Bokor et al. 2013, Kun et al. 2014). Οι ενώσεις αυτές συντέθηκαν από το εργαστήριο του Prof. László Somsák του τμήματος Οργανικής Χημείας, του Πανεπιστημίου του Debrecen, Ουγγαρίας και παραχωρήθηκαν, στο πλαίσιο συνεργασίας, στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Σκοπός της μελέτης τους ήταν να επιβεβαιωθεί η βιοδραστικότητα των αναστολέων στο φαρμακευτικό στόχο για τον σχεδιασμό αντιδιαβητικών φαρμάκων, την hIGPa και να προσδιοριστεί η δομή των συμπλόκων των ενώσεων με την rmGPb ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής που προκαλούν.

11.1 Κινητικές μελέτες

Στον πίνακα 11.1 παρουσιάζεται η χημική δομή των ενώσεων καθώς και η σταθερά αναστολής (K_i) έναντι της hIGPa, αλλά και έναντι της rmGPa που προσδιορίστηκε για συγκριτικούς λόγους. Η επεξεργασία των κινητικών αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Grafit (Leatherbarrow 2007).

Πίνακας 11.1: Ονομασία, χημική δομή και τιμή σταθεράς αναστολής (K_i) των αναστολέων

Ένωση	Χημική Δομή	hlGPa K_i (μM)	rmGPa K_i (μM)
KS114		$1,35 \pm 0,05$	$1,74 \pm 0,139$
KS242		$0,283 \pm 0,027$	$0,283 \pm 0,015$
KS382		$0,216 \pm 0,03$	$0,236 \pm 0,012$
KS389		$0,172 \pm 0,012$	$0,172 \pm 0,009$

Όλες οι ενώσεις εμφάνισαν ισχυρή ανασταλτική δράση ακολουθώντας το μοντέλο της συναγωνιστικής αναστολής ως προς το υπόστρωμα Glc-1-P. Η ανασταλτική ισχύ τους είναι παρόμοια για την ηπατική (hlGPa) και την μυϊκή ισομορφή (rmGPa) ενώ οι τιμές K_i που υπολογίστηκαν είναι σε συμφωνία με τις αντίστοιχες τιμές που υπολογίστηκαν για την rmGPb (Kun et al. 2014) (Πίνακας 11.1). Οι πλέον βιοδραστικοί αναστολείς είναι ο **KS389** και ο **KS382** που φέρουν μια 2-νάφθυλο και μια 1,2,3,4-τετραύδρο-νάφθυλο ομάδα αντίστοιχα

ενώ ακολουθεί η ένωση **KS242** που φέρει ως υποκαταστάτη μια βένζυλο ομάδα. Η ένωση **KS114**, φέρει ως υποκαταστάτη μια φαίνυλο ομάδα και είναι περίπου 8 φορές λιγότερη βιοδραστική από την ένωση **KS389**, υποδεικνύοντας ότι το μεγαλύτερο μέγεθος του υποκαταστάτη συμβάλλει στην αύξηση της βιοδραστικότητας. Από τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών φαίνεται ότι οι ενώσεις δεν εμφανίζουν επιλεκτικότητα για κάποια από τρία ισοένζυμα (hlGPa, rmGPa, rmGPb), καθώς αναστέλλουν και τα τρία με παρόμοια ισχύ.

11.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

11.2.1 Συλλογή και βελτιστοποίηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Με στόχο τη διερεύνηση της δομικής βάσης της αναστολής διεξήχθη προσδιορισμός της δομής της gmGPb σε σύμπλοκο με κάθε μια από τις ενώσεις. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν μέσω διάχυσης του διαλύματος των αναστολέων σε σχηματισμένους κρυστάλλους της gmGPb. Ο εμποτισμός των κρυστάλλων έγινε με διάλυμα αναστολέων 10mM στο διάλυμα ανάπτυξης τους στο οποίο είχε επίσης προστεθεί και DMSO (15 % v/v), για 3 h πριν την συλλογή δεδομένων σε θερμοκρασία δωματίου. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων όλων των αναστολέων έγινε με συγχροtronική πηγή ακτίνων X, στο σταθμό ID911-2 του Max-lab, στο Lund, σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο προσδιορισμός της ομάδας χώρου, ο προσδιορισμός του προσανατολισμού του κρυστάλλου, η ολοκλήρωση των περιθλάσεων, η συγχώνευση πλαισίων πειραματικών δεδομένων, η άθροιση των μερικώς καταγεγραμμένων περιθλάσεων και η ανηγώγη των δεδομένων έγιναν με το πρόγραμμα Mosflm (Leslie and Powell 2007). Η ισοζύγηση και η συγχώνευση των εντάσεων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SCALA του πακέτου προγραμμάτων CCP4 (CCP4 1994). Η βελτιστοποίηση των δομών των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με τη

μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) με το πρόγραμμα REFMAC (CCP4 1994). Το αρχικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση των συμπλόκων και τον υπολογισμό των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $2F_o - F_c$, $F_o - F_c$ ήταν η δομή της gmGPb (διαμόρφωση T) σε ευκρίνεια 1,9 Å (Leonidas et al. unpublished results).

Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o - F_c$, έδειξε πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο όλων των συμπλόκων αναστολέων-ενζύμου που υποδήλωνε τη σύνδεση των ενώσεων σε αυτό. Τα μοριακά μοντέλα των αναστολέων κατασκευάστηκαν με το πρόγραμμα JLigand (CCP4 1994), προσαρμόστηκαν στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας μετά από προσαρμογή των γωνιών στρέψης και συμπεριλήφθηκαν στη διαδικασία της βελτιστοποίησης κατά τα τελευταία στάδια της. Ακολούθησε ανοικοδόμηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών COOT (Emsley and Cowtan 2004). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπίζονταν στον

χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ με σ 1.0 (σ η τυπική απόκλιση της έντασης της περίθλασης). Τέλος πολλαπλοί κύκλοι βελτιστοποίησης με το πρόγραμμα REFMAC είχε ως αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση ατομικών συντεταγμένων (positional refinement) και τη βελτιστοποίηση του ατομικού ισοτροπικού συντελεστή θερμοκρασίας B (B factor), βελτιώνοντας την ποιότητα των μοντέλων. Ο έλεγχος της στερεοχημείας των αμινοξικών καταλοίπων έγινε με το πρόγραμμα MolProbity (Chen et al. 2010). Η αξιολόγηση του μοντέλου έγινε πληρώντας

τα κριτήρια που αναφέρονται στις παραγράφους 4.7, 4.9. Τέλος χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα γραφικών Rymol (DeLano 2002) και LigPlot (Wallace et al. 1995) για την μοριακή απεικόνιση των τρισδιάστατων μακρομοριακών μορίων. Στον πίνακα 11.2 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και της βελτιστοποίησης της δομής των συμπλόκων (οι δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου).

Πίνακας 11.2: Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας δεδομένων και βελτιστοποίησης των συμπλόκων των αναστολέων

rmGPb -σύμπλοκα	KS114	KS242	KS382	KS389
Στατιστικοί δείκτες συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων				
Ευκρίνεια (Å)	38.33 – 2.00	38.37 – 1.80	38.38 – 1.80	38.38 – 1.75
Απώτερη στοιβάδα (Å)	2.11 – 2.00	1.90 – 1.80	1.90 – 1.80	1.84 – 1.75
Μετρήσεις	259033	408747	413844	369575
Μοναδικές περιθλάσεις	61240	88657	88495	90698
Πολλαπλότητα	4.2 (4.1)	4.6 (4.5)	4.7 (4.6)	4.1 (3.7)
R_{symm}	0.096 (0.437)	0.060 (0.403)	0.052 (0.408)	0.050 (0.427)
Πληρότητα (%)	94.1 (96.3)	98.5 (97.6)	98.1 (97.0)	93.2 (95.5)
$\langle I/\sigma I \rangle$	8.0 (3.0)	14.1 (3.5)	16.4 (3.6)	15.1 (2.9)
Στατιστικοί δείκτες βελτιστοποίησης				
R_{cryst}	0.161 (0.219)	0.160 (0.232)	0.161 (0.235)	0.165 (0.282)
R_{free}	0.197	0.187	0.186	0.185 (0.318)

	(0.237)	(0.267)	(0.274)	
Αριθμός μορίων ύδατος	272	300	319	319
Απόκλιση r.m.s. από τις ιδεατές τιμές				
στο μήκος των δεσμών (Å)	0.010	0.009	0.010	0.010
στις γωνίες (°)	1.31	1.28	1.37	1.43
Μέση τιμή παράγοντα B (Å²)				
Άτομα πρωτεΐνης	30.85	31.35	31.89	31.29
Μόρια ύδατος	34.24	36.45	38.14	38.16
Προσδέτης	18.57	19.33	19.68	19.60

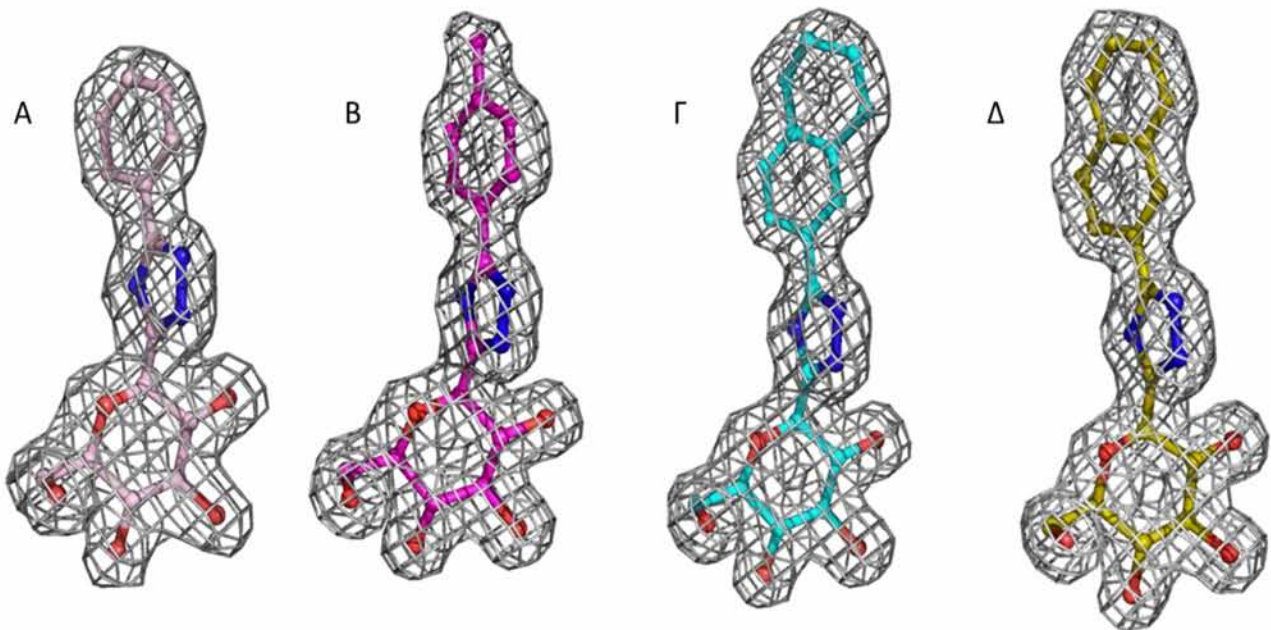
11.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης

Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας ($F_o - F_c$ και $2F_o - F_c$) για όλα τα σύμπλοκα ήταν υψηλής ποιότητας (Εικόνα 11.1) υποδεικνύοντας τη σύνδεση τους στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Επιπροσθέτως, στα σύμπλοκα **rmGPb-KS382** και **rmGPb-KS389** εξευρέθηκε ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου, υποδηλώνοντας την πρόσδεση ενός μορίου του κάθε αναστολέα και στο κέντρο αυτό. Ακολούθησε ανάλυση των χαρτών όπου προσδιορίστηκε με ακρίβεια ο προσανατολισμός και η θέση των ατόμων των μορίων των αναστολέων στο σύμπλοκο με την **rmGPb** (Εικόνα 11.1). Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας των **KS382** και **KS389** υπέδειξε ότι τα δυο αυτά μόρια κατά την πρόσδεση τους στο νέο αλλοστερικό κέντρο

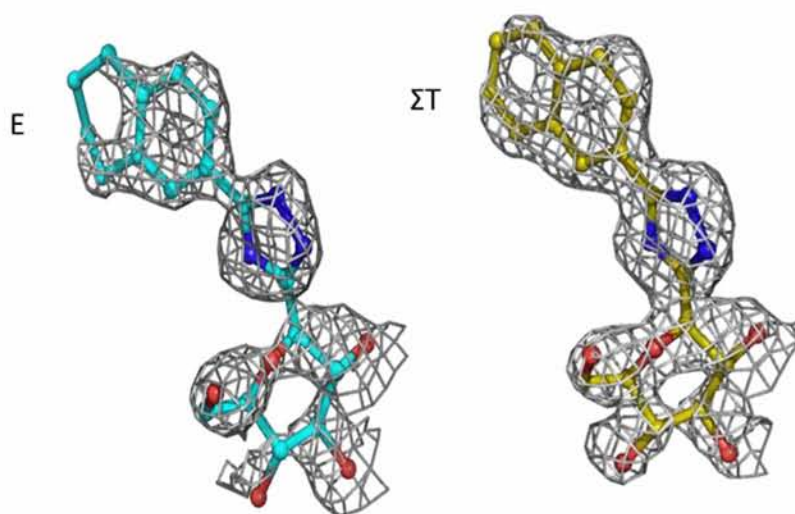
υιοθετούν διαφορετικές διαμορφώσεις από αυτές που έχουν κατά τη σύνδεση τους στο καταλυτικό κέντρο. Έτσι, οι δακτύλιοι του υποκαταστάτη R βρίσκονται σε αντίθετη θέση σε σχέση με την τριάζολο ομάδα (Εικόνα 11.2). Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας των μορίων που προσδέονται στο νέο αλλοστερικό κέντρο υπέδειξε πως η σχετική πληρότητα της κατάληψης από τους αναστολείς στο κέντρο αυτό είναι μικρότερη του 1.0 (στο καταλυτικό κέντρο είναι 1.0). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως το καταλυτικό είναι το πρωτοταγές κέντρο σύνδεσης και έχει σημαντικά μεγαλύτερη αγκιστεία για τον αναστολέα από εκείνη που έχει το νέο αλλοστερικό. Η πρόσδεση του αναστολέα στο νέο αλλοστερικό κέντρο φαίνεται πως οφείλεται στην υψηλή σχετικά με την K_i συγκέντρωση (10 mM) του διαλύματος του αναστολέα που χρησιμοποιήθηκε

για το σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεΐνης – αναστολέα στα κρυσταλλογραφικά πειράματα. Θα πρέπει εντούτοις να σημειωθεί πως και στους άλλους δυο αναστολείς (**KS114**, **KS242**) που χρησιμοποιήθηκε η

ίδια συγκέντρωση διαλύματος αναστολέα για το σχηματισμό των συμπλόκων πρωτεΐνης-αναστολέα δεν παρατηρήθηκε σύνδεση στο νέο αλλοστερικό κέντρο.



Εικόνα 11.1: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ των Α) **KS114**, Β) **KS242** Γ) **KS382**, Δ) **KS389** στο καταλυτικό του ενζύμου. Οι δομές των μορίων προσαρμόστηκαν στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ με σ 1.0 πριν από την διαδικασία της βελτιστοποίησης.



Εικόνα 11.2: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ των Ε) **KS382**, ΣΤ) **KS389** στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Οι δομές των μορίων προσαρμόστηκαν στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ με σ 1.0 πριν από την διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Στη συνέχεια, αναλύθηκαν οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν οι αναστολείς με τα αμινοξικά κατάλοιπα και τα μόρια ύδατος του καταλυτικού και του νέου αλλοστερικού κέντρου του ώστε να

βρεθούν οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις κυρίως στην περιοχή της β-εσοχής που συμβάλλουν στη σύνδεση των αναστολέων και στην αυξημένη βιοδραστικότητα τους.

Πίνακας 11.3: Εν δυνάμει δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ατόμων των αναστολέων και των ατόμων των αμινοξέων του καταλυτικού (αριστερά) και του νέου αλλοστερικού κέντρου (δεξιά) στον κρύσταλλο.

Άτομο αναστο- λέα	Άτομο πρωτεΐνης	KS11 4	KS38 2	KS38 9	KS242	Άτομο αναστολέα	Άτομο πρωτεΐνης	KS38 2	KS389	
O2'	Tyr573 OH	3.0	3.0	3.0	3.0	O2'	Μόριο ύδατος	2.8	-	
	Asn284ND						O4'	Μόριο ύδατος	2.4	2.5
	2	3.3	3.0	3.0	3.0			Μόριο ύδατος	2.5	2.2
	Glu672OE1	2.7	3.2	3.1	3.1		O5'	Μόριο ύδατος	2.7	-
O3'	Μόριο ύδατος	2.7	2.8	2.8	2.7	O6'	Lys191 NZ	3.1	3.2	
	Μόριο ύδατος	3.0	2.9	3.0	2.9		Ala192 N	2.5	2.5	
	Glu672OE1	2.7	2.8	2.8	2.7	Μόριο ύδατος	2.3	2.3		
O4'	Ala673 N	3.3	3.2	3.3	3.2	N3	Thr38'	2.6	2.6	
	Ser674 N	3.1	3.0	3.0	3.1	N5	Μόριο ύδατος	3.0	3.1	
	Gly675 N	3.1	3.2	3.1	3.1					
	Gly675 N	2.8	2.9	2.9	2.9					
O6'	Μόριο ύδατος	2.6	2.7	2.7	2.7					
	His377ND1	2.7	2.7	2.7	2.7					
N2	Asn484ND	2.8	2.9	2.9	2.8					
	2	2.8	2.9	2.9	2.8					
N3	His377 O	2.6	2.7	2.7	2.7					
N5	Μόριο ύδατος	-	2.9							
	Μόριο ύδατος	2.9	2.9	2.8	2.9					
Σύνολο		15	16	15	15	Σύνολο		9	7	

Όλοι οι αναστολείς μετά την πρόσδεση τους συμμετέχουν σε ένα ιδιαίτερα συντηρημένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με αμινοξικά κατάλοιπα και μόρια ύδατος του καταλυτικού κέντρου. Οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει η γλυκοπυρανόζη είναι ίδιες με αυτές που σχηματίζει η γλυκόζη με την *rmGPb* καθώς και άλλοι αναστολείς, ανάλογα γλυκόζης (Martin et al. 1990, Oikonomakos et al. 2005, Chrysina et al. 2009, Tsirkone et al. 2010). Σε όλες τις ενώσεις η τριάζολο ομάδα σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό άτομο O της κύριας αλυσίδας της His377 και με ένα μόριο ύδατος. Επίσης συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με την πλευρική αλυσίδα της Asp283 και την κύρια αλυσίδα της Leu136 (Πίνακας 11.2). Ο δεσμός υδρογόνου του συνδέτη με την His377 έχει παρατηρηθεί και σε άλλους αναστολείς που φέρουν ως συνδέτη ετεροκυκλικούς δακτυλίους και παρουσίασαν αυξημένη ανασταλτική ισχύ (Bichard et al. 1995, Oikonomakos et al. 1995, Watson et al. 1995, Gregoriou et al. 1998, Chrysina et al. 2003). Η υψηλή βιοδραστικότητα αυτών των αναστολέων αποδίδεται στην αλληλεπίδραση αυτή με το κατάλοιπο His377 και ένας από τους στόχους του σχεδιασμού των αναστολέων αυτών ήταν ο σχηματισμός αυτού του δεσμού.

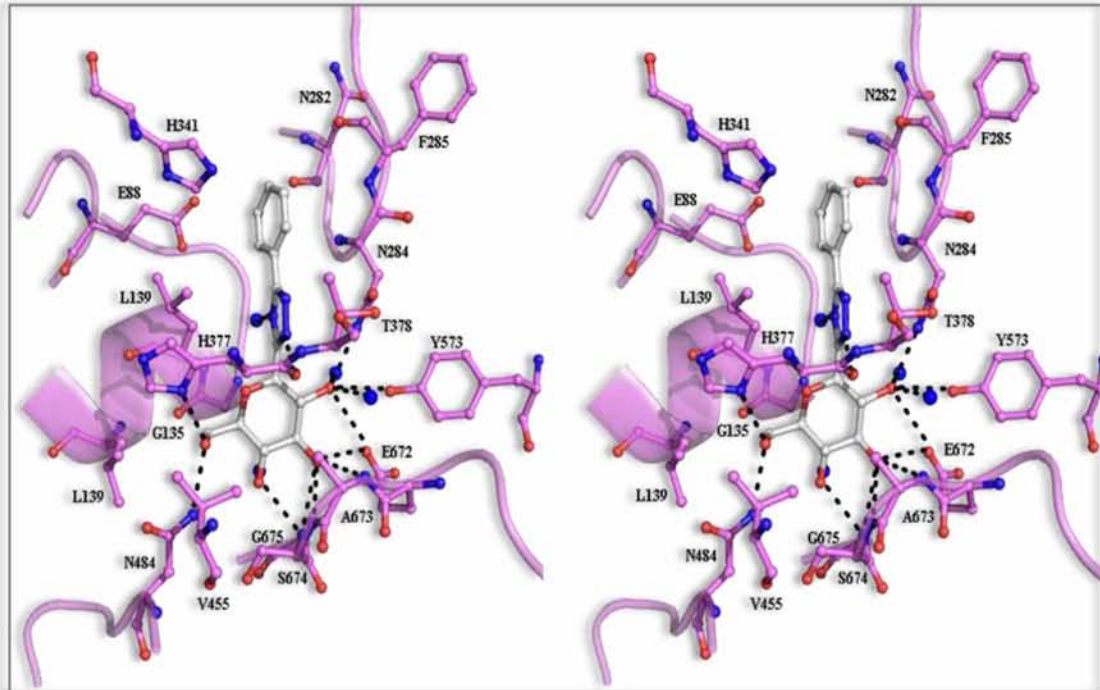
Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της *rmGPb* με τους αναστολείς **KS114** και

KS242, που φέρουν μικρότερο μήκος στον υποκαταστάτη R, έδειξε ότι μετά την πρόσδεση του ο **KS114** σχηματίζει 91 αλληλεπιδράσεις van der Waals (76 με αμινοξικά κατάλοιπα και 15 με μόρια ύδατος) ενώ ο **KS242** συμμετέχει σε 93 αλληλεπιδράσεις (76 με αμινοξικά κατάλοιπα και 17 με μόρια ύδατος). Οι υποκαταστάτες R και των δυο ενώσεων συμμετέχουν σε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων εντός της β-εσοχής με τα Glu88 (1), Asn282 (2), Asn284 (9), Phe285 (2), και His341 (3) (Εικόνες 11.3, 11.5). Επιπρόσθετα, ο **KS242** που φέρει μια μεθυλενική ομάδα επεκτείνεται περαιτέρω εντός της β-εσοχής συμμετέχοντας σε επιπλέον αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα His341(3), Asn282 (1), Phe285 (1), Arg292 (1) (Εικόνα 11.5). Η γλυκοπυρανόζη εκτός των άμεσων δεσμών υδρογόνου με αμινοξικά κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου συμμετέχει και στους δυο αναστολείς σε επιπλέον αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με τα Asn284, Ala673, Asp283, Thr671, Lys574, Thr676 αλλά και με το συνένζυμο PLP (Εικόνες 11.4, 11.6).

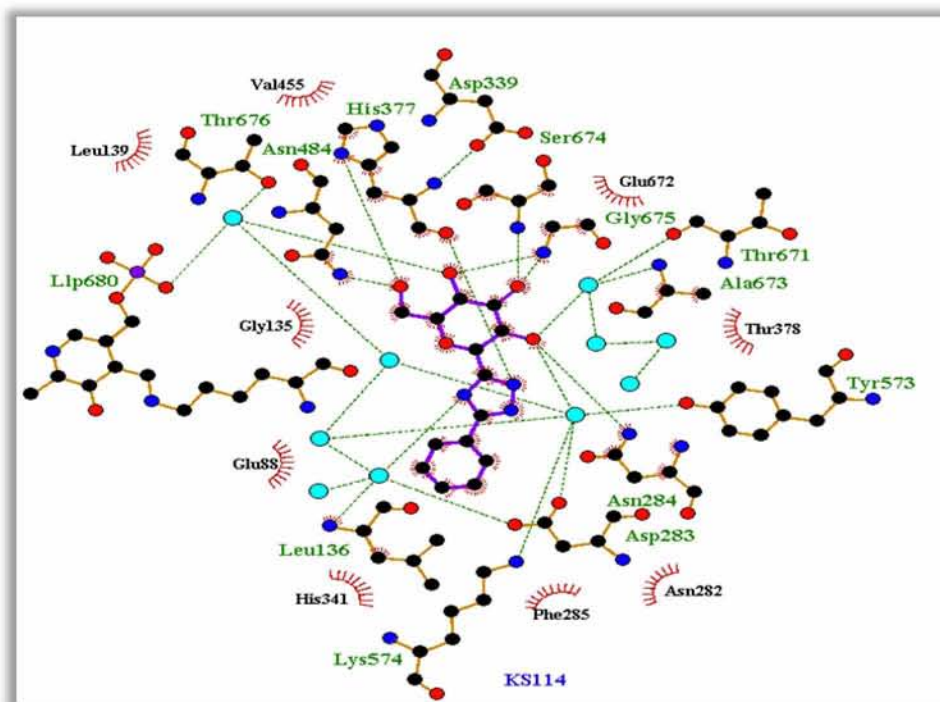
Υπέρθεση της δομής των συμπλόκων *rmGPb-KS114* και *rmGPb-KS242* με τη δομή του ελεύθερου ενζύμου αλλά και μεταξύ τους, απεκάλυψε ότι προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο με παρόμοιο τρόπο εκτοπίζοντας δυο μόρια ύδατος από τη δομή του ελεύθερου ενζύμου χωρίς να προκαλούν σημαντικές αλλαγές στην διαμόρφωση των

αμινοξέων στην περιοχή αυτή. Οι δυο αναστολείς σχηματίζουν σημαντικές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του βρόχου 280s (Asn282, Asn284, Phe285), σταθε-

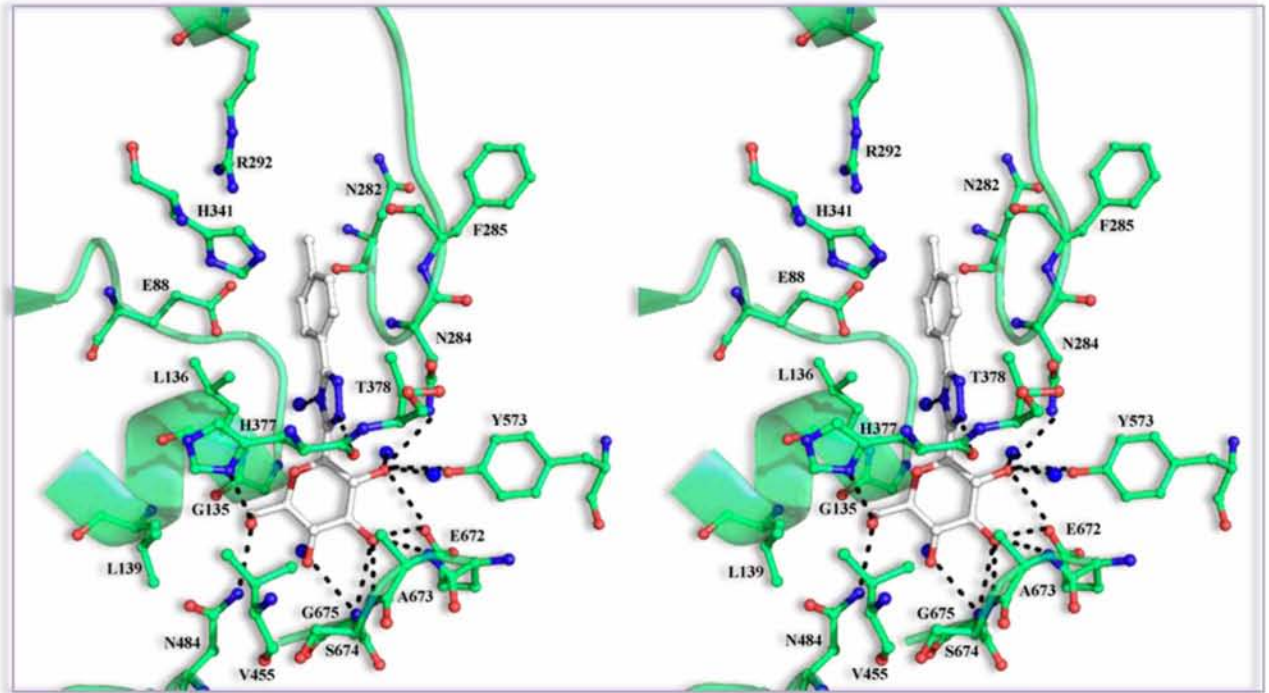
ροποιώντας την κλειστή διαμόρφωση, και εμποδίζοντας έτσι την πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο.



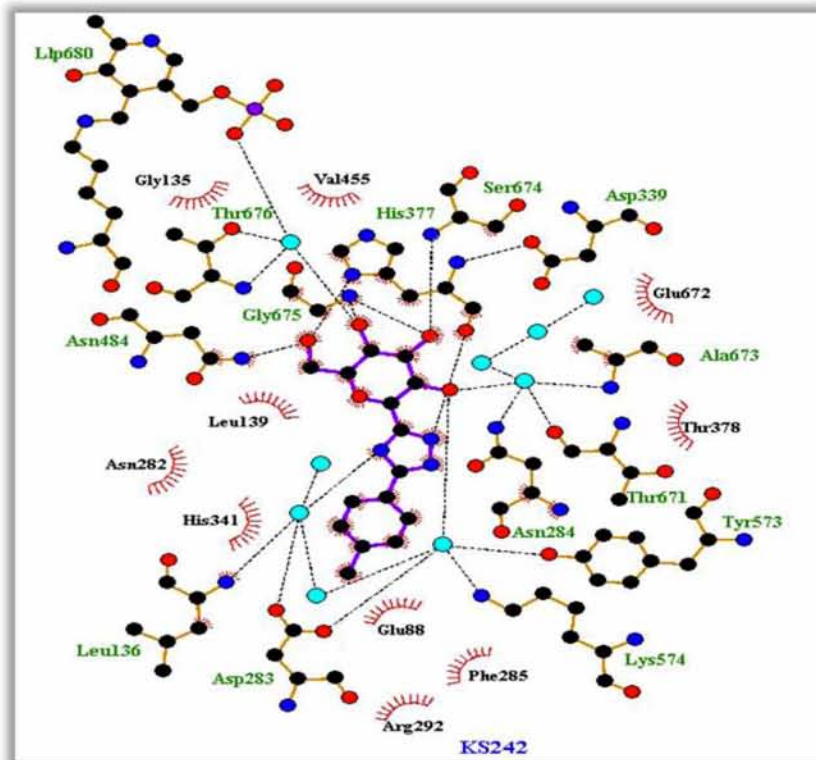
Εικόνα 11.3: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων του **KS114** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



Εικόνα 11.4: Απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων του **KS114** (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος) με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. Τα μόρια ύδατος παρουσιάζονται με γαλάζιες σφαίρες.



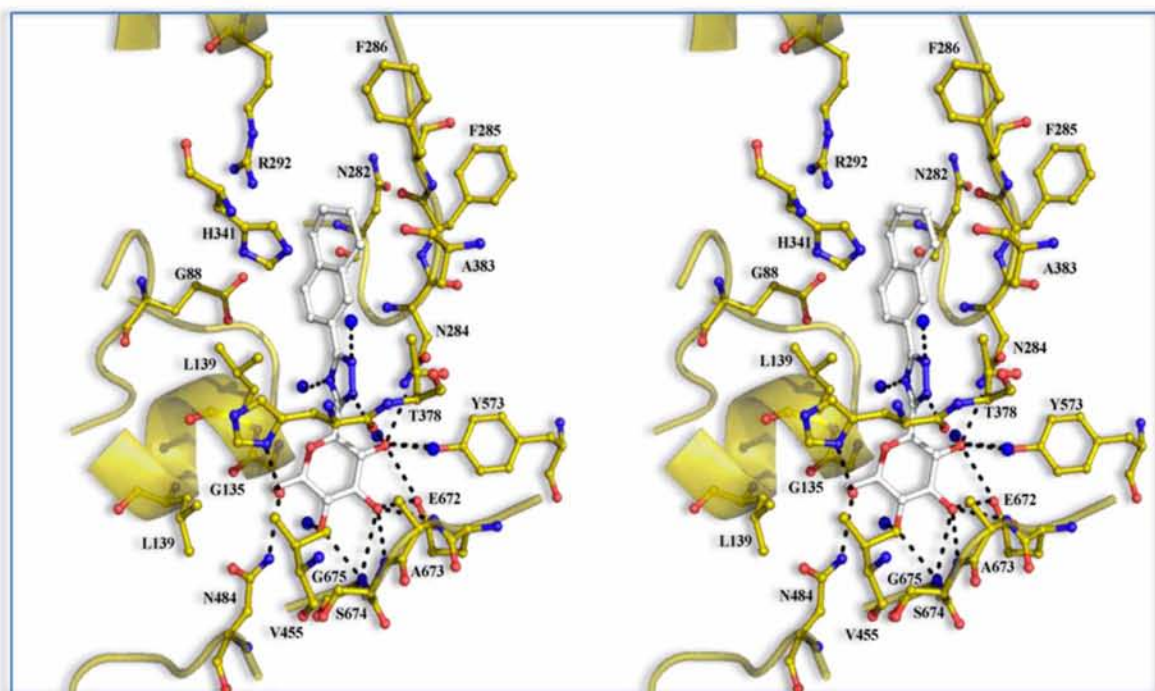
Εικόνα 11.5: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων του **KS242** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



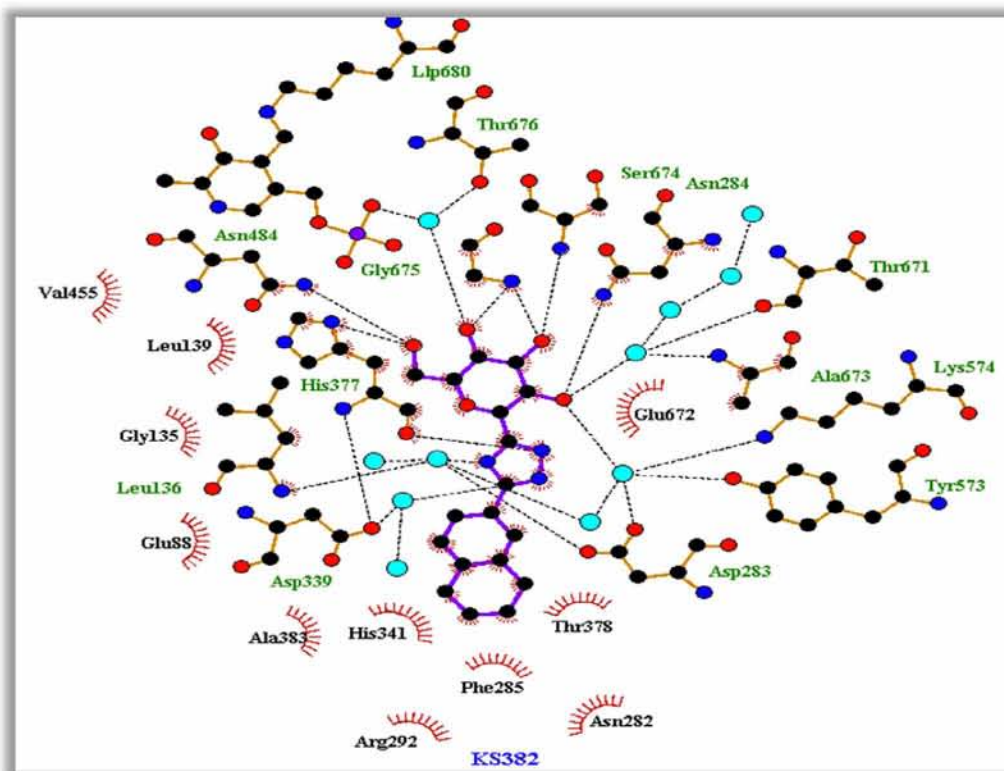
Εικόνα 11.6: Απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων του **KS242** (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος) με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. Τα μόρια ύδατος παρουσιάζονται ως γαλάζιες σφαίρες.

Οι **KS382** και **KS389** προσδέονται με παρόμοιο τρόπο στο καταλυτικό κέντρο συμμετέχοντας σε 16 και 15 δεσμούς δεσμούς υδρογόνου με αμινοξικά κατάλοιπα αντίστοιχα. Το άτομο N3 του ιμιδαζολικού δακτυλίου του **KS382** συμμετέχει σε έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο ύδατος. Ο **KS382** συμμετέχει σε 109 αλληλεπιδράσεις van der Waals (82 με αμινοξικά κατάλοιπα και 27 με μόρια ύδατος) ενώ ο **KS389** παρότι εμφανίζει ελαφρώς αυξημένη ανασταλτική ισχύ σχηματίζει και αυτός τον ίδιο αριθμό αλληλεπιδράσεων (85 με αμινοξικά κατάλοιπα και 24 με μόρια ύδατος). Ο αυξημένος αριθμός αλληλεπιδράσεων van der Waals των **KS382** και **KS389** σε σύγκριση με τους **KS114** και **KS242** αποδίδεται στο αυξημένο μέγεθος των υποκαταστατών R, που εκτείνονται εντός της β-εσοχής σχηματίζοντας αλληλεπιδρά-

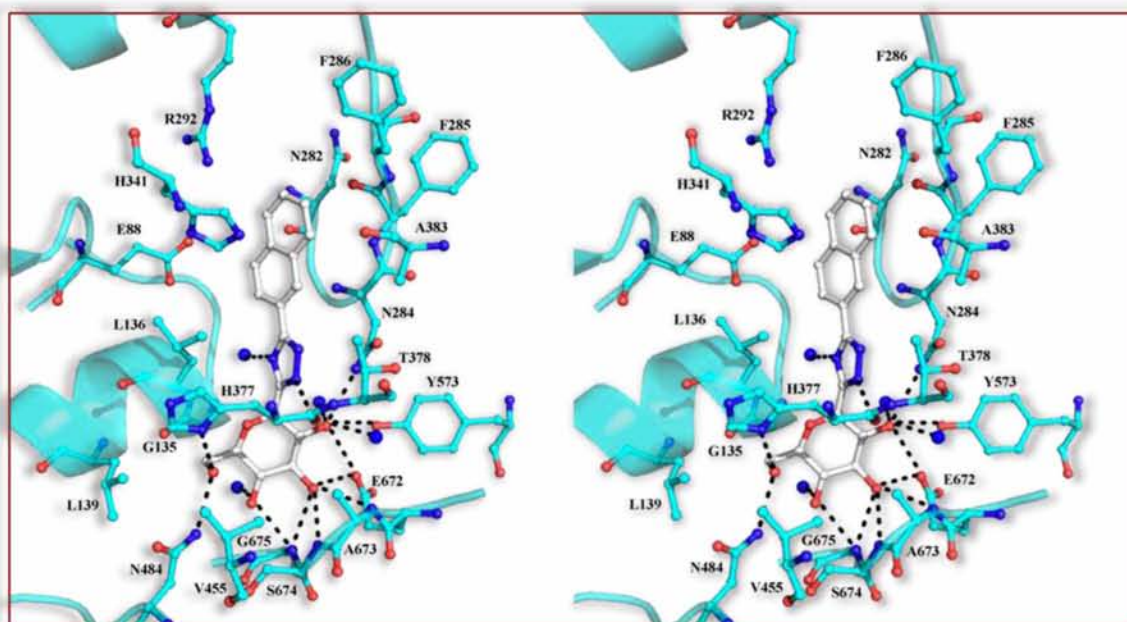
σεις στην περιοχή αυτή. Συγκεκριμένα οι υποκαταστάτες και των δυο αναστολέων συμμετέχουν σε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων εντός της β-εσοχής με τα Glu88 (1), Asn282 (3), Asn284 (6), Phe285 (3), His341 (6), Ala383 (1), Phe286 (1) και Arg292 (2) (Εικόνες 11.7, 11.9). Επιπρόσθετα, ο **KS389** συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με τα His341(3), Phe285 (2) και Phe286 (1). Η γλυκοπυρανόζη εκτός των άμεσων δεσμών υδρογόνου με αμινοξικά κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου συμμετέχει και στους δυο αναστολείς σε επιπλέον δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με τα κατάλοιπα Asn284, Ala673, Asp283, Thr671, Lys574, Thr676 αλλά και το συνένζυμο PLP (Εικόνες 11.8, 11.10). Ο τριάζολο συνδέτης του **KS382** συμμετέχει σε έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου μέσω μορίου ύδατος με το Asp339 (Εικόνα 11.8).



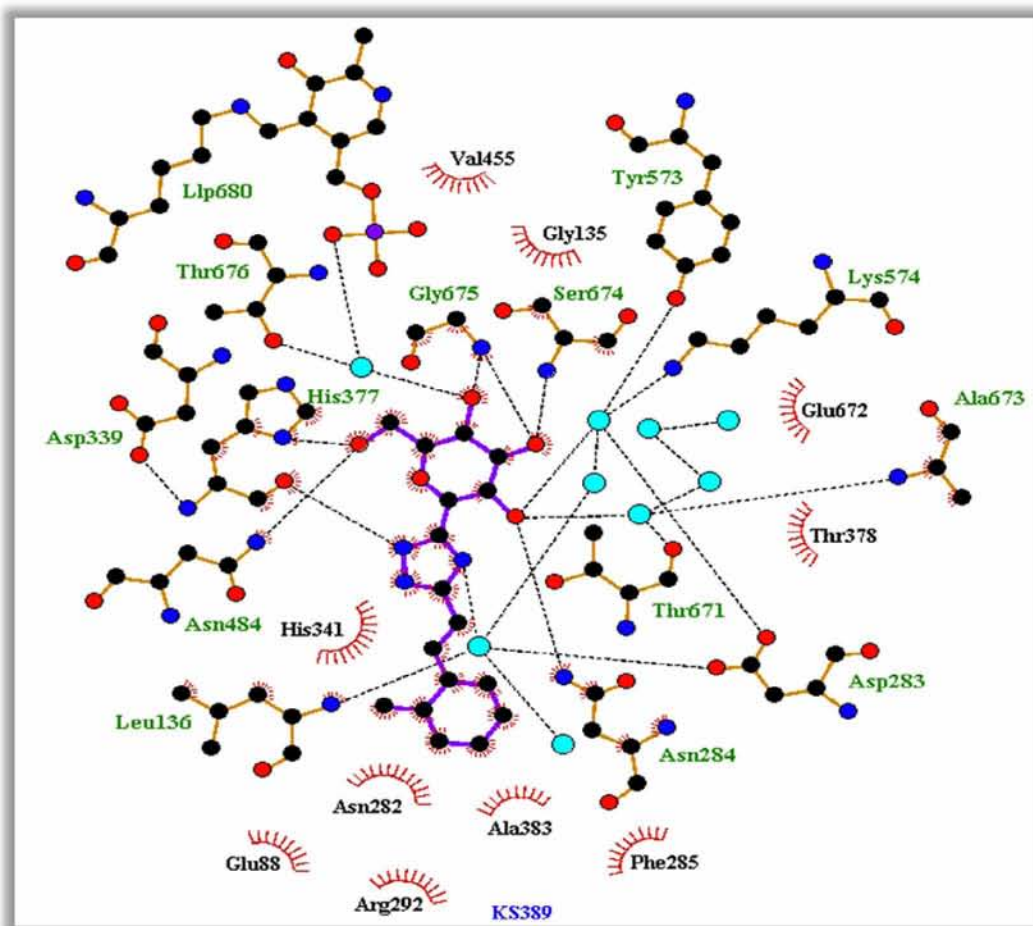
Εικόνα 11.7: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων του **KS382** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



Εικόνα 11.8: Απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων του **KS382** (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος) με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. Τα μόρια ύδατος παρουσιάζονται ως γαλάζιες σφαίρες.



Εικόνα 11.9: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων του **KS389** με τα αμινοξέα του κατά-λυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



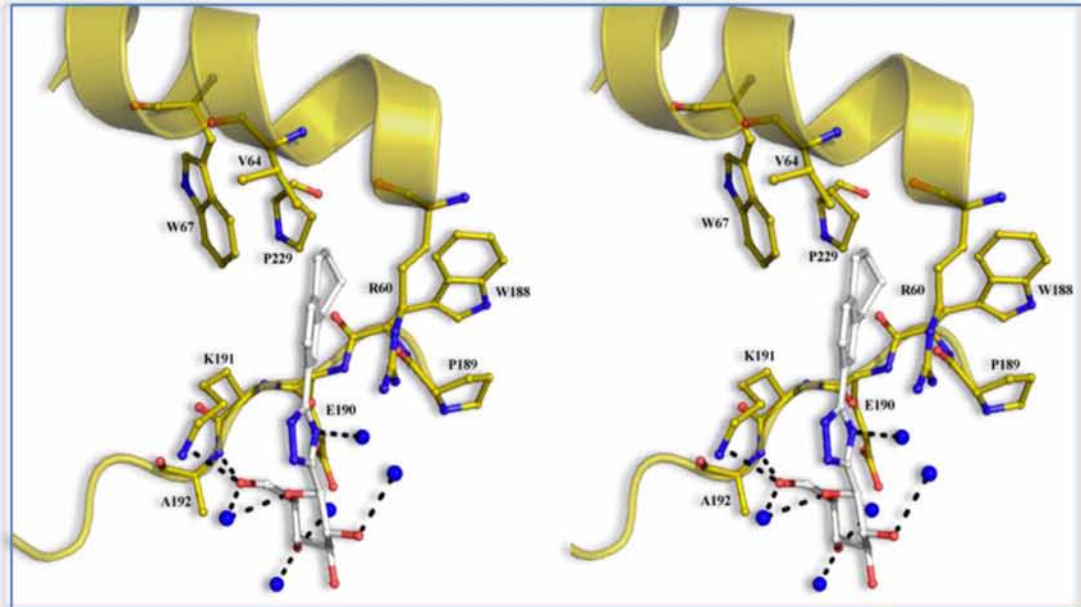
Εικόνα 11.10: Απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων του **KS389** (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος) με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. Τα μόρια ύδατος παρουσιάζονται ως γαλάζιες σφαίρες.

Οι **KS382** και **KS389** κατά την πρόσδεση τους στο νέο αλλοστερικό κέντρο σχηματίζουν 9 και 7 δεσμούς υδρογόνου αντίστοιχα (σημαντικά λιγότερους από το καταλυτικό κέντρο). Το τμήμα του συνδέτη συμμετέχει σε ένα δεσμό υδρογόνου με την Thr38' της συμμετρικής υπομονάδας και σε ένα δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο ύδατος. Η ασθενής πρόσδεση των αναστολέων μπορεί να δικαιολογηθεί από το μικρότερο αριθμό δεσμών υδρογόνου σε σύγκριση με εκείνους του καταλυτικού κέντρου. Η πρόσδεση του **KS382** σταθεροποιείται μέσω

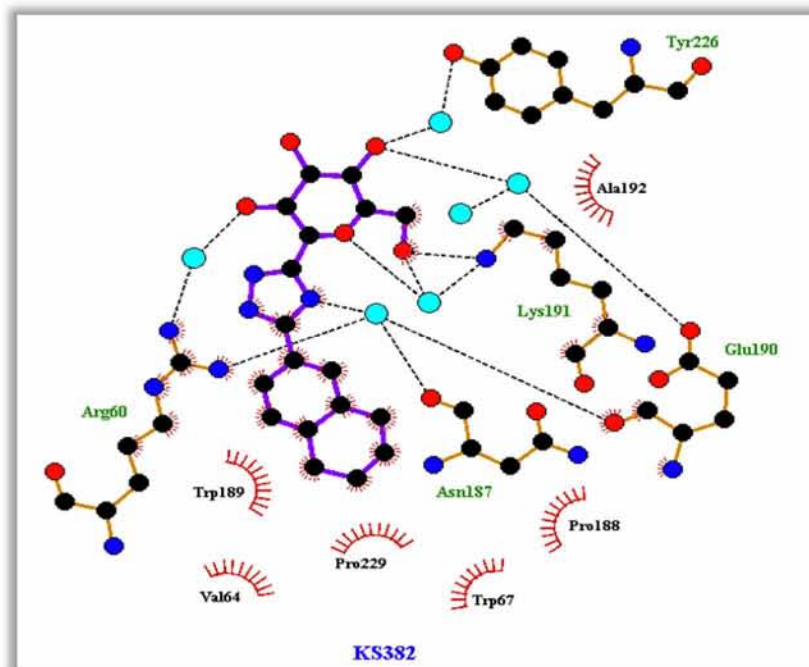
109 αλληλεπιδράσεων van der Waals (85 με αμινοξέα και 24 με μόρια ύδατος) που σχηματίζει στο νέο αλλοστερικό κέντρο ενώ αντίστοιχα ο **KS389** σχηματίζει 99 αλληλεπιδράσεις (88 με αμινοξέα και 11 με μόρια ύδατος), κυρίως μέσω των αλληλεπιδράσεων των υποκαταστατών R με τα κατάλοιπα Arg60, Val64, Trp67, Glu190, Lys191, Pro188, Trp189 και Pro229 (Εικόνες 11.11, 11.13). Επιπλέον και οι δυο αναστολείς σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα αμινοξέα Phe37', Thr38', Val40' από τη συμμετρική υπομονάδα (9 ο **KS382** και 8 ο

KS389) και δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με τα αμινοξέα Asn187, Glu190, Tyr226, ενώ ο **KS382** σχηματίζει

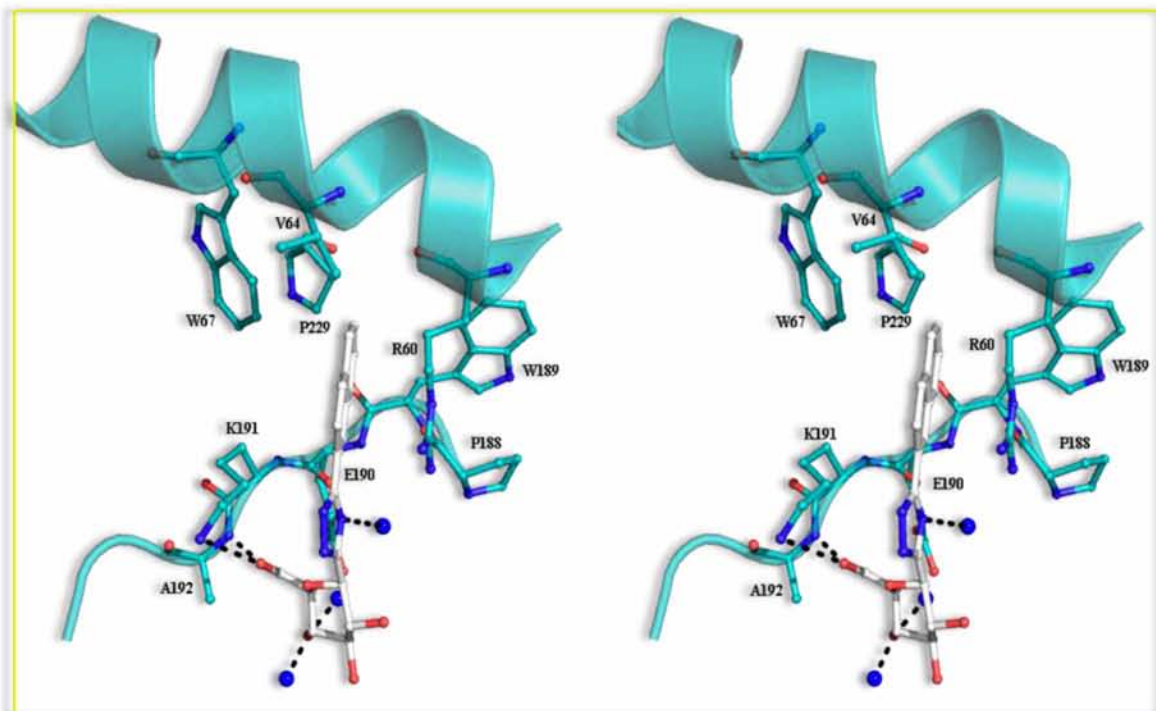
έναν επιπλέον δεσμό με την Arg60 (Εικόνες 11.12, 11.14).



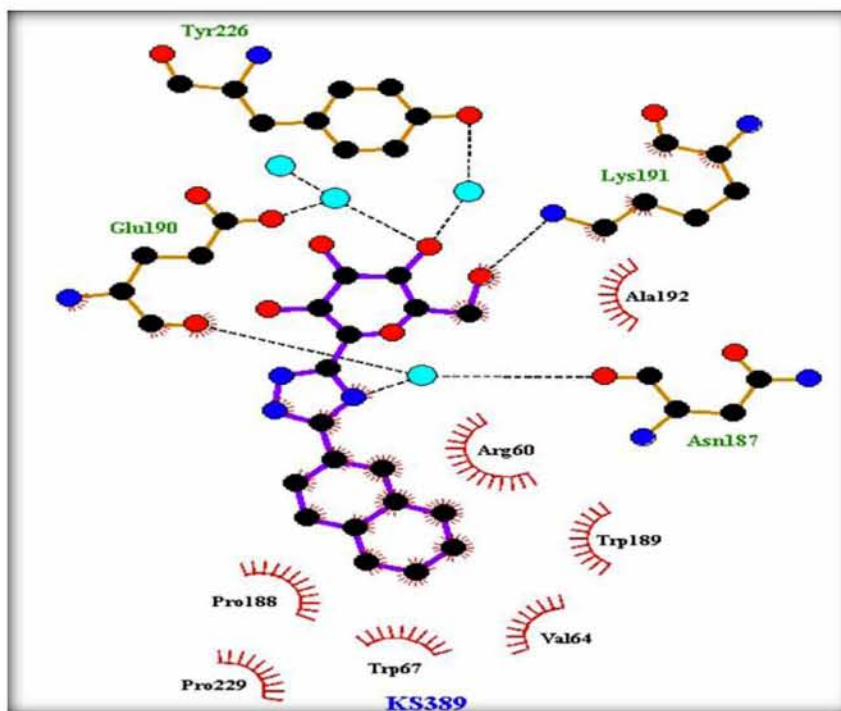
Εικόνα 11.11: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων του **KS382** με τα αμινοξέα του νέου αλλοστερικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακε-κομμένες γραμμές.



Εικόνα 11.12: Απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων του **KS382** (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος) με τα αμινοξέα του νέου αλλοστερικού κέντρου. Τα μόρια ύδατος παρουσιάζονται ως γαλάζιες σφαίρες.



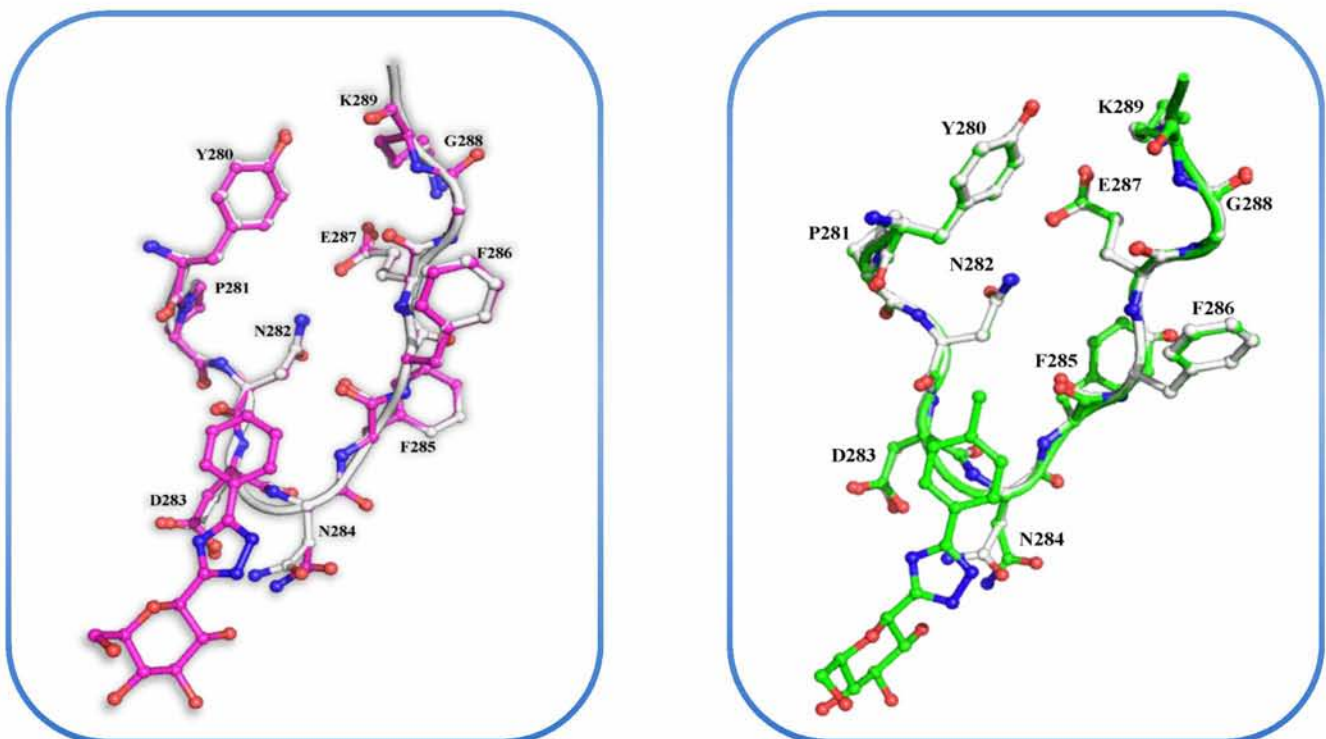
Εικόνα 11.13: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων του **KS389** με τα αμινοξέα του νέου αλλοστερικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



Εικόνα 11.14: Απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων του **KS389** (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος) με τα αμινοξέα του νέου αλλοστερικού κέντρου. Τα μόρια ύδατος παρουσιάζονται ως γαλάζιες σφαίρες.

Η πρόσδεση των **KS114** και **KS242** δεν προκαλεί σημαντική αλλαγή στη δομή του ενζύμου όπως προέκυψε μετά από υπέρθεση των καταλοίπων 18-249, 262-312, 326-829 των συμπλόκων **rmGPb-KS114** και **rmGPb-KS242** με τη δομή της ελεύθερης **rmGPb** καθώς η τιμή της *rmsd* είναι 0,14 και 0,15 Å για τα άτομα C^α των πρωτεϊνικών συμπλόκων **KS114** και **KS242** αντίστοιχα. Και οι δυο ενώσεις προσδέονται παρόμοια στο καταλυτικό κέντρο χωρίς να προκαλούν σημαντική αναδιάταξη

της δομής του βρόχου 280s ή του δικτύου μορίων ύδατος (*r.m.s.d.* 0,78 και 0,81 Å για τα άτομα των αμινοξέων 282-288 των συμπλόκων **KS114** και **KS242** αντίστοιχα). Η πιο σημαντική διαφορά παρατηρείται στην πλευρική αλυσίδα της Asn284, η οποία μετατοπίζεται κατά 0,55 Å στο σύμπλοκο του **KS114** και κατά 0,9 Å στο σύμπλοκο του **KS242** χωρίς ωστόσο η μετατόπιση αυτή να προκαλεί μεταβολές στη δομή των υπόλοιπων καταλοίπων του βρόχου 280s (Εικόνα 11.15)

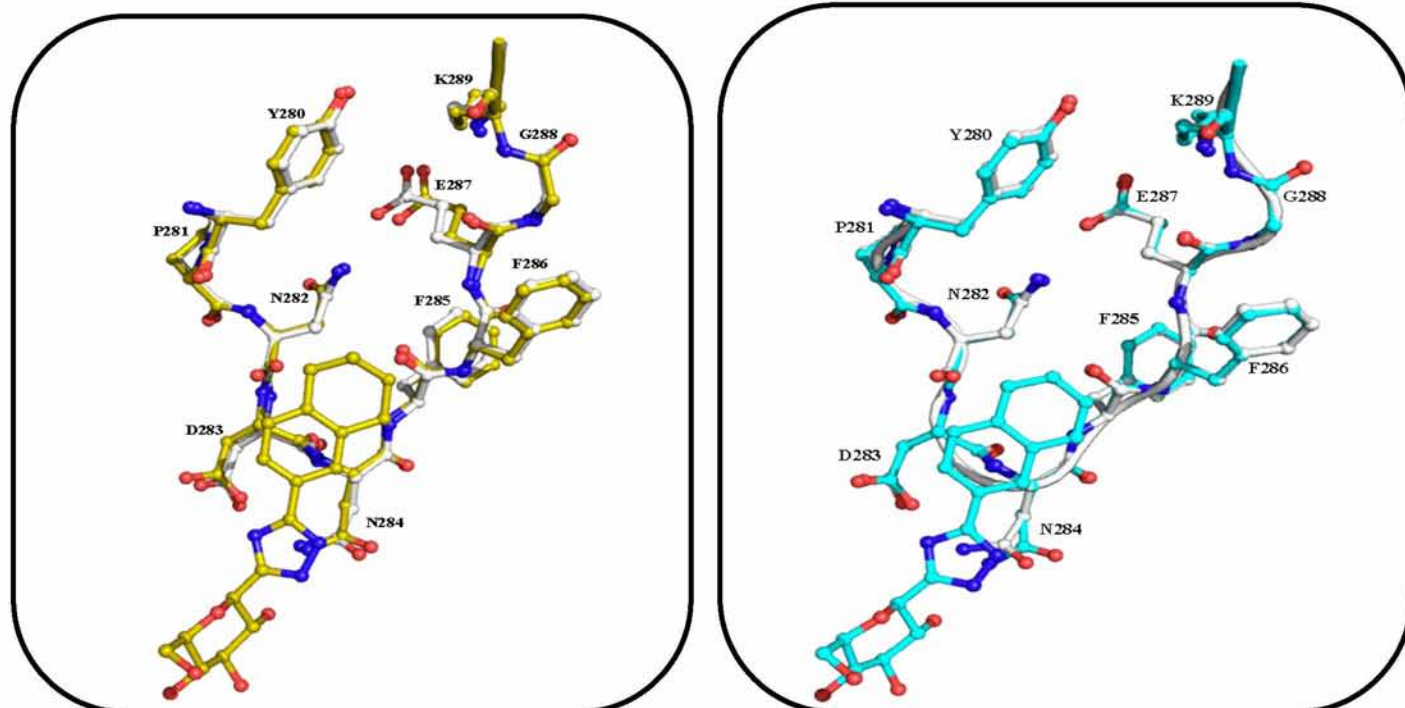


Εικόνα 11.15: Υπέρθεση της δομής των συμπλόκων **rmGPb-KS114** (ροζ) και **rmGP-KS242** (πράσινο) στη δομή της ελεύθερης **rmGPb** (λευκό).

Από τα αποτελέσματα των δομικών μελετών προκύπτει ότι και οι δυο αναστολείς **KS114** και **KS242** προσδέονται ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου σχηματίζοντας τον ίδιο αριθμό δεσμών υδρογόνου αλλά και ένα παρόμοιο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με κατάλοιπα της περιοχής της β-εσοχής. Και στα δυο σύμπλοκα οι αναστολείς αλληλεπιδρούν με αμινοξέα του βρόχου 280s σταθεροποιώντας την κλειστή του διαμόρφωση χωρίς ωστόσο να προκαλούν αναδιάταξη στη δομή του, όπως παρατηρήθηκε στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα των περισσότερων αναστολέων που αναφέρθηκαν στην παρούσα διατριβή. Η διαφορά στην βιοδραστικότητα των αναστολέων μπορεί να αποδοθεί στον μεγαλύτερο μέγεθος του υποκαταστάτη R του **KS242**, ο οποίος σχηματίζει επιπλέον αλληλεπιδράσεις van der Waals που δεν παρατηρήθηκαν κατά τη σύνδεση του **KS114**. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι κυρίως με κατάλοιπα της περιοχής της β-εσοχής και του βρόχου 280s, οι οποίες σταθεροποιούν την πρόσδεση του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο οδηγώντας σε μείωση κατά περίπου 4,8 φορές της σταθεράς αναστολής (K_i) του **KS242** σε σύγκριση με τον **KS114**, αναδεικνύοντας έτσι το σημαντικό ρόλο των αλληλεπιδράσεων στην

β-εσοχή για την βιοδραστικότητα των αναστολέων.

Υπέρθωση της δομής των συμπλόκων **mGPb-KS382** και **mGPb-KS389** με τη δομή της ελεύθερης **mGPb** έδειξε ότι και σε αυτή την περίπτωση η πρόσδεση των αναστολέων δεν προκαλεί σημαντικές μεταβολές στη δομή του ενζύμου (rmsd 0,16 και 0,14 Å για τα άτομα C^α των αμινοξέων 18-249, 262-312, 326-829 στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα των **KS382** και **KS389**, αντίστοιχα). Οι αναστολείς προσδέονται παρόμοια, εκτοπίζοντας δυο μόρια ύδατος από το καταλυτικό κέντρο. Η πρόσδεση του **KS382** προκαλεί μια μικρή μετατόπιση του βρόχου 280s (r.m.s.d.=0,83 Å για τα άτομα των αμινοξέων 282-288). Οι πιο αξιοσημείωτες αλλαγές στη θέση των C^α παρατηρήθηκαν στα Asp283 (0,61 Å), Phe285 (0,67 Å) και Glu287 (0,65 Å) (Εικόνα 11.16). Η πρόσδεση του **KS389** προκαλεί μικρότερη μεταβολή στη διαμόρφωση του βρόχου 280s (r.m.s.d. =0,78 Å) και η σημαντικότερη μεταβολή που παρατηρείται είναι η μετατόπιση της πλευρικής αλυσίδας της Asn284 κατά 0,63 Å από τη θέση της στη δομή του ελεύθερου ενζύμου χωρίς όμως αυτή να προκαλεί περαιτέρω μεταβολές στη διαμόρφωση των υπόλοιπων καταλοίπων του βρόχου.



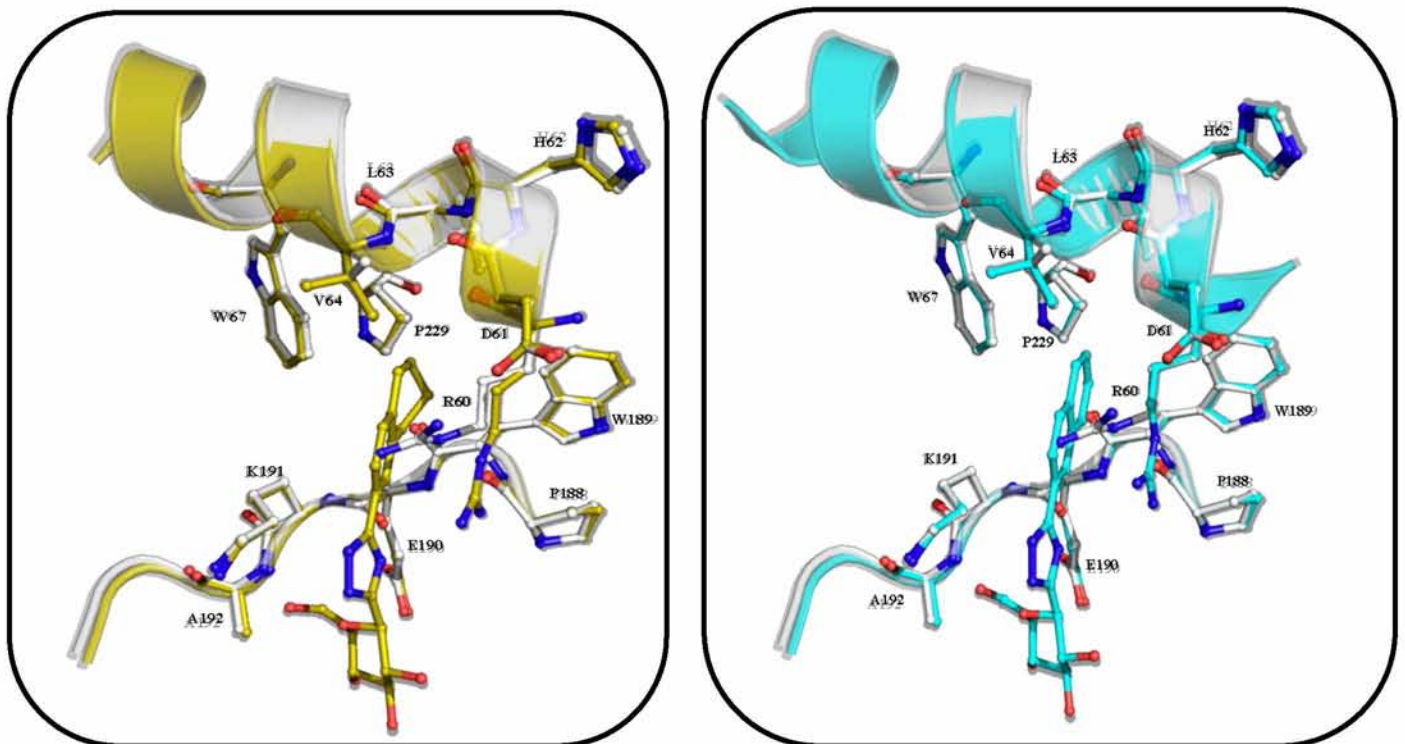
Εικόνα 11.16: Υπέρθση της δομής του καταλυτικού κέντρου των συμπλόκων mGPb-**KS382** (κίτρινο) και mGP-**KS389** (γαλάζιο) με την δομή της ελεύθερης mGPb (λευκό)

Η πρόσδεση του **KS382** στο νέο αλλοστερικό κέντρο προκαλεί μια εκτεταμένη αναδιάταξη της διαμόρφωσης του νέου αλλοστερικού κέντρου όπως έδειξε η υπέρθεση του συμπλόκου με την ελεύθερη mGPb. Συγκεκριμένα η πλευρική αλυσίδα της Arg60 μετατοπίζεται κατά 2,87 Å για να αποφύγει τη σύγκρουση με τον υποκαταστάτη R του αναστολέα προκαλώντας μια μετατόπιση όλων των καταλοίπων της έλικας 60-64 (r.m.s.d.=1,12 Å για τα άτομα των καταλοίπων 60-64) ενώ διαταράσσεται και το δίκτυο των μορίων ύδατος της περιοχής καθώς τρία μόρια ύδατος εκτοπίζονται από την θέση τους ενώ άλλα δύο άλλα μετατοπίζονται (0,53 και 0,66 Å) μετά την πρόσδεση του αναστολέα (Εικόνα 11.17).

Ο **KS389** προσδένεται στο νέο αλλοστερικό κέντρο με παρόμοιο τρόπο προκαλώντας και αυτός αναδιάταξη της διαμόρφωσης των αμινοξέων της περιοχής όπως υπέδειξε η υπέρθεση του συμπλόκου με την ελεύθερη mGPb. Έτσι η σύνδεση του αναστολέα οδηγεί σε μετατόπιση της πλευρικής αλυσίδας της Arg60 κατά 2,74 Å, για να αποφύγει τη σύγκρουση με τον αναστολέα. Η μετατόπιση αυτή προκαλεί μετατόπιση όλων των καταλοίπων της έλικας 60 -64 (r.m.s.d.=1,1 Å για τα άτομα των καταλοίπων 60-64), ενώ και πάλι διαταράσσεται το δίκτυο μορίων ύδατος της περιοχής με την εκτόπιση τριών μορίων ύδατος και την μετατόπιση άλλων δυο (0,5 και 0,45 Å). Στη δομή της ελεύθερης mGPb σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ

αμινοξέων του νέου αλλοστερικού κέντρου και αμινοξέων της συμμετρικής υπομονάδας, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση της δομής του διμερούς (Acharya et al. 1991). Κατά το σχηματισμό των συμπλόκων των **KS382** και **KS389** το δίκτυο των δεσμών αυτών μεταξύ των υπομονάδων δεν μεταβάλλεται σημαντικά. Ολοι σχεδόν οι δεσμοί υδρογόνου εξακολουθούν να αναπτύσσονται εκτός από το δεσμό της Arg60 με τη Phe37' εξαιτίας της μετατό-

πισης της Arg60 και στα δυο σύμπλοκα. Παρά την εκτεταμένη αναδιάταξη που προκαλεί ο **KS382**, ο τετράυδρο-νάφθυλο υποκαταστάτης του μορίου συμμετέχει σε επιπλέον αλληλεπιδράσεις van der Waals από το νάφθυλο του **KS389** με τα κατάλοιπα Arg60 (6) και Trp67 (1), γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στους λιγότερους στεροχημικούς περιορισμούς της τετράυδρο-νάφθυλο ομάδας του **KS382** σε σχέση με τη 2-νάφθυλο του **KS389**.

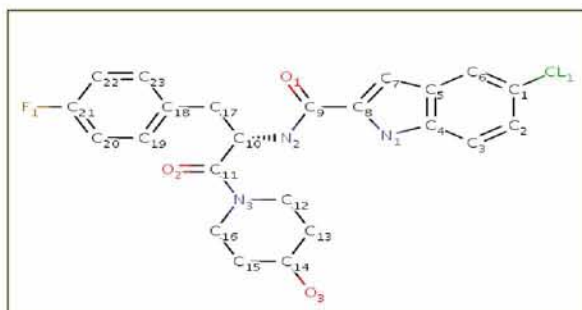


Εικόνα 11.17: Υπέρθηση της δομής του νέου αλλοστερικού κέντρου των συμπλόκων gpGPb-**KS382** (κίτρινο) και gpGPb-**KS389** (γαλάζιο) στη δομή της ελεύθερης gpGPb (λευκό).

Από τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών προκύπτει ότι οι **KS382** και **KS389** αποτελούν ισχυρούς αναστολείς του ενζύμου. Οι τιμές των σταθερών αναστολής

(Πίνακα 11.1) τους κατατάσσουν στους πιο ισχυρούς αναστολείς που έχουν βρεθεί για το καταλυτικό κέντρο της GP. Η ισχυρή ανασταλτική τους ισχύ μπορεί να αποδοθεί

στο εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα της β-εσοχής αλλά και του βρόχου 280s οι οποίες σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση. Αυτό γίνεται χωρίς να προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην πρωτεϊνική δομή, όπως εκείνες που παρατηρήθηκαν κατά τη σύνδεση των αναστολέων που παρουσιάστηκαν σε προηγούμενες ενότητες στην παρούσα διατριβή. Καθώς και οι δυο αναστολείς συμμετέχουν στον ίδιο αριθμό αλληλεπιδράσεων van der Waals η μικρή διαφορά της βιοδραστικότητας μπορεί να αποδοθεί στις επιπλέον αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει ο **KS389** με τα κατάλοιπα του βρόχου 280s Phe285(2) και Phe286(1) τις οποίες δεν σχηματίζει ο **KS382**,



Εικόνα 11.18: Χημική δομή της ένωσης CP320626

Ο CP320626 κατά την πρόσδεση του στο νέο αλλοστερικό κέντρο δεν προκαλεί μεγάλες μεταβολές στη δομή του ενζύμου (r.m.s.d.=0,14 Å για τα άτομα C^α των αμινοξέων 18-249, 262-312, 326-829). Συνολικά σχηματίζει επτά δεσμούς υδρογόνου (με τα κατάλοιπα Glu190, Lys191 και Thr38' της συμμετρικής υπομονάδας και τέσσερις με μόρια ύδατος) και 114 αλλη-

αναδεικνύοντας έτσι και την σημαντική συμβολή των αλληλεπιδράσεων αυτών στη δραστηριότητα των αναστολέων.

Ακολούθησε δομική σύγκριση των συμπλόκων gmGPb-**KS389** και gmGPb-**CP320626** (Oikonomakos et al. 2002). Ο CP320626 είναι ένας από τους πιο βιοδραστικούς αναστολείς που έχουν βρεθεί για το νέο αλλοστερικό κέντρο καθώς αναστέλλει ισχυρά την hIGPa ($IC_{50} = 205$ nM) και την gmGP ($IC_{50}=334$ nM) ενώ έχει βρεθεί ότι προκαλεί σημαντική μείωση της γλυκόζης σε διαβητικά ποντίκια χωρίς να μεταβάλλει τα επίπεδα της ινσουλίνης του πλάσματος (Hoover et al. 1998, Oikonomakos et al. 2000).

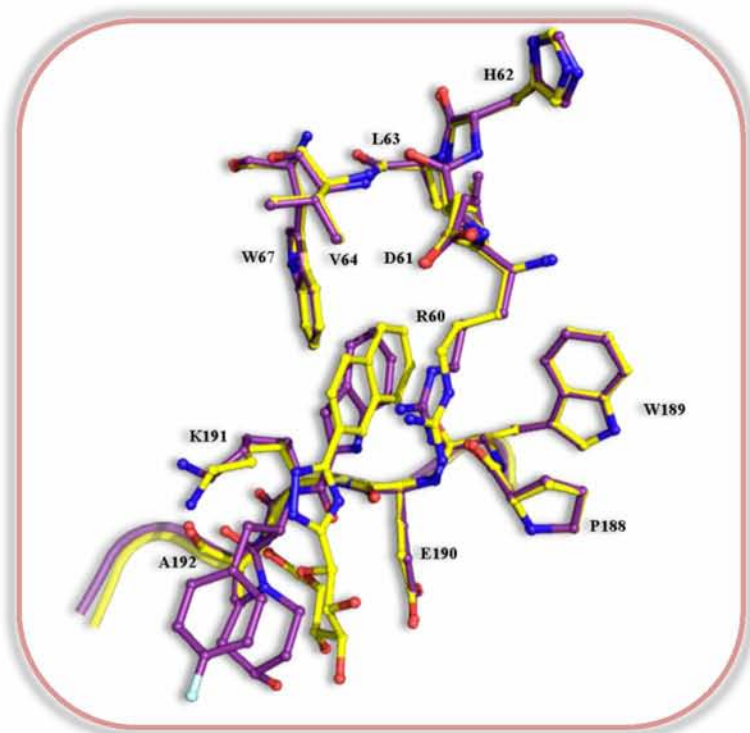
λεπιδράσεις van der Waals από τις οποίες οι περισσότερες είναι μη πολικές αλληλεπιδράσεις με τα Arg60 και Lys191, Val64, Trp67 και Pro229 και 44 αλληλεπιδράσεις με τα Thr38', Leu39' Val40', Phe53', His57' και Pro188' της συμμετρικής υπομονάδας. Υπέρθηση της δομής των συμπλόκων έδειξε ότι η γλυκοπυρανόζη του **KS389** προσδένεται σε διαφορετική θέση από την

4-υδροξυ πιπεριδινική ομάδα αλλά και την 4-φθορο-βένζυλο-ομάδα του **CP320626** ενώ ο 2-νάφθυλο υποκαταστάτης του **KS389** προσδέεται με τον ίδιο προσανατολισμό με τους ινδολικούς δακτυλίους του **CP320626**. Η μετατόπιση της πλευρικής αλυσίδας της Arg60, είναι μικρότερη σε σύγκριση με αυτήν που παρατηρήθηκε στο σύμπλοκο του **KS389** (1,83Å), οδηγώντας σε μικρότερη μετατόπιση της έλικας 60-64 (r.m.s.d.= 0,85Å για τα άτομα των καταλοίπων 60-64), ενώ διαταράσσεται και το δίκτυο μορίων ύδατος της περιοχής καθώς πέντε μόρια ύδατος της μίας υπομονάδας και τέσσερα της συμμετρικής υπομονάδας εκτοπίζονται από τη θέση τους κατά τη σύνδεση του αναστολέα. Οι μεγαλύτερες μεταβολές στη δομή του νέου αλλοστερικού κέντρου εκτός από αυτήν της Arg60 παρατηρήθηκαν στις πλευρικές αλυσίδες των Val64 και Lys191,

οι οποίες μετακινούνται για να αλληλεπιδράσουν καλύτερα με το άτομο χλωρίου και την 4-υδροξυ-πιπεριδινική ομάδα του **CP320626**, αντίστοιχα (Εικόνα 11.19).

Η διαφορά στη σύνδεση των δυο μορίων στο νέο αλλοστερικό κέντρο προκύπτει από το εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει ο **CP320626** με κατάλοιπα της συμμετρικής υπομονάδας οι οποίες συμβάλλουν στη διατήρηση της δομής του διμερούς. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι κυρίως μεταξύ αρωματικών ομάδων (4-φθοροβενζυλομάδα με την πλευρική αλυσίδα της Phe53'), αμινο-αρωματικές αλληλεπιδράσεις (της 4-φθοροβενζυλομάδα με την His557'), αλληλεπιδράσεις του τύπου CH/π ηλεκτρονίων (της πλευρικής αλυσίδας της Val40' με τον ινδολικό δακτύλιο και της 4-φθοροβενζυλομάδας με τα άτομα CA CB και CD της Pro188') και αλληλεπιδράσεις μεταξύ μη πολικών ομάδων (της καρβοξαμιδικής ομάδας με τα Thr38' και Leu39') (Oikonomakos et al. 2002) οι οποίες δεν παρατηρούνται στο σύμπλοκο του **KS389**.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι η προσθήκη του τριαζολικού δακτυλίου βελτίωσε την ανασταλτική ισχύ των αναστολέων σε σύγκριση με τους αναστολείς που έφεραν ως συνδέτη τις ομάδες -NHCO- και -NHCONHCO- που αναφέρθηκαν νωρίτερα. Επιπλέον αυτή η ομάδα αναστολέων παρουσιάζει αυξημένη



Εικόνα 11.19: Υπέρθηση της δομής των συμπλόκων **gpII-KS389** (κίτρινο) και **gpII-CP320626** (μωβ)

δραστηριότητα σε σύγκριση με αναστολείς που φέρουν άλλους ετεροκυκλικούς δακτυλίους στη δομή τους, όπως το βενζιμιδαζόλιο, το βενζοθειαζόλιο, 1,3,4-οξαδιαζόλη και τον 1,2,3-τριαζολικό δακτύλιο (Bokor et al. 2013). Δομική ανάλυση του αναστολέα που φέρει ως συνδέτη την 1,2,4 -οξαδιαζόλη και ως υποκαταστάτη την ομάδα 2-νάφθυλο ($K_i = 2,4 \mu\text{M}$) έδειξε ότι ο συνδέτης δε σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την κύρια αλυσίδα της His377, ενώ η 2-νάφθυλο συμμετέχει σε ένα παρόμοιο δίκτυο αλληλεπιδράσεων van der Waals εντός της β-εσοχής (Praly, Oikonomakos, unpublished results) με τον **KS389** που φέρει τον ίδιο υποκαταστάτη.

Συμπερασματικά, οι αναστολείς που μελετήθηκαν παρουσιάζουν υψηλή βιοδραστικότητα της τάξης των nM (εκτός του **KS114**) και ανήκουν στους πιο ισχυρούς αναστολείς του καταλυτικού κέντρου. Από τις δομικές μελέτες προέκυψε ότι η ανασταλτική τους ισχύ αποδίδεται στην ομάδα του τριαζολικού δακτυλίου του συνδέτη που κατευθύνει την πρόσδεση του υποκαταστάτη εντός της β-εσοχής ενώ παράλληλα σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με μόρια ύδατος αλλά και την κύρια αλυσίδα του καταλοίπου His377. Όλοι οι αναστολείς προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο χωρίς να διαταράσσουν την αρχιτεκτονική του σχηματίζοντας εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων στην περιοχή αυτή. Η διαφορά στην ανασταλτική

δραστηριότητα των αναστολέων μπορεί να αποδοθεί στον μέγεθος του υποκαταστάτη και τις αλληλεπιδράσεις van der Waals που σχηματίζει εντός της β-εσοχής. Ο υποκαταστάτης 2-νάφθυλο και ο υποκαταστάτης τετράυδρο-φαίνυλο των ενώσεων **KS389** και **KS382** αντίστοιχα, προσδένονται με τον κατάλληλο προσανατολισμό εντός της β-εσοχής σχηματίζοντας περισσότερες αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα της περιοχής από τους **KS114** και **KS242** που έχουν μικρότερους υποκαταστάτες R, αναδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο των αλληλεπιδράσεων στην β-εσοχή για την αύξηση της ανασταλτικής ισχύ των αναστολέων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επαλήθευσαν την ισχυρή ανασταλτική δράση των αναστολέων στο φαρμακευτικό στόχο, την ανθρώπινη ηπατική GPα ενώ αποδείχθηκε πειραματικά πως τα δεδομένα που προκύπτουν από κινητικές μελέτες στην rmGPb έχουν εφαρμογή στην hlGPα.

12. Μελέτες C-β-D-ιμιδάζολο γλυκοπυρανουοκλεοζιτών

Η προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι οι αναστολείς που φέρουν τον 1,2,4-τριαζολικό δακτύλιο ως συνδέτη εμφανίζουν ισχυρή ανασταλτική ισχύ έναντι της hlGPα (της τάξης nM) και κατατάσσονται ανάμεσα στους πιο βιοδραστικούς αναστολείς που έχουν βρεθεί για το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Καθώς λοιπόν ο ετεροκυκλικός δακτύλιος συμ-

βάλλει στην αύξηση της ανασταλτικής ισχύς των αναστολέων το ενδιαφέρον στράφηκε στη μελέτη διαφορετικών ομάδων ώστε να διερευνηθεί διεξοδικότερα η χημική σύνθεση του ετεροκυκλικού δακτυλίου. Έτσι, μελετήθηκε μια νέα οικογένεια αναστολέων όπου η 1,2,4-τριάζολο ομάδα αντικαταστάθηκε από έναν ιμιδαζολικό δακτύλιο. Στόχος του σχεδιασμού ήταν αφενός να διατηρηθεί ο δεσμός υδρογόνου του συνδέτη με την κύρια αλυσίδα του His377 (Gyorgydeak et al. 2004, Toth et al. 2009, Hayes et al. 2014) και αφετέρου να διερευνηθεί η αντικατάσταση του αζώτου (δεκτικό σε δεσμούς υδρογόνου) της θέσης 4 του ετεροκυκλικού δακτυλίου από άνθρακα (δεν μπορεί να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου).

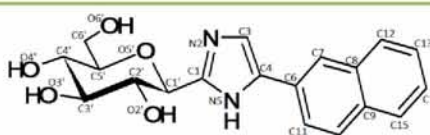
Η μελέτη της δραστηριότητας 4(5)-αρυλ-2-C-ιμιδάζολο γλυκοπυρανονουκλεοζιτών έναντι της rmGP έδειξε πως αυτοί αποτελούν ισχυρούς αναστολείς με σταθερές αναστολής (K_i) της τάξης nM (Bokor et al. 2015). Από αυτούς ο **BEva349** αποτελεί τον πλέον ισχυρό αναστολέα που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα

για το καταλυτικό κέντρο με σταθερά αναστολής (K_i) 31 nM (Bokor et al. 2015). Οι ενώσεις αυτές συντέθηκαν από το εργαστήριο του Prof. László Somsák του τμήματος Οργανικής Χημείας, του Πανεπιστημίου του Debrecen, Ουγγαρίας και παραχωρήθηκαν, στο πλαίσιο συνεργασίας, στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Σκοπός της μελέτης τους ήταν να επιβεβαιωθεί η βιοδραστικότητα των αναστολέων στο φαρμακευτικό στόχο για τον σχεδιασμό αντιδιαβητικών φαρμάκων, την hIGPa και να προσδιοριστεί η δομή των συμπλόκων των ενώσεων με την rmGPb ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής που προκαλούν.

12.1 Κινητικές μελέτες

Στον Πίνακα 12.1 παρουσιάζεται η χημική δομή των ενώσεων καθώς και η σταθερά αναστολής (K_i) έναντι της hIGPa μετά τα κινητικά πειράματα, ενώ για συγκριτικούς σκοπούς προσδιορίστηκε επίσης η σταθερά αναστολής έναντι της rmGPa.

Πίνακας 12.1: Ονομασία, χημική δομή και τιμές της σταθεράς αναστολής (K_i) των ενώσεων έναντι της hIGPa και της rmGPa.

Ένωση	Χημική Δομή	hIGPa K_i (μ M)	rmGPa K_i (μ M)
BEva349		$0,0260 \pm 0,0006$	$0,065 \pm 0,003$

BEva250		0,156 ± 0,008	0,226 ± 0,01
SzA37		0,143 ± 0,005	0,125 ± 0,008
BEva803		0,151 ± 0,006	0,186 ± 0,011

Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών έδειξαν ότι όλες οι ενώσεις είναι συναγωνιστικοί αναστολείς σε σχέση με το υπόστρωμα Glc-1-P και παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση με σταθερές αναστολής της τάξης των nM. Όλοι οι αναστολείς παρουσίασαν παρόμοιες τιμές για την K_i τόσο για την ηπατική (hlGPα) όσο και για την μυϊκή (mGPα) ισομορφή και το μοτίβο δραστηκότητας είναι ίδιο και για τις δυο πρωτεΐνες. Οι τιμές αυτές είναι σε συμφωνία με τις αντίστοιχες τιμές K_i που βρέθηκαν για την mGPβ (Bokor et al. 2015), υποδεικνύοντας ότι οι αναστολείς δεν εμφανίζουν επιλεκτικότητα για κάποια από τις τρεις ισομορφές.

Όλες οι ενώσεις φέρουν ως συνδέτη τον ιμιδαζολικό δακτύλιο και διαφέρουν στο μέγεθος του υποκαταστάτη R. Συγκεκριμένα ο **BEva250** φέρει έναν δακτύλιο φαινυλίου ως

υποκαταστάτη R ενώ στον αναστολέα **BEva349** ο υποκαταστάτης R αντικαταστάθηκε από την ομάδα 2-νάφθυλο. Η αλλαγή αυτή στο μέγεθος του υποκαταστάτη R είχε σημαντική επίδραση στην δραστηκότητα καθώς ο **BEva349** αποτελεί τον πλέον βιοδραστικό αναστολέα που έχει βρεθεί για το καταλυτικό κέντρο της GP μέχρι σήμερα. Οι ενώσεις **BEva803** και **SzA37** φέρουν τους ίδιους υποκαταστάτες με τους **BEva250** και **BEva349** αντίστοιχα, ωστόσο το O2' του τμήματος της γλυκοκυρανόζης έχει αντικατασταθεί από μια ομάδα $-NH_2$. Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι και στις δυο περιπτώσεις οι αναστολείς που φέρουν την ομάδα 2-νάφθυλο ως υποκαταστάτη R είναι πιο βιοδραστικοί σε σύγκριση με αυτούς που φέρουν το φαινύλιο υποδεικνύοντας ότι λόγω του μεγέθους του σχηματίζει περισσότερες αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη οι οποίες συμβάλλουν στην αύξηση της δραστηκότητας τους.

12.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

12.2.1 Συλλογή και βελτιστοποίηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Ακολούθησε προσδιορισμός της δομής της gmGPb σε σύμπλοκο με κάθε έναν από τους αναστολείς. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν μέσω διάχυσης του διαλύματος των αναστολέων σε σχηματισμένους κρυστάλλους της gmGPb. Ο εμποτισμός των κρυστάλλων έγινε με διάλυμα αναστολέων 10mM στο διάλυμα ανάπτυξης τους στο οποίο είχε επίσης προστεθεί και DMSO (15 % v/v), για 3 h πριν την συλλογή δεδομένων σε θερμοκρασία δωματίου. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων όλων των αναστολέων έγινε με συγχροτρωνική πηγή ακτίνων X, στο σταθμό ID911-2 του Max-lab, στο Lund, σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο προσδιορισμός της ομάδας χώρου, ο προσδιορισμός του προσανατολισμού του κρυστάλλου, η ολοκλήρωση των περιθλάσεων, η συγχώνευση πλαισίων πειραματικών δεδομένων, η άθροιση των μερικώς καταγεγραμμένων περιθλάσεων και η αναγωγή των δεδομένων έγιναν με το πρόγραμμα Mosflm (Leslie and Powell 2007). Η ισοζύγηση και η συγχώνευση των εντάσεων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα SCALA του πακέτου προγραμμάτων CCP4 (CCP4 1994). Η βελτιστοποίηση των δομών των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum-likelihood) με το πρόγραμμα REFMAC (CCP4 1994). Το αρχικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση των συ-

μπλόκων και τον υπολογισμό των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $2F_o-F_c$, F_o-F_c ήταν η δομή της gmGPb (διαμόρφωση T) σε ευκρίνεια 1,9 Å (Leonidas et al. unpublished results).

Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$, έδειξε πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο όλων των συμπλόκων αναστολέων-ενζύμου που υποδήλωνε τη σύνδεση των ενώσεων σε αυτό. Τα μοριακά μοντέλα των αναστολέων κατασκευάστηκαν με το πρόγραμμα JLigand (CCP4 1994), προσαρμόστηκαν στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας μετά από προσαρμογή των γωνιών στρέψης και συμπεριλήφθηκαν στη διαδικασία της βελτιστοποίησης κατά τα τελευταία στάδια της. Ακολούθησε ανοικοδόμηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών COOT (Emsley and Cowtan 2004). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπίζονταν στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ με σ 1.0 (σ η τυπική απόκλιση της έντασης της περίθλασης). Τέλος πολλαπλοί κύ-

κλοι βελτιστοποίησης με το πρόγραμμα REF-MAC είχε ως αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση ατομικών συντεταγμένων (positional refinement) και τη βελτιστοποίηση του ατομικού ισοτροπικού συντελεστή θερμοκρασίας B (B factor), βελτιώνοντας την ποιότητα των μοντέλων. Ο έλεγχος της στερεοχημείας των αμινοξικών καταλοίπων έγινε με το πρόγραμμα MolProbity (Chen et al. 2010). Η αξιολόγηση του μοντέλου έγινε πληρώντας τα κριτήρια που αναφέρονται στις παραγράφους 4.7, 4.9.

Οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις van der Waals του αναστολέα με τα αμινοξικά κατάλοιπα του ενζύμου υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα CONTACT (CCP4 1994). Οι δεσμοί υδρογόνου αποδίδονται από το πρόγραμμα CCP4 όταν η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροαρνητικών α-

τόμων είναι μικρότερη από 3.3 Å και αν η γωνία που σχηματίζεται μεταξύ των δύο αυτών ατόμων και του προηγούμενου (ή επόμενου) είναι μεγαλύτερη από 90°. Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals ορίζονται για μη υδρογονικά άτομα που απέχουν μεταξύ τους λιγότερο από 4 Å. Τέλος χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα γραφικών PyMol (DeLano 2002) και LigPlot (Wallace et al. 1995) για την μοριακή απεικόνιση των τρισδιάστατων μακρομοριακών μορίων. Στον πίνακα 12.2 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και της βελτιστοποίησης της δομής των συμπλόκων (οι δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου).

Πίνακας 12.2: Στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας δεδομένων και βελτιστοποίησης των συμπλόκων των αναστολέων

Σύμπλοκο gmGPb	BEva250	BEva349	SzA37	BEVA803
<i>Στατιστικοί δείκτες συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων</i>				
Ευκρίνεια (Å)	38.39 – 1.85	38.76 – 1.85	38.42 – 1.90	40.86 – 1.90
Απώτερη στοιβάδα (Å)	1.95 – 1.85	1.95 – 1.85	2.00 – 1.90	2.00 – 1.90
Μετρήσεις	323721	326554	303742	352273
Αριθμός μοναδικών περιθλάσεων	82598	74394	75575	76499
Πολλαπλότητα	3.9 (3.9)	4.4 (4.1)	4.0 (4.0)	4.6 (4.6)
R_{sym}	0.069 (0.428)	0.111 (0.450)	0.073 (0.450)	0.073 (0.468)

Πληρότητα (%)	99.3 (98.7)	89.9 (94.8)	98.4 (97.7)	99.6 (99.2)
$\langle I/\sigma I \rangle$	12.2 (3.3)	4.9 (2.6)	11.8 (3.5)	12.0 (3.2)
Στατιστικοί δείκτες βελτιστοποίησης				
R_{cryst}	0.158 (0.240)	0.170 (0.240)	0.154 (0.234)	0.155 (0.238)
R_{free}	0.188 (0.260)	0.203 (0.286)	0.182 (0.274)	0.189 (0.281)
Αριθμός μορίων ύδατος	321	324	300	309
Απόκλιση r.m.s. από τις ιδεατές τιμές				
στο μήκος των δεσμών (Å)	0.010	0.010	0.010	0.010
στη γωνία (°)	1.3	1.3	1.4	1.3
Μέση τιμή παράγοντα B (Å²)				
Άτομα πρωτεΐνης	30.7	29.8	29.9	31.1
Μόρια ύδατος	36.9	36.1	34.8	36.2
Προσδέτης	18.0	17.4	17.5	18.7

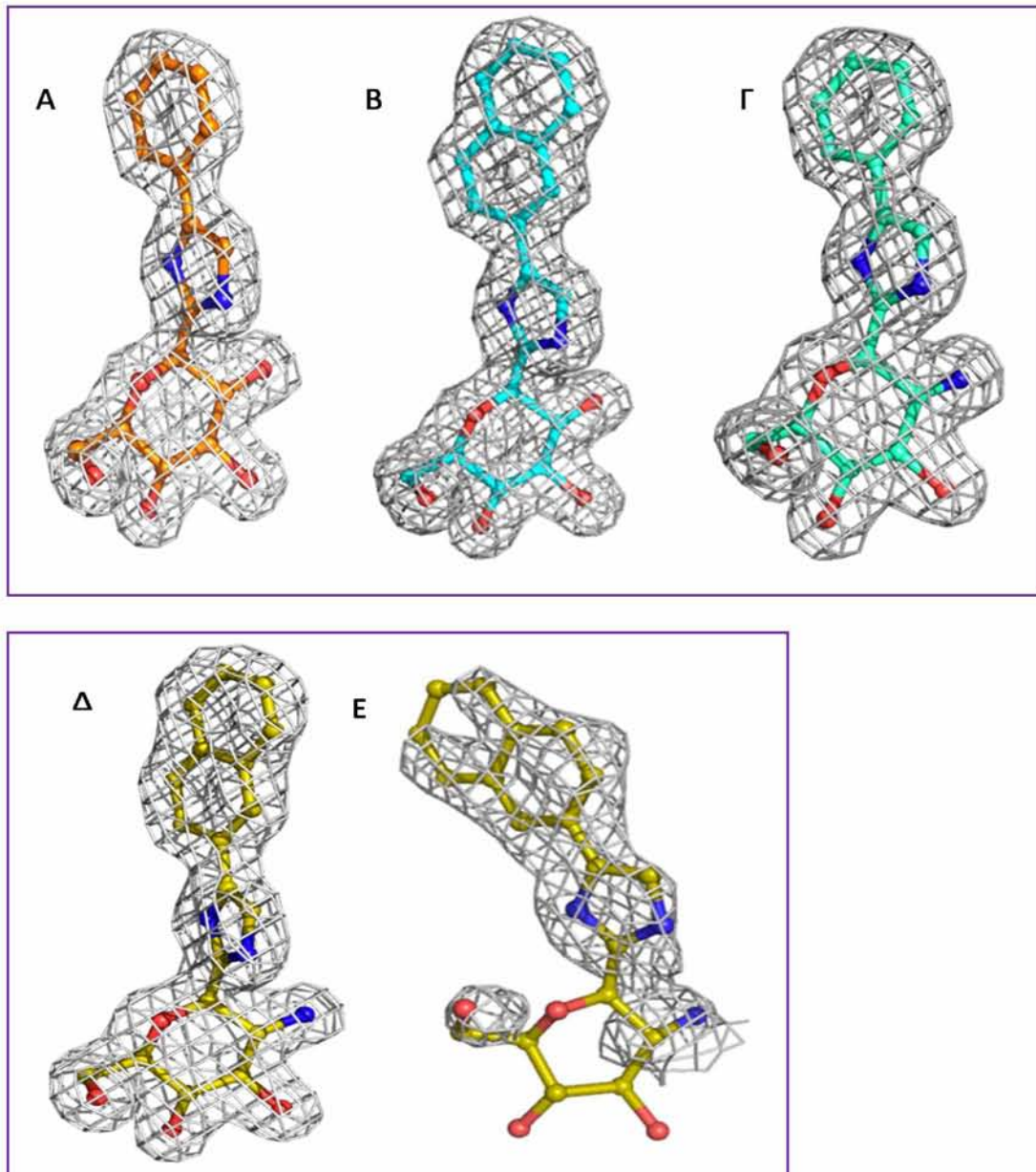
12.2.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης

Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας ($F_o - F_c$ και $2F_o - F_c$) για όλα τα σύμπλοκα ήταν υψηλής ποιότητας υποδεικνύοντας τη σύνδεση τους στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Επιπροσθέτως, στο σύμπλοκο του **SzA37** παρατηρήθηκε επιπρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου, υποδηλώνοντας την πρόσδεση του **SzA37** στο κέντρο αυτό. Ακολούθησε ανάλυση των χαρτών της ηλεκτρονιακής πυκνότητας όπου προσδιορίστηκε ο προσανατολισμός και η θέση των

ατόμων των αναστολέων στο σύμπλοκο με την gmGPb (Εικόνα 12.1). Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας του **SzA37** (Εικόνα 12.1) στο νέο αλλοστερικό κέντρο υπέδειξε πως η σχετική πληρότητα της κατάληψης στο κέντρο αυτό είναι μικρότερη του 1.0 (στο καταλυτικό κέντρο είναι 1.0). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως το καταλυτικό είναι το πρωτοταγές κέντρο σύνδεσης και έχει σημαντικά μεγαλύτερη αγκιστεία για τον **SzA37** από εκείνη που έχει το νέο αλλοστερικό. Η πρόσδεση του αναστολέα στο νέο αλλοστερικό κέντρο φαίνεται πως οφεί-

λεται στην υψηλή σχετικά με την K_i συγκέντρωση (10 mM) του διαλύματος του αναστολέα που χρησιμοποιήθηκε στα κρυσταλλογραφικά πειράματα. Θα πρέπει εντούτοις να σημειωθεί πως και στους άλλους αναστολείς (**BEva250**, **BEva349** και **BEva803**)

που χρησιμοποιήθηκε η ίδια συγκέντρωση διαλύματος αναστολέα για το σχηματισμό των συμπλόκων πρωτεΐνης-αναστολέα δεν παρατηρήθηκε σύνδεση στο νέο αλλοστερικό κέντρο.



Εικόνα 12.1: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ των Α) **BEva250**, Β) **BEva349** Γ) **BEva803**, Δ) **SzA37** στο καταλυτικό κέντρο Ε) **SzA37** στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Οι δομές των μορίων προσαρμόστηκαν στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ με σ 1.0 πριν από την διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Στη συνέχεια αναλύθηκαν οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν οι αναστολείς με τα αμινοξέα και τα μόρια ύδατος του κατα-

λυτικού κέντρου με έμφαση κυρίως στην περιοχή της β-εσοχής, και του νέου αλλοστερικού κέντρου.

Πίνακας 12.3: Εν δυνάμει δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ατόμων των αναστολέων και των ατόμων των αμινοξέων του καταλυτικού και του νέου αλλοστερικού κέντρου στον κρύσταλλο.

Άτομο αναστολέα	Άτομο πρωτεΐνης	BEva250	BEva349	BEva803	SzA37(1)*	SzA37(2)*
O2'	Tyr573 OH	3.1	3.1	-	-	
	Asn284					
	ND2	3.3	2.9	-	-	
	Glu672					
	OE1	3.2	3.1	-	-	
	Μόριο ύδατος	2.9	2.9	-	-	
O3'	Μόριο ύδατος	2.9	3.0	-	-	
	Glu672					
	OE1	2.8	2.7	2.9	2.8	
	Ala673 N	3.3	3.3	3.3	-	
O4'	Ser674 N	3.1	3.1	3.1	3.1	
	Gly675 N	3.2	3.1	3.1	3.2	
	Gly675 N	2.9	2.9	2.9	2.9	
O4'	Μόριο ύδατος	2.7	2.6	2.7	2.7	2.9
	His377					
O6'	ND1	2.7	2.7	2.7	2.8	
	Asn484					
	ND2	2.8	2.8	2.8	2.8	
N2	Ala192					2.5
	His377 O	2.9	2.9	2.8	2.8	
N5	Μόριο ύδατος	2.8	2.8	2.8	2.8	3.3
N2'	Asn284ND2	-	-	-	-	
	Tyr573 OH	-	-	3.2	3.2	
	Glu672					
	OE1	-	-	3.2	3.2	
	Μόριο ύδατος			3.0	3.0	
N2'	Μόριο ύδατος			3.2	3.2	
Σύνολο		15	15	14	13	3

*Η ονομασία SzA37(1) αναφέρεται στο μόριο του αναστολέα που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο και η ονομασία SzA37(2) στο μόριο που προσδένεται στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου.

Όλοι οι αναστολείς κατά την πρόσδεση τους συμμετέχουν σε ένα παρόμοιο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα και τα μόρια ύδατος του καταλυτικού κέντρου. Η γλυκοκυρανόζη συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις με αμινοξικά κατάλοιπα που έχουν παρατηρηθεί και σε άλλους αναστολείς, της παρούσας διατριβής. Το άτομο N2 του ιμιδαζολικού δακτύλιου σε όλους τους αναστολείς σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό O της His377, που έχει παρατηρηθεί και στους αναστολείς που φέρουν το 1,2,4 τριαζόλιο. Όλοι οι αναστολείς σχηματίζουν παρόμοιο αριθμό δεσμών υδρογόνου, ενώ στην περίπτωση των **SzA37** και **BEva803** η αντικατάσταση του O2' της γλυκόζης από την ομάδα -NH₂- έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ενός δεσμού υδρογόνου με την Asn284. Το μόριο του **SzA37** που προσδένεται στο νέο αλλοστερικό κέντρο σχηματίζει μόνο τρεις δεσμούς υδρογόνου (Πίνακας 12.3), αριθμός που ενδέχεται να δικαιολογεί την ασθενή σύνδεση στο κέντρο αυτό σε σύγκριση με το καταλυτικό.

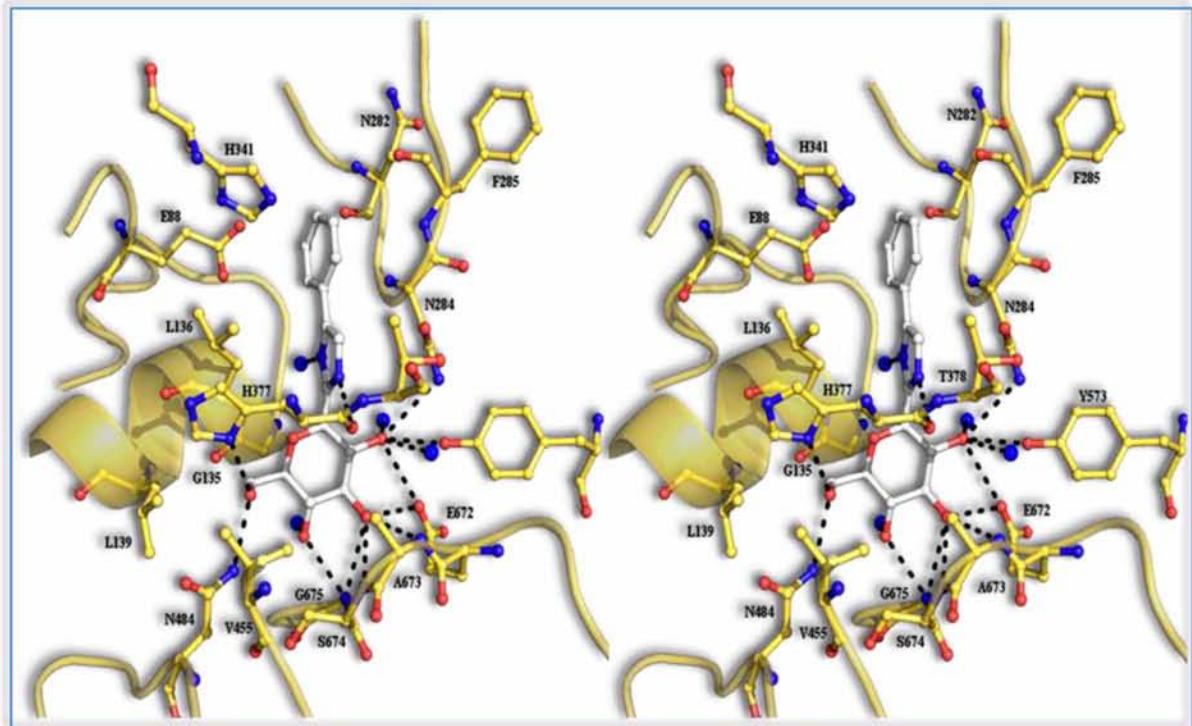
Οι μικρές διαφορές στις αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου των αναστολέων δεν είναι αρκετές ώστε να εξηγήσουν τη διαφορά στην ανασταλτική δραστηριότητα τους και για αυτό μελετήθηκαν στη

συνέχεια, οι αλληλεπιδράσεις van der Waals με ιδιαίτερη έμφαση σε εκείνες με αμινοξικά κατάλοιπα στη β-εσοχή. Ο πλέον βιοδραστικός αναστολέας **BEva349** κατά την πρόσδεση του σχηματίζει 105 αλληλεπιδράσεις van der Waals με αμινοξέα και μόρια ύδατος του καταλυτικού κέντρου ενώ ο **BEva250** που φέρει μικρότερο υποκαταστάτη R σχηματίζει 86. Συγκεκριμένα οι υποκαταστάτες R και των δυο αναστολέων συμμετέχουν σε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων van der Waals εντός της β-εσοχής με τα αμινοξέα Glu88, Asn282, Asn284, Phe285, His341 ενώ η ομάδα 2-νάφθυλο του **BEva349** συμμετέχει εντός της β-εσοχής σε επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις με τα Asn282 (1), Phe285 (3), Phe286 (1), Arg292 (2), His341 (3), και Ala383 (1) (Εικόνες 12.2, 12.4).

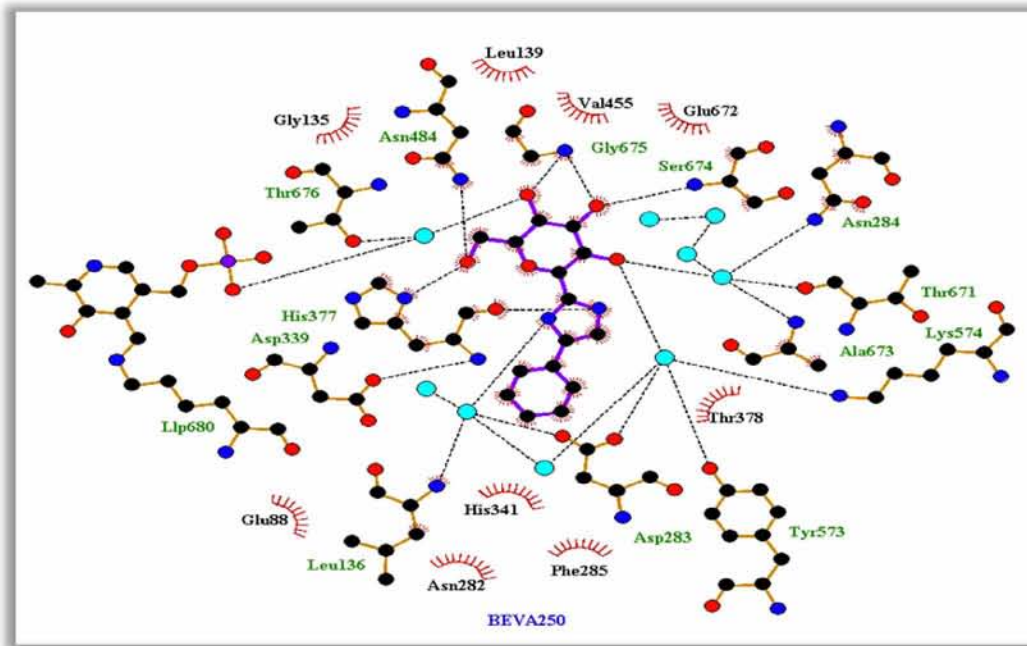
Υπέρθωση των δομών των δυο συμπλόκων έδειξε ότι και οι δυο αναστολείς προσδένονται με παρόμοιο τρόπο ενώ δεν παρουσιάζονται σημαντικές δομικές διαφορές που να διαταράζουν την διαμόρφωση των αμινοξέων ή του υδατικού δικτύου του καταλυτικού κέντρου. Και οι δυο αναστολείς εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του βρόχου 280s (Asn282, Asn284, Phe285) σταθεροποιώντας την κλειστή διαμόρφωση του, προωθώντας έτσι την μετάβαση προς τη διαμόρφωση T. Η μοναδική διαφορά εντοπίζεται στο

κατάλοιπο Asn284 το οποίο απομακρύνεται από τον **BEva349** κατά 0,45 Å (θέση του ατόμου C^α) χωρίς ωστόσο η μετατόπιση αυτή να διαταράξει τη διαμόρφωση των υπολοίπων καταλοίπων του βρόχου 280s.

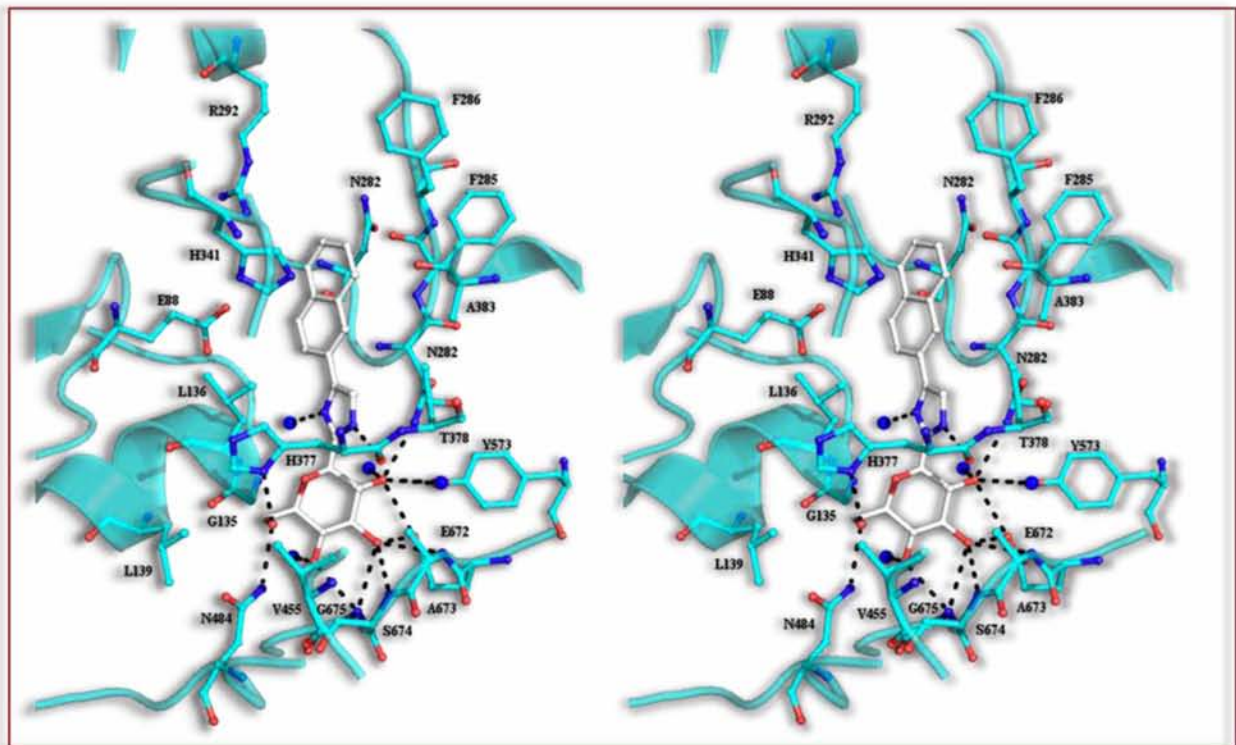
Τέλος και οι δυο αναστολείς συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μέσω μορίων ύδατος με τα κατάλοιπα Leu136, Ala673, Thr671, Thr676, Tyr573, Lys574, Asp283 αλλά και με το συνένζυμο PLP (Εικόνες 12.3, 12.5).



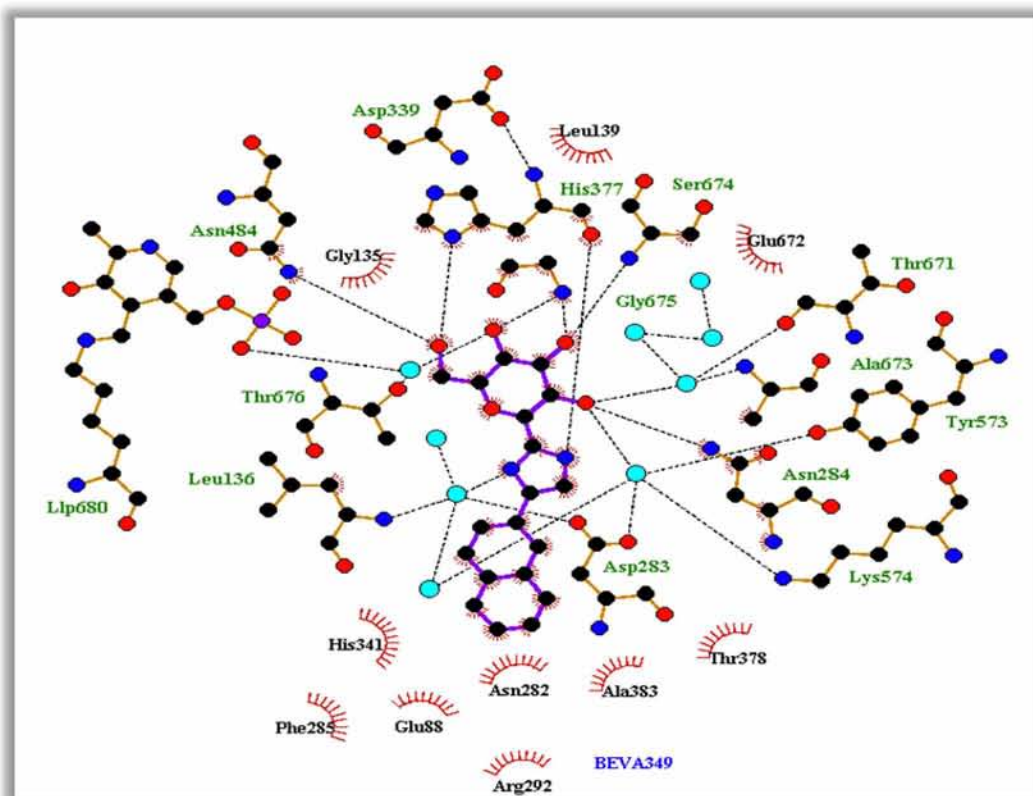
Εικόνα 12.2: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων του **BEva250** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές.



Εικόνα 12.3: Απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων του **BEva250** (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος) με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου.



Εικόνα 12.4: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων του **BEva349** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές



Εικόνα 12.5: Απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων του **BEva349** (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος) με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου.

Ο **SzA37** κατά την πρόσδεση του σχηματίζει 98 αλληλεπιδράσεις van der Waals με αμινοξέα και μόρια ύδατος του ενεργού κέντρου ενώ **BEva803** που έχει υποκαταστάτη R μικρότερου μήκους σχηματίζει 83 αλληλεπιδράσεις. Οι αναστολές συμμετέχουν σε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων εντός της β-εσοχής, παρόμοιο με εκείνο που παρατηρήθηκε στους προηγούμενους αναστολές με τα αμινοξέα Glu88, Asn282, Asn284, Phe285, His341 ενώ όπως παρατηρήθηκε και στον **BEva349**, η ομάδα 2-νάφθυλο του **SzA37** συμμετέχει σε επιπλέον αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα Ala383, Arg292, Phe286 (Εικόνες 12.6,12.8). Και οι δυο αναστολές

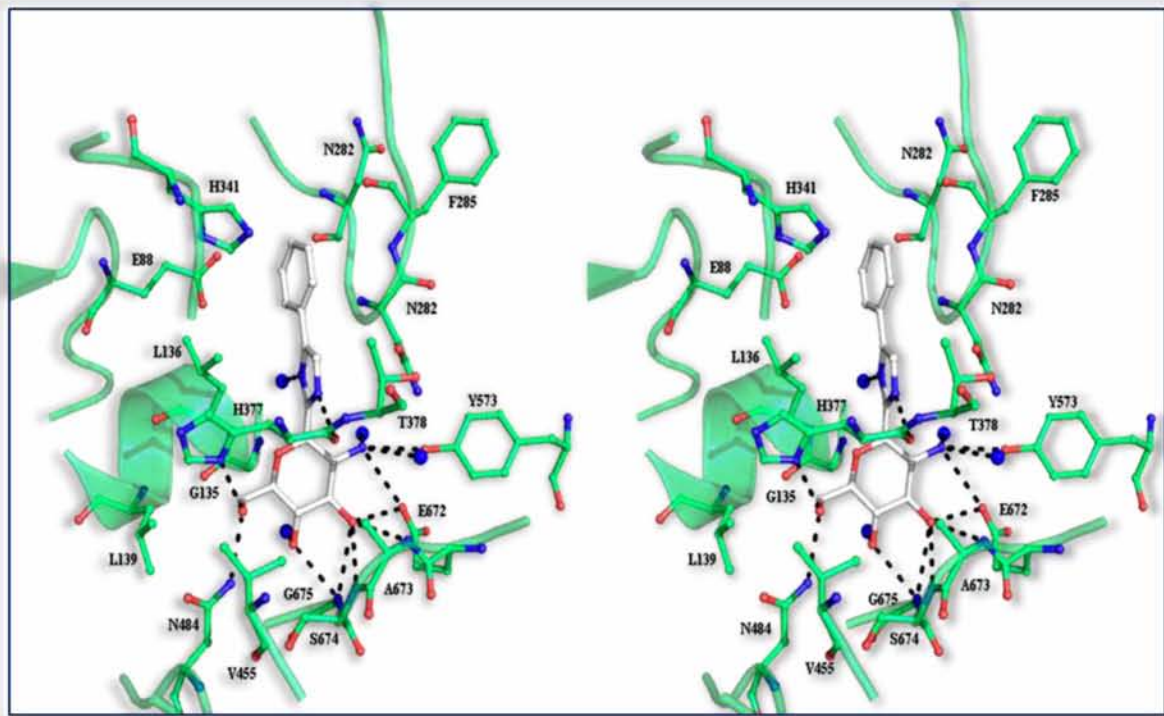
εμπλεκονται σε αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του βρόχου 280s (Asn282, Asn284, Phe285) σταθεροποιώντας την κλειστή διαμόρφωση του, προωθώντας έτσι την μετάβαση προς τη διαμόρφωση T. Υπέρθωση της δομής των δυο συμπλόκων έδειξε ότι και οι δυο ενώσεις προσδέονται με παρόμοιο τρόπο στο καταλυτικό κέντρο ενώ δεν εμφανίζονται σημαντικές δομικές διαφορές που να διαταράζουν την διαμόρφωση των αμινοξέων ή του υδατικού δικτύου του καταλυτικού κέντρου και διατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις μέσω μορίων ύδατος με τα κατάλοιπα Ala673, Thr671, Thr676, Tyr573, Lys574, Asp283 αλλά και με το συνένζυμο PLP (Εικόνα

12.7, 12.9) που είδαμε και στα προηγούμενα σύμπλοκα.

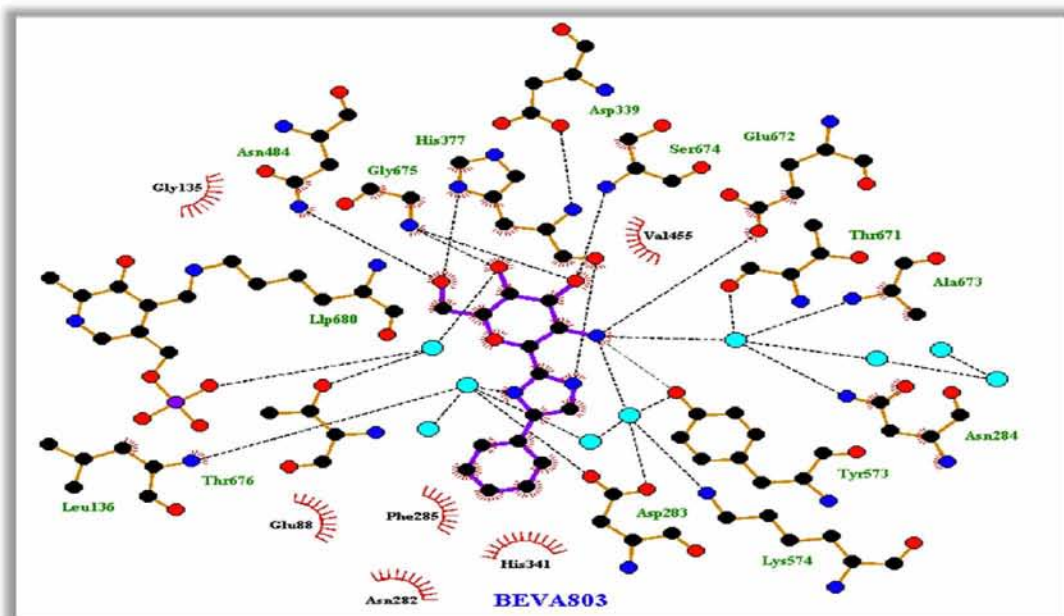
Η διαφορά ανάμεσα στα σύμπλοκα όπως εμφανίστηκε μετά από υπέρθεση της δομής των συμπλόκων **SzA37** και **BEva803** με αυτή του **BEva349** αφορά την Asn284, της οποίας η πλευρική αλυσίδα μετατοπίζεται κατά 1,6 Å στο σύμπλοκο του **SzA37** και κατά 2,1 Å στο σύμπλοκο του **BEva803** από τη θέση που κατέχει στα δυο άλλα σύμπλοκα. Η μετατόπιση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του δεσμού υδρογόνου με το N2' αλλά και μια μικρή μετατόπιση των υπόλοιπων καταλοίπων του βρόχου 280s (282-289) (r.m.s.d. 0,41 Å, 0,25 Å για τα άτομα του βρόχου 280s στα σύμπλοκα **SzA37** και **BEva803**, αντίστοιχα).

Το μόριο του **SzA37** που προσδένεται στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου συμμετέχει σε 90 αλληλεπιδράσεις van der Waals. Το μόριο της γλυκοπυρανόζης

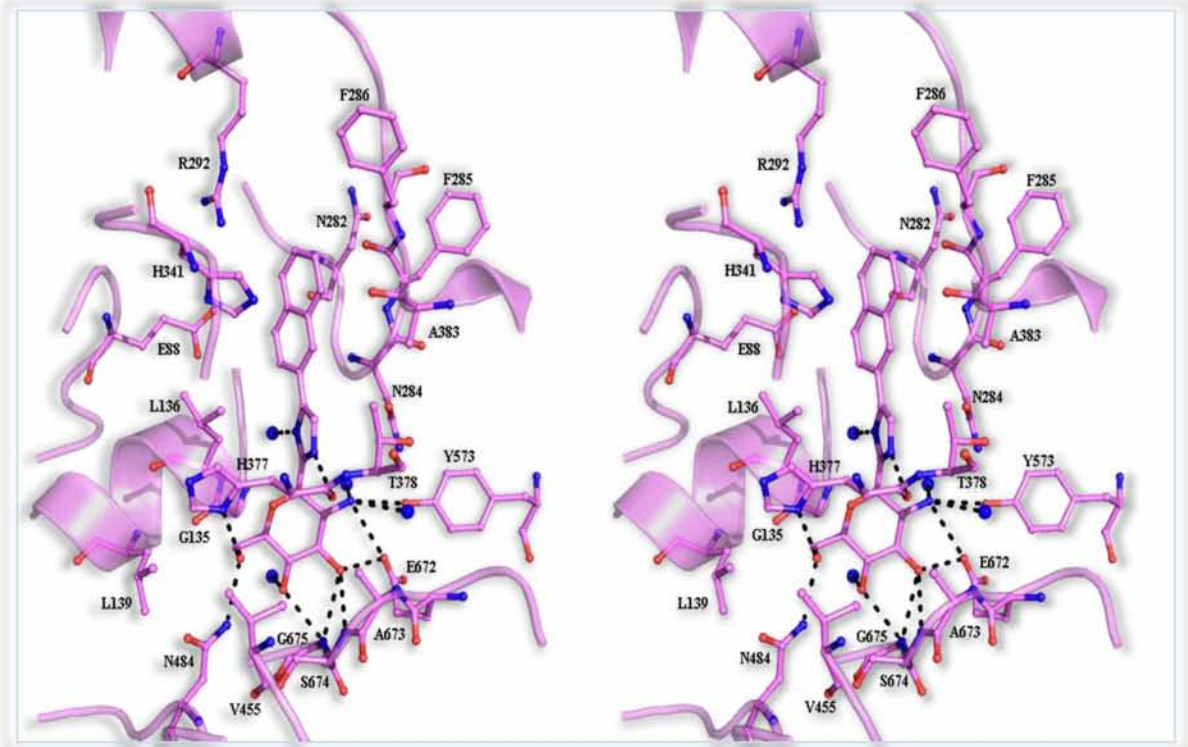
συμμετέχει σε άμεσες αλληλεπιδράσεις μόνο με τα κατάλοιπα Glu190, Lys191, Ala192. Ο **SzA37** σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με την Asn187, ενώ ο υποκαταστάτης R σχηματίζει ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με τις Arg60, Val64, Trp67, Glu190, Lys191, Pro188, Trp189 και Pro229 αλλά και με τις Phe37', Thr38' και Val40' της συμμετρικής υπομονάδας (Εικόνες 12.10, 12.11). Εξετάζοντας τον παράγοντα θερμοκρασίας (B factor) των ατόμων του **SzA37** έδειξε ότι όλα τα άτομα της γλυκοπυρανόζης έχουν τιμές κατά 50% υψηλότερες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα άτομα του αναστολέα. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με τον μικρό αριθμό αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει το τμήμα της γλυκοπυρανόζης και η έλλειψη ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην περιοχή αυτή, φανερώνουν ότι ο αναστολέας προσδένεται ασθενώς στο νέο αλλοστερικό κέντρο.



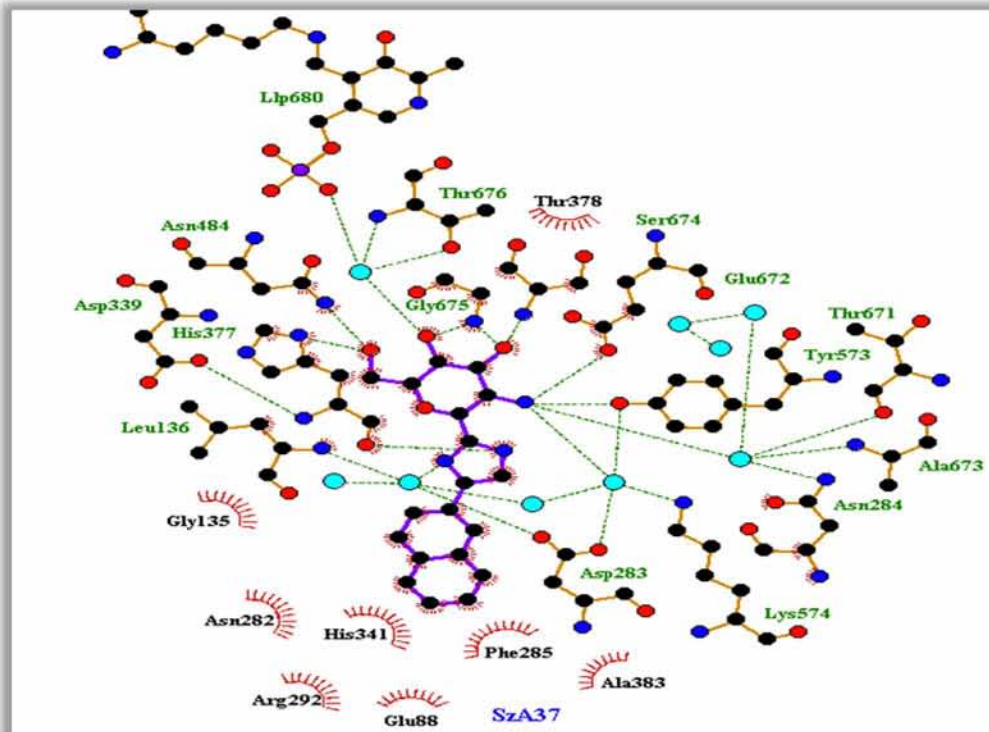
Εικόνα 12.6: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων του **BEVA803** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές



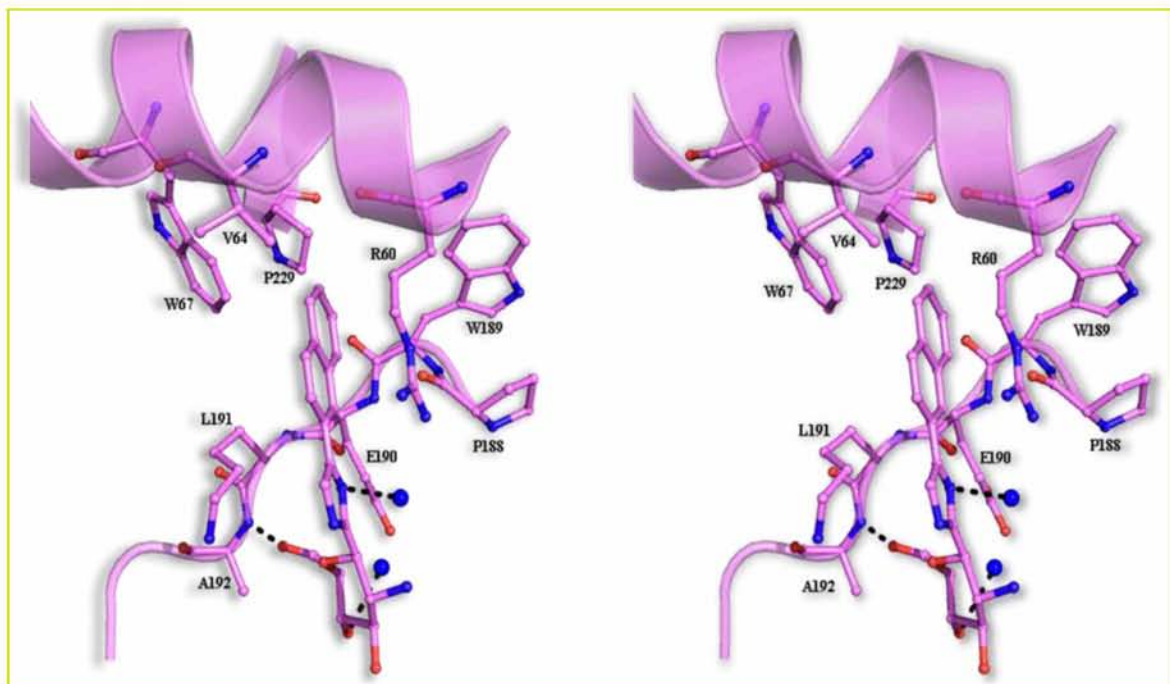
Εικόνα 12.7: Απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων του **BEVA803** (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος) με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου.



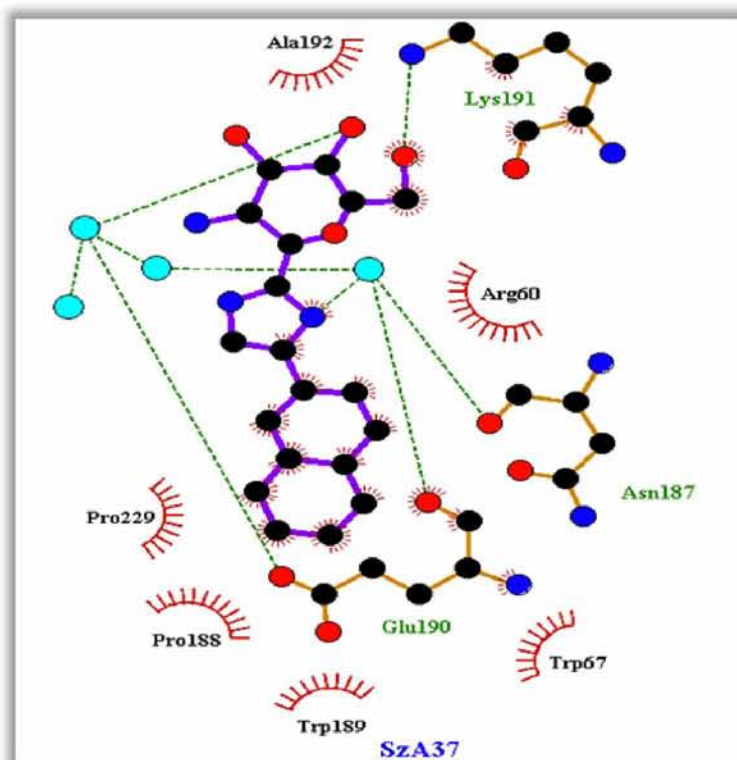
Εικόνα 12.8: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων του **SzA37** με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές



Εικόνα 12.9: Απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων του **SzA37** (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος) με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου



Εικόνα 12.10: Στερεοσκοπική απεικόνιση του δικτύου αλληλεπιδράσεων του **SzA37** με τα αμινοξέα του νέου αλλοστερικού κέντρου και με μόρια ύδατος (μπλε σφαίρες). Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές

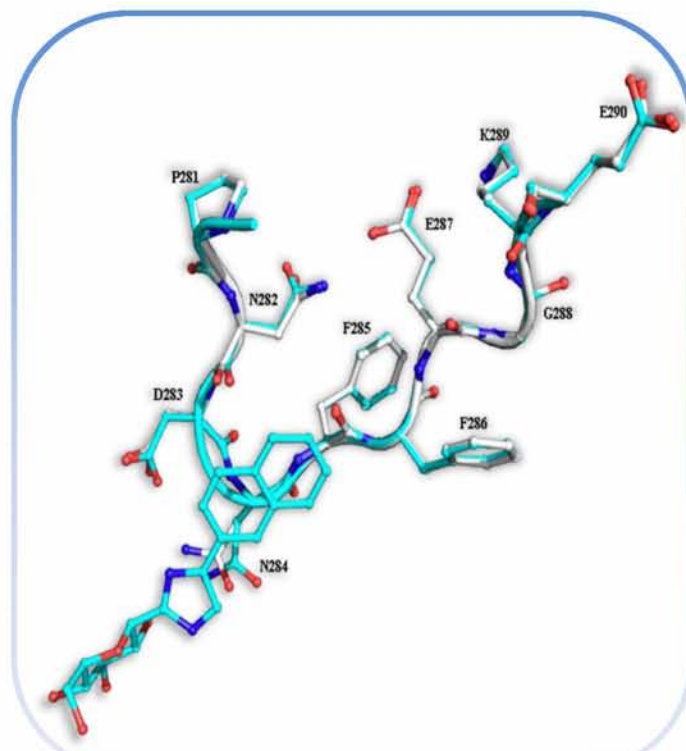
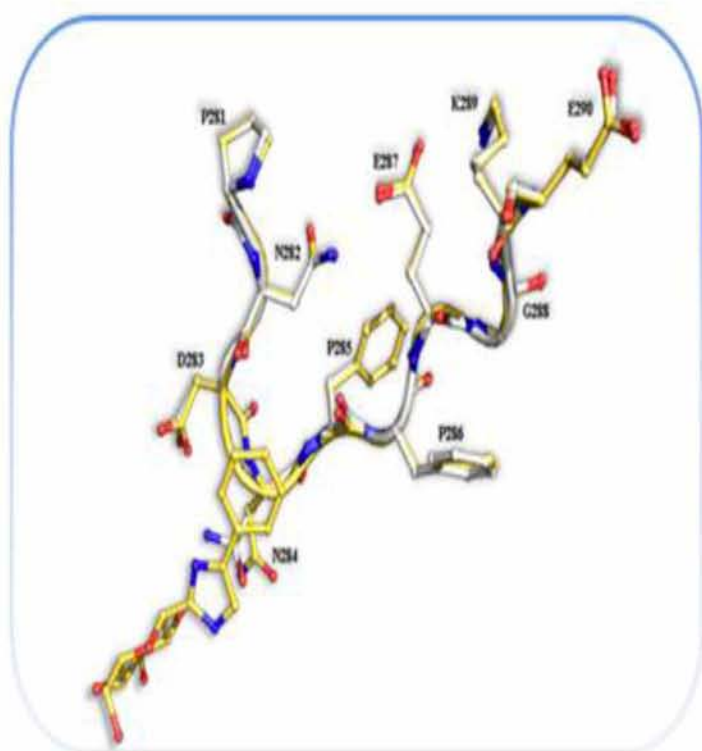


Εικόνα 12.11: Απεικόνιση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων του **SzA37** (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος) με τα αμινοξέα του νέου αλλοστερικού κέντρου.

Υπέρθωση της δομής των συμπλόκων **rmGPb-BEva349** και **rmGPb-BEva250** με τη δομή της ελεύθερης **rmGPb** έδειξε ότι και οι δυο αναστολείς προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου χωρίς να προκαλούν σημαντικές μεταβολές στη διαμόρφωση του βρόχου 280s ή στο υδατικό δίκτυο και οι τιμές **rmsd** είναι 0,8 Å και 0,84 Å για όλα τα άτομα των καταλοίπων 282-288 του βρόχου 280s, αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη αλλαγή στη διαμόρφωση του βρόχου και στα δυο σύμπλοκα αφορά στην πλευρική αλυσίδα της **Asn284**, η οποία μετατοπίζεται κατά 0,77 Å και 0,85 Å στα σύμπλοκα των **BEva349** και **BEva250** αντίστοιχα, για να δημιουργήσει χώρο για τον αναστολέα, χωρίς ωστόσο να διαταράσσεται η διαμόρφωση των υπόλοιπων καταλοίπων του βρόχου (Εικόνα 12.12). Από τη δομική ανάλυση προκύπτει

πως και οι δύο αναστολείς, **BEva349** και **BEva250** προσδένονται ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου σχηματίζοντας ένα παρόμοιο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με κατάλοιπα της β-εσοχής, ενώ και οι δυο σταθεροποιούν τον βρόχο 280s στην κλειστή του διαμόρφωση χωρίς να προάγουν σημαντικές δομικές μεταβολές στη διαμόρφωση του ενζύμου.

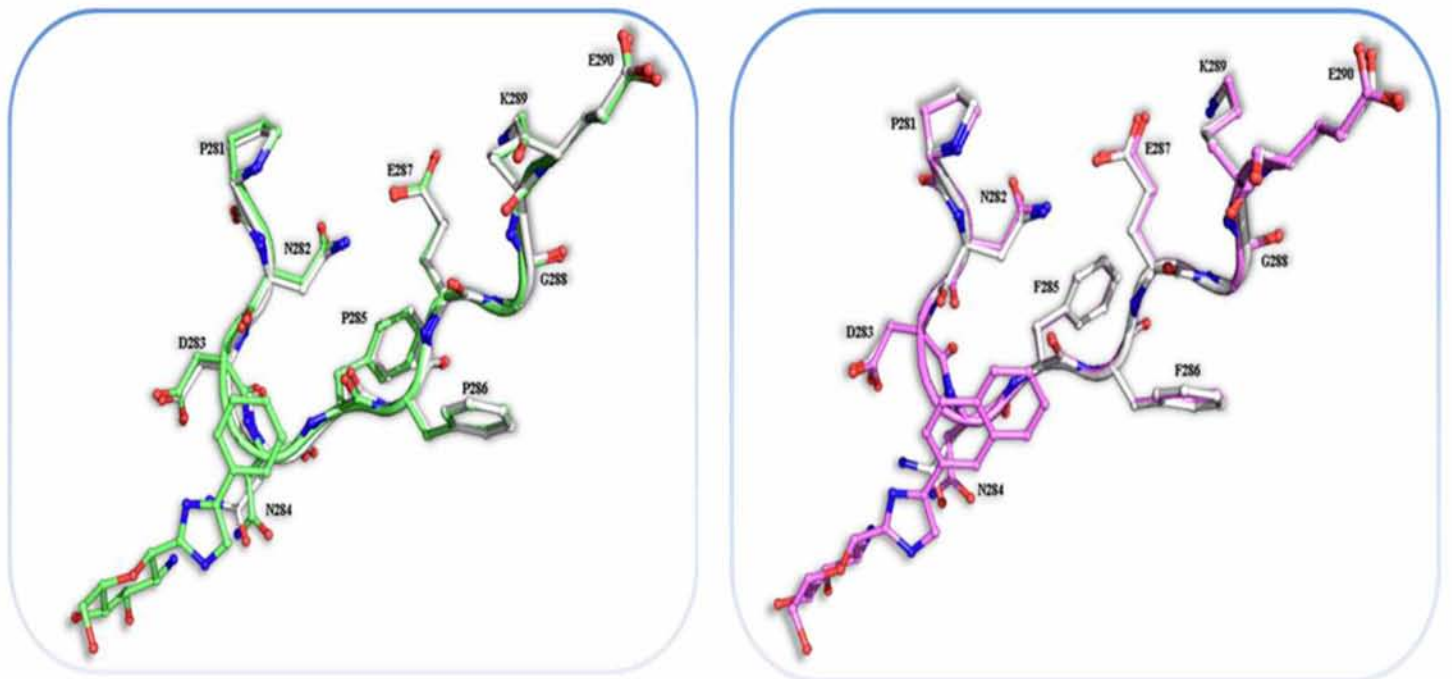
Η διαφορά στην ανασταλτική ισχύ των δυο αναστολέων, μπορεί ωστόσο να αποδοθεί στο μεγαλύτερο μήκος της 2-νάφθυλο στο **BEva349** ο οποίος εκτείνεται εντός της β-εσοχής, με αποτέλεσμα ο αναστολέας να βρίσκεται εγγύτερα στο βρόχο 280s και να σχηματίζει μεγαλύτερο αριθμό αλληλεπιδράσεων *van der Waals* σε σύγκριση με τον **BEva250** αλλά και τους υπόλοιπους αναστολείς της παρούσας μελέτης.



Εικόνα 12.12: Υπέρθηση της δομής των συμπλόκων mGPb-**BEva250** (κίτρινο) και mGPb-**BEva349** (μπλε) με την δομή της ελεύθερης mGPb (λευκό).

Υπέρθηση της δομής των συμπλόκων mGPb-**SzA37** και mGPb-**BEva803** με τη δομή της ελεύθερης mGPb έδειξε ότι και οι δυο ενώσεις προσδένονται παρόμοια με τους προηγούμενους αναστολείς στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου χωρίς να προκαλούν σημαντικές μεταβολές στο βρόχο 280s ή στο υδατικό δίκτυο και οι τιμές r.m.s.d. είναι 0,74 Å και 0,85 Å για τα άτομα των καταλοίπων 282-288 του βρόχου

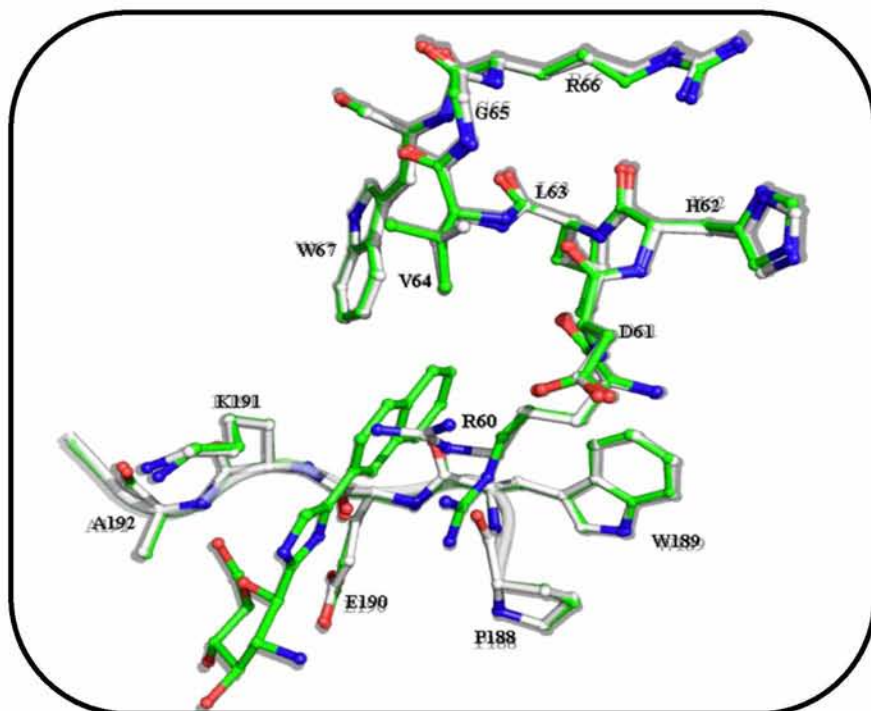
280s, αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη μετατόπιση στη δομή του βρόχου και στα δυο σύμπλοκα αφορά την πλευρική αλυσίδα της Asn284, που μετατοπίζεται κατά 0,82 Å στο σύμπλοκο του **SzA37** και κατά 0,74 Å στο σύμπλοκο του **BEva803**, όπως παρατηρήθηκε και προηγουμένως, για να δημιουργήσει χώρο για την πρόσδεση του αναστολέα (Εικόνα 12.13).



Εικόνα 12.13: Υπέρθωση της δομής των συμπλόκων mGPb-BEva803 (πράσινο) και mGP-SzA37 με την δομή της ελεύθερης mGPb (λευκό).

Η πρόσδεση του SzA37 στο νέο αλλοστερικό κέντρο προκαλεί μια πιο εκτεταμένη αναδιάταξη του νέου αλλοστερικού κέντρου όπως έδειξε η υπέρθεση του συμπλόκου mGPb-SzA37 και της mGPb στην ελεύθερη κατάσταση. Συγκεκριμένα η Arg60 περιστρέφεται για να αποφύγει την σύγκρουση με τον υποκαταστάτη του μορίου προκαλώντας μια μετατόπιση όλων των καταλοίπων της έλικας 60-64 (rmsd 1,03 Å για όλα τα άτομα των καταλοίπων

60-64) ενώ διαταράσσεται και το δίκτυο μορίων ύδατος της περιοχής καθώς τρία μόρια νερού εκτοπίζονται από την θέση τους ενώ άλλα τρία μετατοπίζονται (0,41 Å, 0,38 Å και 0,66 Å) μετά την πρόσδεση του αναστολέα (Εικόνα 12.14). Η ασθενής πρόσδεση της γλυκοπυρανόζης στην περιοχή αυτή υποδεικνύει ότι η πρόσδεση του αναστολέα στο νέο αλλοστερικό κέντρο καθοδηγείται από την 2-νάφθυλο ομάδα του μορίου.



Εικόνα 12.14: Υπέρθθεση της δομής του συμπλόκου mGP-SzA37 (πράσινο) με την δομή της ελεύθερης mGPb (λευκό) στο νέο αλλοστερικό κέντρο.

Η μειωμένη βιοδραστικότητα του SzA37 σε σύγκριση με αυτή του BEva349 που φέρει τον ίδιο υποκαταστάτη R πιθανόν να οφείλεται στην απώλεια του δεσμού υδρογόνου με την Asn284 λόγω της αντικατάστασης του O2' της γλυκοκυρανόζης καθώς οι αλληλεπιδράσεις με την περιοχή του βρόχου 280s είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη δραστηριότητα των αναστολέων. Επιπλέον η γλυκοκυρανόζη του BEva349 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την Ala673, μια αλληλεπίδραση που δεν παρατηρείται στο σύμπλοκο του SzA37 (Πίνακας 12.3). Η αδυναμία του SzA να σχηματίσει περισσότερες αλληλεπιδράσεις

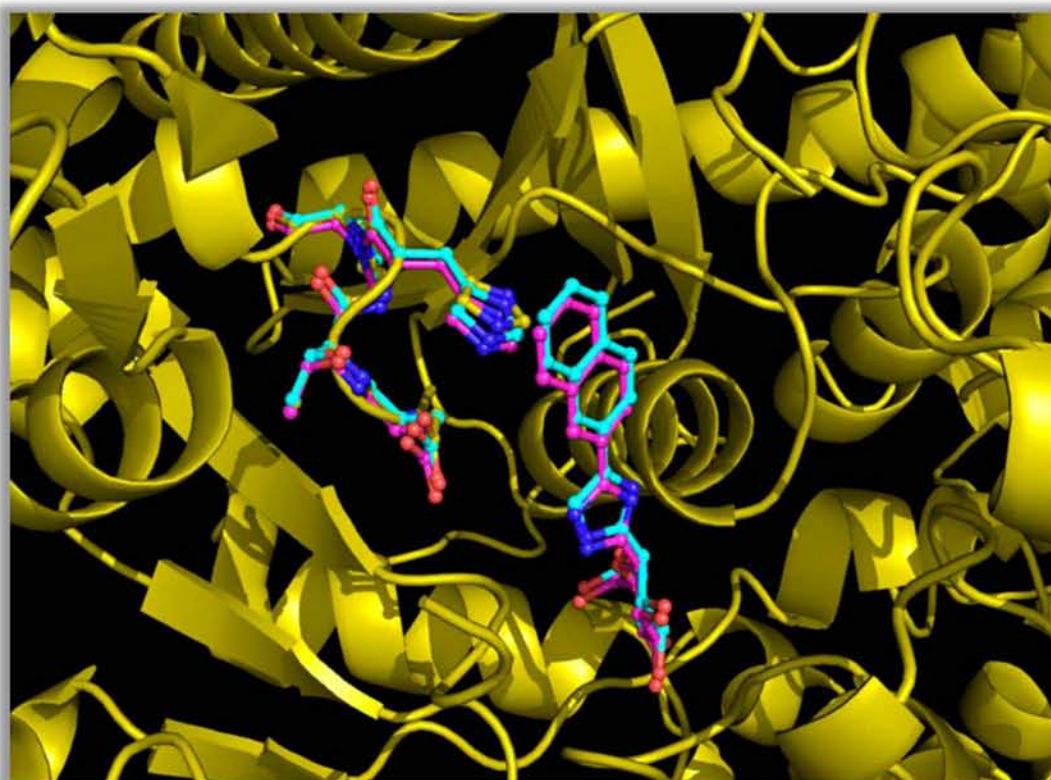
van der Waals σε σύγκριση με τον BEva349 ώστε να αντισταθμιστεί το ενεργειακό κόστος της απώλειας των δεσμών υδρογόνου της γλυκοκυρανόζης μπορεί να προσφέρει μια δομική εξήγηση για τη χαμηλότερη βιοδραστικότητα του SzA37.

Πιθανόν η πρόσδεση δυο μορίων του αναστολέα σε δυο διαφορετικά κέντρα σύνδεσης να έχει συνεργιστική δράση στην ανασταλτική ισχύ του προκαλεί ο SzA37 ωστόσο φαίνεται ότι το ενεργειακό κόστος της αναδιοργάνωσης του νέου αλλοστερικού κέντρου είναι μεγαλύτερο από την ενέργεια που συνεισφέρουν οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει στην περιοχή αυτή.

Ακολούθησε υπέρθεση της δομής των συμπλόκων rmGPb- **BEva349** και rmGPb- **KS389**, του πλέον βιοδραστικού αναστολέα της προηγούμενης μελέτης, που φέρει τον 1,2,4-τριαζολικό δακτύλιο ως συνδέτη με τη δομή της ελεύθερης rmGPb, ώστε να μελετηθεί η διαφορά στην ανασταλτική τους δραστηριότητα και η συμβολή του ιμιδαζολίου στη βιοδραστικότητα των αναστολέων, καθώς οι δυο αναστολείς φέρουν τον ίδιο υποκαταστάτη R.

Οι δυο αναστολείς εμπλέκονται σε ένα παρόμοιο δίκτυο αλληλεπιδράσεων και σχηματίζουν 15 δεσμούς υδρογόνου και 105 αλληλεπιδράσεις van der Waals ο **BEva349** και 109 ο **KS389**. Το επιπλέον άτομο αζώτου στον τριαζολικό συνδέτη του **KS389** δεν συμμετέχει σε κανέναν απευθείας δεσμό υδρογόνου ή δεσμό υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος και συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα His377, Asn484, Thr378 (7) ενώ το αντίστοιχο άτομο άνθρακα του ιμιδαζολικού δακτυλίου συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με τα ίδια κατάλοιπα (6). Επιπλέον και οι δυο συνδέτες συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με τα Leu136, Asp283 (Εικόνες 11.10, 12.5). Τα δυο μόρια πρόσδεονται με παρόμοιο τρόπο στο καταλυτικό κέντρο,

ωστόσο εντοπίζεται διαφορά στην τοποθέτηση του 2-φαινυλο υποκαταστάτη εντός της β-εσοχής. Και τα δυο σύμπλοκα προκαλούν την ίδια μετατόπιση του βρόχου 280s (rmsd 0,79, 0,8 Å για όλα τα άτομα των 282-288 στα σύμπλοκα των **KS389** και **BEva349** αντίστοιχα) ωστόσο ο τριαζολικός δακτύλιος κατευθύνει την πρόσδεση του υποκαταστάτη R του **KS389** προς τον βρόχο 339-342 με αποτέλεσμα να προκαλείται μια μετατόπιση των πλευρικών αλυσίδων των Asp339, His341 και Pro342 (r.m.s.d. 0,79 Å) ενώ στην περίπτωση του **BEva349** ο ιμιδαζολικός δακτύλιος τοποθετεί καλύτερα τον υποκαταστάτη R με αποτέλεσμα την μικρότερη μετατόπιση του βρόχου 339-342 (r.m.s.d. 0,2 Å) (Εικόνα 12.15). Είναι πιθανόν λοιπόν το ενεργειακό κόστος της μετατόπισης του βρόχου 339-342 που προκλήθηκε από την προσαρμογή της ομάδας 2-νάφθυλο του **KS389** να συμβάλλει στη μείωση της δραστηριότητας του αναστολέα όπως παρατηρήθηκε και στο σύμπλοκο του αναστολέα **2a** που αναφέρθηκε σε προηγούμενη μελέτη της παρούσας διατριβής (Παράγραφος 8.2.2), καθώς και τα δυο μόρια σχηματίζουν τις ίδιες αλληλεπιδράσεις εντός του καταλυτικού κέντρου.



Εικόνα 12.15: Υπέρθηση της δομής των συμπλόκων mGPb- **KS389** (ροζ), mGPb-**BEva349** (γαλάζιο) με την δομή της ελεύθερης mGPb (κίτρινο) όπου παρουσιάζεται η μετατόπιση του βρόχου 339-342.

Συμπερασματικά στις ενώσεις που μελετήθηκαν η αντικατάσταση του τριαζολικού δακτύλιου στην ομάδα του συνδέτη με ένα ιμιδαζολικό δακτύλιο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της βιοδραστικότητας των αναστολέων, ενώ οδήγησε στην ανακάλυψη του πλέον ισχυρού ($K_i=26$ nM) αναστολέα που έχει βρεθεί μέχρι σήμερα για το καταλυτικό κέντρο. Από τις δομικές μελέτες προέκυψε ότι η ανασταλτική τους ισχύ αποδίδεται στην άκαμπτη γεωμετρία του ιμιδαζολικού δακτυλίου που κατευθύνει την πρόσδεση του υποκαταστάτη R εντός της β-εσοχής ενώ παράλληλα σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με μόρια ύδατος αλλά και με την κύρια αλυσίδα της His377. Όλοι οι αναστολείς σχηματίζουν

αλληλεπιδράσεις με την περιοχή του βρόχου 280s σταθεροποιώντας την ανενεργή διαμόρφωση T του ενζύμου χωρίς ωστόσο να προκαλούν διατάραξη της δομής. Η διαφορά στην ανασταλτική ισχύ των αναστολέων μπορεί να αποδοθεί στο μέγεθος του υποκαταστάτη και τις αλληλεπιδράσεις van der Waals που σχηματίζει κυρίως εντός της περιοχής της β-εσοχής. Η ομάδα 2-νάφθυλο των **BEva349** και **SzA37** προσδένεται με τον κατάλληλο προσανατολισμό εντός της β-εσοχής σχηματίζοντας περισσότερες αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα της περιοχής από αυτές που παρατηρούνται κατά τη σύνδεση των **BEva250** και **BEva803** με το φαινύλιο, αναδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο των

αλληλεπιδράσεων στην περιοχή αυτή για την βιοδραστικότητα των αναστολέων.

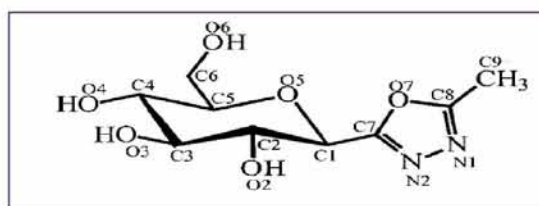
Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν αναδεικνύουν τον ιμιδαζολικό δακτύλιο ως τον καλύτερο συνδέτη που έχει χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση αναστολέων έναντι της GP και την ομάδα 2-νάφθυλο ως τον πλέον ισχυρό υποκαταστάτη επιβεβαιώνοντας μελέτες που είχαν προηγηθεί με αναστολείς που έφεραν τον ίδιο υποκαταστάτη και εμφάνισαν υψηλή βιοδραστικότητα (Gyorgydeak et al. 2004, Benlifa et al. 2006, Somsak et al. 2008, Kun et al. 2011, Bokor et al. 2013, Kun et al. 2014).

Επιπλέον οι κινητικές μελέτες των δυο τελευταίων ομάδων αναστολέων επαλήθευσαν την ισχυρή ανασταλτική δράση των αναστολέων και στα τρία ισοένζυμα hIGPa, gmGPa και gmGPb και απέδειξαν (για πρώτη φορά) πειραματικά την ασφαλή χρήση πειραματικών δεδομένων από την gmGPb για το σχεδιασμό αναστολέων για την hIGPa.

13. Ο ρόλος του συνδέτη

Οι δομές που παρουσιάστηκαν προηγουμένως είναι οι πρώτες για αναστολείς με συνδέτη 1,2,4 τριαζολικό ή ιμιδαζολικό δακτύλιο. Ο μόνος αναστολέας που έχει παρόμοιο συνδέτη και η δομή του συμπλόκου του με την gmGPb είναι κατατεθειμένη στην τράπεζα πρωτεϊνικών δομών PDB (Berman et al. 2000) είναι το συμπλόκο gmGPb- 2-

(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5-μέθυλο-1,3,4-οξαδιαζόλη (Chrysin et al. 2005). Ο αναστολέας αυτός (ένωση **2**, εικόνα 13.1) έχει σταθερά αναστολής (K_i) 145μM για την gmGPb (Chrysin et al. 2005). Με στόχο τη σύγκριση των δομών των δυο συνδετών και της επίδρασης τους στην ανασταλτική ισχύ έγινε υπέρθεση της δομής του συμπλόκου gmGPb-**KS389** στη δομή του gmGPb-**2**.



Εικόνα 13.1: Χημική δομή μέθυλο-οξαδιαζόλης (**2**)

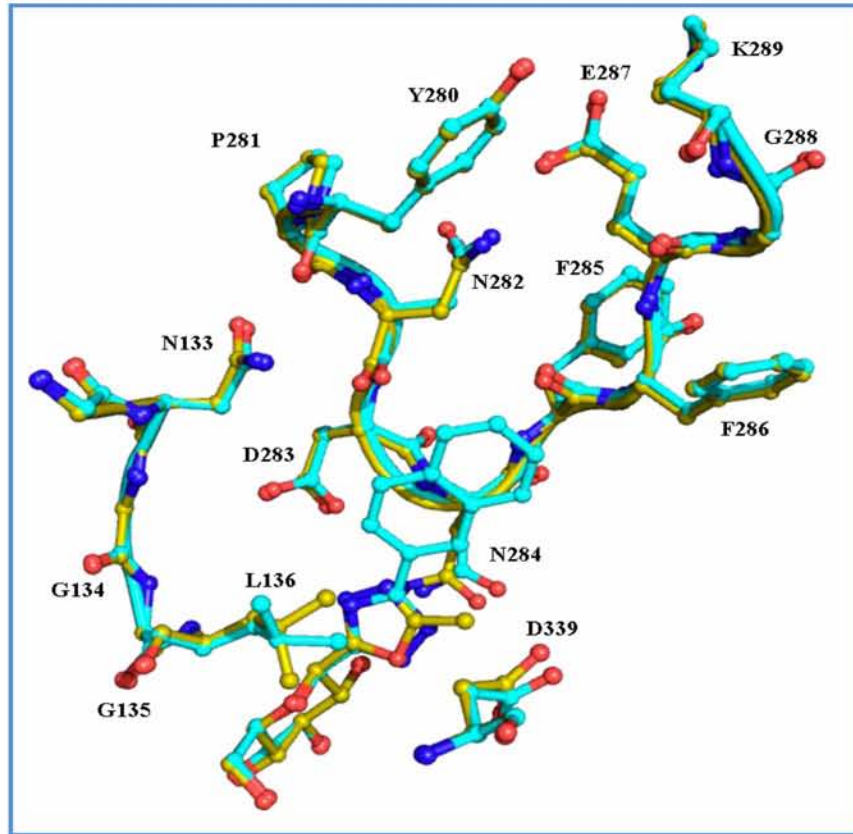
Ο **2** προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο με παρόμοιο τρόπο με τον **KS389** με τη διαφορά ότι ο τριαζολο δακτύλιος είναι στραμμένος κατά 5° ώστε να προσαρμοστεί ο υποκαταστάτης R (μεθύλιο) εντός του καταλυτικού κέντρου. Εντούτοις, οι δυο υποκαταστάτες R των δυο αναστολέων προβάλλουν προς διαφορετικές κατευθύνσεις, λόγω της γεωμετρίας και της δομής του συνδέτη (Εικόνα 13.2). Ο **2** σχηματίζει συνολικά 14 δεσμούς υδρογόνου και 80 αλληλεπιδράσεις van der Waals με αμινοξέα και μόρια ύδατος χωρίς να διαταράσσει τη δομή του καταλυτικού κέντρου (rmsd 0.15 Å για τα άτομα C^a των 18-249, 262-312, 326-829) (Chrysin et al. 2005). Ο οξαδιαζολικός δακτύλιος σχηματίζει συνολικά 20 αλληλεπιδράσεις van der Waals και δεν συμμετέχει σε κανέναν άμεσο

δεσμό υδρογόνου με τα αμινοξέα της περιοχής. Η αντικατάσταση του ατόμου του οξυγόνου της οξαδιαζόλης από άζωτο στον τριαζολικό δακτύλιο του **KS389** είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου με την κύρια αλυσίδα του His377. Τα άτομα N1 και N2 της οξαδιαζόλης συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με τις Asn284, Leu136 ενώ το άτομο O συμμετέχει μόνο σε 4 αλληλεπιδράσεις van der Waals. Τα άτομα του ιμιδαζολικού δακτυλίου του **KS389** συμμετέχουν σε 23 αλληλεπιδράσεις van der Waals αλλά και σε δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με τις Asp283 και Leu136 ενώ το άτομο N2 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο της κύριας αλυσίδας της His377.

Μετά την πρόσδεση του ο αναστολέας **2** εκτοπίζει δυο μόρια νερού από το καταλυτικό κέντρο και προκαλεί μια μετατόπιση των πλευρικών αλυσίδων των Leu136 και Asp339 ενώ δεν προκαλεί μετατόπιση του βρόχου 280s. Συγκεκριμένα η πλευρική αλυσίδα του Leu136 περιστρέφεται 90° ενώ η πλευρική αλυσίδα του Asp339 μετατοπίζεται κατά 0,4 Å ώστε να αυξηθούν οι αλληλεπιδράσεις με την οξαδιαζόλη. Το μεθύλιο δεν μπορεί να εισχωρήσει εντός της β-εσοχής, καθώς έχει μικρό μέγεθος, με αποτέλεσμα να σχηματίζει

συνολικά 6 αλληλεπιδράσεις van der Waals ενώ οι αλληλεπιδράσεις με το βρόχο 280s περιορίζονται μόνο σε αυτές με το κατάλοιπο Asn284. Αντίθετα το 2-ναφθύλιο του **KS389** συμμετέχει σε 43 αλληλεπιδράσεις van der Waals ενώ σταθεροποιεί την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s μέσω εκτεταμένων αλληλεπιδράσεων με τα Asn282, Asn284, Phe285, Phe286.

Η αυξημένη βιοδραστικότητα του **KS389** ωστόσο δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο στο μεγαλύτερο αριθμό αλληλεπιδράσεων van der Waals του υποκαταστάτη R καθώς ο αναστολέας που φέρει ως συνδέτη την 1,3,4- οξαδιαζόλη και ως υποκαταστάτη την ίδια ομάδα R με τον **KS389** (2-ναφθύλιο) προκάλεσε μόλις 10% αναστολή του ενζύμου σε συγκέντρωση 625μM (Toth et al. 2009). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει τη σημαντική επίδραση του δεσμού υδρογόνου του συνδέτη με την His377 στη βιοδραστικότητα των αναστολέων. Αν και δεν υπάρχει κρυσταλλική δομή του συμπλόκου με την 1,3,4- οξαδιαζόλη και το 2-ναφθύλιο, φαίνεται ότι εξαιτίας της γεωμετρίας του συνδέτη ο υποκαταστάτης R προβάλλει προς διαφορετική κατεύθυνση προκαλώντας σημαντικές δομικές μεταβολές στη διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου οι οποίες έχουν ενεργειακό κόστος.



Εικόνα 13.2: Υπέρθηση της δομής του συμπλόκου mGPb-**KS389** (γαλάζιο) με το σύμπλοκο mGPb-2-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5μέθυλο-1,3,4-οξαδιαζόλη (PDB code:1XL0)

14. Σύγκριση με τη δομή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

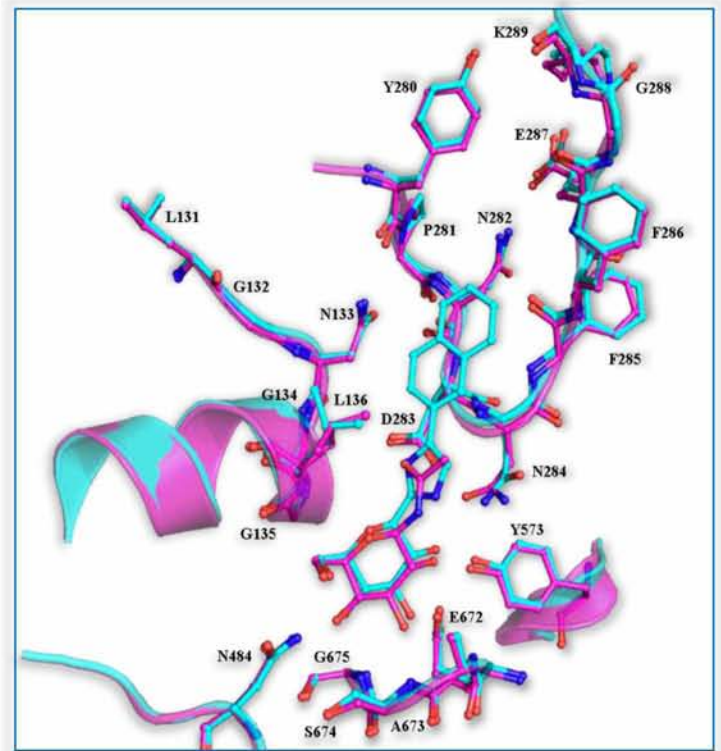
Η ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (hGPα) και η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από κόνι-κλους (mGPβ) παρουσιάζουν 100% ομολογία τόσο σε αμινοξική αλληλουχία όσο και στην αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου. Παρόλα αυτά ακολούθησε δομική σύγκριση του καταλυτικού κέντρου στα συμπλόκα mGPβ-**BEva349** και hGP-GlcNAc (Rath et al. 2000) έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν η πρόσδεση του **BEva349** προκαλεί αλλαγές οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την διαμόρφωση του

καταλυτικού κέντρου του ηπατικού ενζύμου.

Υπέρθηση της δομής των δυο συμπλόκων έδειξε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές στις δομές των ενζύμων και η τιμή της r.m.s.d. ήταν 1,07 Å για όλα τα άτομα όλων των αμινοξέων. Πιο ειδικά η σύγκριση του καταλυτικού κέντρου στα δυο συμπλόκα έδειξε ότι οι δυο αναστολείς προσδέονται με παρόμοιο τρόπο στο καταλυτικό κέντρο, ενώ η γλυκοκυρανόζη του **BEva349** μετατοπίζεται ελαφρώς ώστε να τοποθετηθεί ο υποκαταστάτης R εντός της β-εσοχής. Κατά την πρόσδεση του **BEva349** εκτοπίζονται τρία μόρια ύδατος τα οποία υπάρχουν στο σύμπλοκο της hGPα-

GlcNAc, άλλα τρία μόρια ύδατος μετατοπίζονται (0,48, 0,53, 0,63 Å) ενώ εμφανίζονται έξι μόρια ύδατος τα οποία συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με το 2-ναφθύλιο τα οποία δεν παρατηρούνται στο σύμπλοκο της hIGPa- **GlcNAc**. Η διαμόρφωση του καταλυτικού κέντρου συντηρείται και στα δυο σύμπλοκα χωρίς να προκαλούνται αλλαγές στη διαμόρφωση των αμινοξέων και κυρίως των καταλοίπων του βρόχου 280s (r.m.s.d. 0,7 Å για όλα τα άτομα των αμινοξέων 280-288) (Εικόνα 14.1). Καθώς δεν υπάρχουν σημαντικές δομικές διαφορές στις διαμορφώσεις των δυο συμπλόκων στο καταλυτικό κέντρο φαίνεται πως η πρόσδεση του αναστολέα στην hIGPa θα είναι ίδια με αυτή που παρατηρήθηκε στη rmGPb. Επιπροσθέτως, αποδεικνύεται η ασφαλή χρήση των πειραματικών δεδομένων που προκύπτουν

από δομικές μελέτες σύνδεσης της rmGPb στη hIGPa.



Εικόνα 14.1: Υπέρθθεση της δομής του συμπλόκου rmGPb-**BEva349** (γαλάζιο) με το σύμπλοκο hIGPa-GlcNAc (ροζ) (PDB ID code: 1FC0) στο καταλυτικό κέντρο

Summary

Type II diabetes, one of the most common metabolic disorders, is characterized by hyperglycaemia in the context of insulin resistance. Today it represents more than 90% of all diabetics. Liver glycogen phosphorylase is a key enzyme in glycogen metabolism catalyzing the degradation of glycogen to glucose-1-phosphate. Since glycogen in the liver serves as a source of glucose to maintain blood glucose homeostasis glycogen phosphorylase is a validated pharmaceutical target for the discovery of novel antihyperglycaemic agents (inhibitors of the enzymatic action) to combat type II diabetes. The discovery of new inhibitors is based on glucose, the natural inhibitor of the enzyme, which binds at the active site. The goal of the present thesis was to discover glucose derivatives which would have stronger potency than glucose for glycogen phosphorylase. For this the method of structure-based-inhibitor design was used. The method is based on the structural analysis of the molecular details that govern inhibitor recognition and specificity by the active site, followed by the assessment of each new inhibitor, in spiral pathway between structural analysis and biochemical assessment which concludes to an inhibitor with strong potency.

In the framework of the present Thesis six different groups of glucose derivatives analogues have been studied initially with rabbit muscle glycogen phosphorylase and finally with human liver glycogen phosphorylase. Kinetic experiments used to determine the efficacy of these compounds and their K_i values while X-ray crystallographic studies of the protein-inhibitor complexes revealed the structural basis of their inhibitory potency.

The first group studied was the *C5* halogen substituted glucopyranosyl nucleosides with halogens at the *C5* position of uracil with **C1cCIU** being the most potent ($K_i = 1.02 \mu\text{M}$). The next group comprised by *C5*-alkynyl and alkylfurano[2,3-*d*] pyrimidine glucopyranonucleosides where alkynyl groups of variable length were introduced in the *C5*-position replacing the halogen with the aim to exploit interactions with residues of the hydrophobic β -pocket within the active site. The results from this group emphasized the importance of the linker group connecting the glucopyranose moiety with an R group. Therefore, in the next group of ligands linkers of different length were used with the aim to enable the R groups to form favourable interactions with residues in the β -pocket. *N*-acyl- β -D-glucopyranosylamines had the linker $-\text{NHCO}-$. A variety of R groups were used based on the virtual

screening of 1888 compounds of the ZINC, a free database of commercially-available compounds. The most potent compounds of this group were used as a scaffold for the design and study of a new group, the *N*-acyl- β -D-glucopyranosyl ureas where the –NHCO– linker was replaced by the –NHCONHCO– group. This proved to have the optimum length for inhibitory potency.

The last of inhibitor groups studied had heterocyclic groups as linkers and R substituents of variable size and length. The study of *C*-glucopyranosyl- 1,2,4 triazoles and 4(5)-Aryl-2-*C*-glucopyranosyl-imidazoles led to the discovery of very strong inhibitors with K_i values at the nanomolar range. The most potent (**BEva349**) bearing an imidazole ring linker with a K_i value of 26 nM is the most potent inhibitor of the catalytic site discovered thus far. The efficacy of these inhibitors was also tested in human liver glycogen phosphorylase. The results verified their strong inhibitory potencies against the pharmaceutical target while at the same time provided experimental evidence for the safe use of data with rabbit muscle glycogen phosphorylase for the design of potent inhibitors of human liver glycogen phosphorylase.

Βιβλιογραφία

1. Acharya, K. R., D. I. Stuart, K. M. Varvill and L. N. Johnson (1991). Glycogen Phosphorylase b: Description of the Protein Structure. Singapore/London, World Scientific.
2. Agilent Technologies UK Ltd (2011). CrysAlisPro Software system. Oxford, U.K.
3. Agius, L. (1998). "The physiological role of glucokinase binding and translocation in hepatocytes." Adv Enzyme Regul **38**: 303-331.
4. Agius, L. (2007). "New hepatic targets for glycaemic control in diabetes." Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. **21**(4): 587-605.
5. Agius, L. (2010). "Physiological control of liver glycogen metabolism: lessons from novel glycogen phosphorylase inhibitors." Mini Rev Med Chem **10**(12): 1175-1187.
6. Agius, L., M. Peak, C. B. Newgard, A. M. Gomez-Foix and J. J. Guinovart (1996). "Evidence for a role of glucose-induced translocation of glucokinase in the control of hepatic glycogen synthesis." J Biol Chem **271**(48): 30479-30486.
7. Aiston, S., B. Andersen and L. Agius (2003). "Glucose 6-phosphate regulates hepatic glycogenolysis through inactivation of phosphorylase." Diabetes **52**(6): 1333-1339.
8. Aiston, S., M. P. Coghlan and L. Agius (2003). "Inactivation of phosphorylase is a major component of the mechanism by which insulin stimulates hepatic glycogen synthesis." European Journal of Biochemistry **270**(13): 2773-2781.
9. Aiston, S., K. Y. Trinh, A. J. Lange, C. B. Newgard and L. Agius (1999). "Glucose-6-phosphatase overexpression lowers glucose 6-phosphate and inhibits glycogen synthesis and glycolysis in hepatocytes without affecting glucokinase translocation. Evidence against feedback inhibition of glucokinase." J Biol Chem **274**(35): 24559-24566.
10. Alberti, G., P. Zimmet, J. Shaw, Z. Bloomgarden, F. Kaufman and M. Silink (2004). "Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic: the international diabetes federation consensus workshop." Diabetes Care **27**(7): 1798-1811.
11. Alexacou, K. M., Y. Z. Zhang, J. P. Praly, S. E. Zographos, E. D. Chrysina, N. G. Oikonomakos and D. D. Leonidas (2011). "Halogen-substituted (C-beta-D-glucopyranosyl)-hydroquinone regioisomers: synthesis, enzymatic evaluation and their binding to glycogen phosphorylase." Bioorg Med Chem **19**(17): 5125-5136.
12. Anderson, A. C. (2003). "The process of structure-based drug design." Chem Biol **10**(9): 787-797.
13. Antel, J. (1999). "Integration of combinatorial chemistry and structure-based drug design." Curr Opin Drug Discov Devel **2**(3): 224-233.
14. Ariki, M. and T. Fukui (1975). "Inhibition of alpha-glucan phosphorylase by alpha-D-glucopyranosyl fluoride." J Biochem **78**(6): 1191-1199.
15. Auffinger, P., F. A. Hays, E. Westhof and P. S. Ho (2004). "Halogen bonds in biological molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(48): 16789-16794.
16. Bailey-Kellogg, C., A. Widge, J. J. Kelley, M. J. Berardi, J. H. Bushweller and B. R. Donald (2000). "The NOESY jigsaw: automated protein secondary structure and main-chain assignment from sparse, unassigned NMR data." J Comput Biol **7**(3-4): 537-558.

17. Bailey, C. J. (2000). "Potential new treatments for type 2 diabetes." Trends Pharmacol Sci **21**(7): 259-265.
18. Bandsma, R. H., C. H. Wiegman, A. W. Herling, H. J. Burger, A. ter Harmsel, A. J. Meijer, J. A. Romijn, D. J. Reijngoud and F. Kuipers (2001). "Acute inhibition of glucose-6-phosphate translocator activity leads to increased de novo lipogenesis and development of hepatic steatosis without affecting VLDL production in rats." Diabetes **50**(11): 2591-2597.
19. Baranowski, T., B. Illingworth, D. H. Brown and C. F. Cori (1957). "The isolation of pyridoxal-5-phosphate from crystalline muscle phosphorylase." Biochim Biophys Acta **25**(1): 16-21.
20. Barford, D., S. H. Hu and L. N. Johnson (1991). "Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP." J. Mol. Biol. **218**: 233-260.
21. Barford, D. and L. N. Johnson (1989). "The allosteric transition of glycogen phosphorylase." Nature **340**: 609-616.
22. Barford, D., J. W. Schwabe, N. G. Oikonomakos, K. R. Acharya, J. Hajdu, A. C. Papageorgiou, J. L. Martin, J. C. Knott, A. Vasella and L. N. Johnson (1988). "Channels at the catalytic site of glycogen phosphorylase b: binding and kinetic studies with the beta-glycosidase inhibitor D-gluconohydroximo- 1,5-lactone N-phenylurethane." Biochemistry **27**(18): 6733-6741.
23. Basu, R., A. Basu, C. M. Johnson, W. F. Schwenk and R. A. Rizza (2004). "Insulin dose-response curves for stimulation of splanchnic glucose uptake and suppression of endogenous glucose production differ in nondiabetic humans and are abnormal in people with type 2 diabetes." Diabetes **53**(8): 2042-2050.
24. Baumli, S., J. A. Endicott and L. N. Johnson (2010). "Halogen bonds form the basis for selective P-TEFb inhibition by DRB." Chem Biol **17**(9): 931-936.
25. Bayer, M. E. (1968). "Adsorption of bacteriophages to adhesions between wall and membrane of Escherichia coli." J Virol **2**(4): 346-356.
26. Benlifa, M., J. M. Hayes, S. Vidal, D. Gueyraud, P. G. Goekjian, J.-P. Praly, G. Kizilis, C. Tiraidis, K. M. Alexacou, E. D. Chrysinas, S. E. Zographos, D. D. Leonidas, G. Archontis and N. G. Oikonomakos (2009). "Glucose-based spiro-isoxazolines: a new family of potent glycogen phosphorylase inhibitors." Bioorg. Med. Chem. **17**(20): 7368-7380.
27. Benlifa, M., S. Vidal, B. Fenet, M. Msaddek, P. G. Goekjian, J.-P. Praly, A. Brunyanski, T. Docsa and P. Gergely (2006). "In search of glycogen phosphorylase inhibitors: 5-substituted 3-C-glucopyranosyl-1,2,4-oxadiazoles from beta-D-glucopyranosyl cyanides upon cyclization of O-acylamidoxime intermediates." European Journal of Organic Chemistry(18): 4242-4256.
28. Benlifa, M., S. Vidal, D. Gueyraud, P. G. Goekjian, M. Msaddek and J.-P. Praly (2006). "1,3-Dipolar cycloaddition reactions on carbohydrate-based templates: synthesis of spiro-isoxazolines and 1,2,4-oxadiazoles as glycogen phosphorylase inhibitors." Tetrahedron Letters **47**(34): 6143-6147.
29. Berman, H. M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P. E. Bourne (2000). "The Protein Data Bank." Nucleic Acids Res **28**(1): 235-242.

30. Bichard, C. J. F., E. P. Mitchell, M. R. Wormald, K. A. Watson, L. N. Johnson, S. E. Zographos, D. D. Koutra, N. G. Oikonomakos and G. W. J. Fleet (1995). "Potent inhibition of glycogen phosphorylase by a spirohydantoin of glucopyranose: first pyranose analogues of hydantocidin." Tetrahedron Letts. **36**: 2145-2158.
31. Blundell, T. L., H. Jhoti and C. Abell (2002). "High-throughput crystallography for lead discovery in drug design." Nat Rev Drug Discov **1**(1): 45-54.
32. Blundell, T. L. and L. N. Johnson (1976). Protein Crystallography. London, Academic Press.
33. Bokor, E., T. Docsa, P. Gergely and L. Somsak (2010). "Synthesis of 1-(D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazoles and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors." Bioorganic & Medicinal Chemistry **18**(3): 1171-1180.
34. Bokor, E., T. Docsa, P. Gergely and L. Somsak (2013). "C-Glucopyranosyl-1,2,4-triazoles As New Potent Inhibitors of Glycogen Phosphorylase." ACS Med Chem Lett **4**(7): 47-50.
35. Bokor, E., S. Kun, T. Docsa, P. Gergely and L. Somsák (2015). "4(5)-Aryl-2-C-glucopyranosyl-imidazoles as New Nanomolar Glucose Analogue Inhibitors of Glycogen Phosphorylase." Med. Chem. Lett.: in press.
36. Bokor, E., E. Szilagyi, T. Docsa, P. Gergely and L. Somsak (2013). "Synthesis of substituted 2-(beta-D-glucopyranosyl)-benzimidazoles and their evaluation as inhibitors of glycogen phosphorylase." Carbohydr Res **381**: 179-186.
37. Bollen, M., S. Keppens and W. Stalmans (1998). "Specific features of glycogen metabolism in the liver." Biochem J **336 (Pt 1)**: 19-31.
38. Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
39. Brichard, S. M., J. C. Henquin and J. Girard (1993). "Phlorizin treatment of diabetic rats partially reverses the abnormal expression of genes involved in hepatic glucose metabolism." Diabetologia **36**(4): 292-298.
40. Brocklehurst, K. J., V. A. Payne, R. A. Davies, D. Carroll, H. L. Vertigan, H. J. Wightman, S. Aiston, I. D. Waddell, B. Leighton, M. P. Coghlan and L. Agius (2004). "Stimulation of hepatocyte glucose metabolism by novel small molecule glucokinase activators." Diabetes **53**(3): 535-541.
41. Brunger, A. T. (1992). "Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures." Nature **355**(6359): 472-475.
42. Brunger, A. T. (1992). X-PLOR Version 3.1 Manual: A system for X-ray Crystallography & NMR. New Haven, Yale University Press.
43. Brunger, A. T., P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. GrosseKunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson and G. L. Warren (1998). "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." Acta Crystallogr. **D54**: 905-921.
44. Buc, M. H., A. Ullmann, M. Goldberg and H. Buc (1971). "[Molecular mass and extinction coefficient of the glycogen phosphorylase b of rabbit muscle]." Biochimie **53**(3): 283-289.

45. Carpino, P. A. and B. Goodwin (2010). "Diabetes area participation analysis: a review of companies and targets described in the 2008 - 2010 patent literature." Expert Opin. Ther. Pat. **20**(12): 1627-1651.
46. CCP4 (1994). "The CCP4 suite : programs for protein crystallography." Acta Crystallogr. D **50**: 760-763.
47. Chayen, N. E. (2004). "Turning protein crystallisation from an art into a science." Curr Opin Struct Biol **14**(5): 577-583.
48. Chayen, N. E. and E. Saridakis (2008). "Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal." Nat Methods **5**(2): 147-153.
49. Chen, V. B., W. B. Arendall, 3rd, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson and D. C. Richardson (2010). "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **66**(Pt 1): 12-21.
50. Cheng, Y. and W. H. Prusoff (1973). "Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction." Biochem Pharmacol **22**(23): 3099-3108.
51. Choe, J. Y., S. W. Nelson, K. L. Arienti, F. U. Axe, T. L. Collins, T. K. Jones, R. D. Kimmich, M. J. Newman, K. Norvell, W. C. Ripka, S. J. Romano, K. M. Short, D. H. Slee, H. J. Fromm and R. B. Honzatko (2003). "Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by a new class of allosteric effectors." J Biol Chem **278**(51): 51176-51183.
52. Chrysina, E. D., E. Bokor, K. M. Alexacou, M. D. Charavgi, G. N. Oikonomakos, S. E. Zographos, D. D. Leonidas, N. G. Oikonomakos and S. Laszlo (2009). "Amide-1,2,3-triazole bioisosterism: the glycogen phosphorylase case." Tetrahedron-Asymmetry **20**(6-8): 733-740.
53. Chrysina, E. D., M. N. Kosmopoulou, C. Tiraidis, R. Kardakaris, N. Bischler, D. D. Leonidas, Z. Hadady, L. Somsak, T. Docsa, P. Gergely and N. G. Oikonomakos (2005). "Kinetic and crystallographic studies on 2-(beta-D-glucopyranosyl)-5-methyl-1, 3, 4-oxadiazole, -benzothiazole, and -benzimidazole, inhibitors of muscle glycogen phosphorylase b. Evidence for a new binding site." Protein Sci **14**(4): 873-888.
54. Chrysina, E. D., N. G. Oikonomakos, S. E. Zographos, M. N. Kosmopoulou, N. Bischler, D. D. Leonidas, L. Kovacs, T. Docsa, P. Gergely and L. Somsak (2003). "Crystallographic studies on alpha- and beta-D-glucopyranosyl formamide analogues, inhibitors of glycogen phosphorylase." Biocatalysis and Biotransformation **21**(4-5): 233-242.
55. Clark, T., M. Hennemann, J. S. Murray and P. Politzer (2007). "Halogen bonding: the sigma-hole." J. Molec. Model. **13**(2): 291-296.
56. Cohen, P. (1973). "The subunit structure of rabbit-skeletal-muscle phosphorylase kinase, and the molecular basis of its activation reactions." Eur J Biochem **34**(1): 1-14.
57. Cohen, P. (1983). "Phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle." Methods Enzymol **99**: 243-250.
58. Cohen, P. (1983). "Protein phosphorylation and the control of glycogen metabolism in skeletal muscle." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **302**(1108): 13-25.

59. Cori, C. F. and G. T. Cori (1936). "Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new phosphate monoester." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **34**: 702-705.
60. Cori, C. F. and N. B. Madsen (1956). "The interaction of muscle phosphorylase with p-chloromercuribenzoate. I. Inhibition of activity and effect on the molecular weight." J Biol Chem **223**(2): 1055-1065.
61. Czako, Z., L. Juhasz, A. Kenez, K. Czifrak, L. Somsak, T. Docsa, P. Gergely and S. Antus (2009). "Synthesis and glycogen phosphorylase inhibitory activity of N-(beta-D-glucopyranosyl)amides possessing 1,4-benzodioxane moiety." Bioorganic & Medicinal Chemistry **17**(18): 6738-6741.
62. DeLano, W. L. (2002). The PyMol Molecular Visualization System. Sa Carlos, CA, USA.
63. Docsa, T., K. Czifrak, C. Huse, L. Somsak and P. Gergely (2011). "Effect of glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin on glycogen metabolism in liver tissues of streptozotocin-induced and obese diabetic rats." Mol Med Report **4**(3): 477-481.
64. Dombradi, V. (1981). "Structural aspects of the catalytic and regulatory function of glycogen phosphorylase." Int J Biochem **13**(2): 125-139.
65. Durbin, S. D. and G. Feher (1996). "Protein crystallization." Annu Rev Phys Chem **47**: 171-204.
66. Elek, R., L. Kiss, J. P. Praly and L. Somsak (2005). "beta-D-Galactopyranosylthiohydroximates and D-galactopyranosylidene-spiro-oxathiazoles: synthesis and enzymatic evaluation against E. colid-galactosidase." Carbohydr Res **340**(7): 1397-1402.
67. Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-2132.
68. Engers, H. D. and N. B. Madsen (1968). "The effect of anions on the activity of phosphorylase b." Biochem Biophys Res Commun **33**(1): 49-54.
69. Erickson, J., D. J. Neidhart, J. VanDrie, D. J. Kempf, X. C. Wang, D. W. Norbeck, J. J. Plattner, J. W. Rittenhouse, M. Turon, N. Wideburg and et al. (1990). "Design, activity, and 2.8 Å crystal structure of a C2 symmetric inhibitor complexed to HIV-1 protease." Science **249**(4968): 527-533.
70. Erion, M. D., P. D. van Poelje, Q. Dang, S. R. Kasibhatla, S. C. Potter, M. R. Reddy, K. R. Reddy, T. Jiang and W. N. Lipscomb (2005). "MB06322 (CS-917): A potent and selective inhibitor of fructose 1,6-bisphosphatase for controlling gluconeogenesis in type 2 diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7970-7975.
71. Fasold, H., F. Ortanderl, R. Huber, K. Bartels and P. Schwager (1972). "Crystallization and crystallographic data of rabbit muscle phosphorylase a and b." FEBS Lett **21**(2): 229-232.
72. Fischer, E. H. and E. G. Krebs (1962). "Muscle Phosphorylase-B." Methods in Enzymology **5**: 369-373.
73. Fiske, C. H. and Y. Subbarow (1925). "The colorimetric determination of phosphorus." Journal of Biological Chemistry **66**(2): 375-400.
74. Fletterick, R. J. and N. B. Madsen (1980). "The structures and related functions of phosphorylase a." Annu Rev Biochem **49**: 31-61.

75. Fletterick, R. J., J. Sygusch, H. Semple and N. B. Madsen (1976). "Structure of glycogen phosphorylase a at 3.0 Å resolution and its ligand binding sites at 6 Å." *J Biol Chem* **251**(19): 6142-6146.
76. Gibbons, B. J., P. J. Roach and T. D. Hurley (2002). "Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin." *J Mol Biol* **319**(2): 463-477.
77. Gimisis, T. (2010). "Synthesis of N-gluco-pyranosidic derivatives as potential inhibitors that bind at the catalytic site of glycogen phosphorylase." *Mini Rev Med Chem* **10**(12): 1127-1138.
78. Girish, V. and A. Vijayalakshmi (2004). "Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ." *Indian J Cancer* **41**(1): 47.
79. Goyard, D., A. S. Chajistamatiou, A. I. Sotiropoulou, E. D. Chrysina, J. P. Praly and S. Vidal (2014). "Efficient atropodiastereoselective access to 5,5'-bis-1,2,3-triazoles: studies on 1-glucosylated 5-halogeno 1,2,3-triazoles and their 5-substituted derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors." *Chemistry* **20**(18): 5423-5432.
80. Goyard, D., T. Docsa, P. Gergely, J. P. Praly and S. Vidal (2015). "Synthesis of 4-amidomethyl-1-glucosyl-1,2,3-triazoles and evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors." *Carbohydr Res* **402**: 245-251.
81. Gregoriou, M., M. E. Noble, K. A. Watson, E. F. Garman, T. M. Krulle, C. de la Fuente, G. W. Fleet, N. G. Oikonomakos and L. N. Johnson (1998). "The structure of a glycogen phosphorylase glucopyranose spirohydantoin complex at 1.8 Å resolution and 100 K: the role of the Μόριο ύδατος structure and its contribution to binding." *Protein Sci* **7**(4): 915-927.
82. Grimsby, J., R. Sarabu, W. L. Corbett, N. E. Haynes, F. T. Bizzarro, J. W. Coffey, K. R. Guertin, D. W. Hilliard, R. F. Kester, P. E. Mahaney, L. Marcus, L. Qi, C. L. Spence, J. Teng, M. A. Magnuson, C. A. Chu, M. T. Dvorozniak, F. M. Matschinsky and J. F. Grippo (2003). "Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy." *Science* **301**(5631): 370-373.
83. Gyorgydeak, Z., Z. Hadady, N. Felfoldi, A. Krakomperger, V. Nagy, M. Toth, A. Brunyanszki, T. Docsa, P. Gergely and L. Somsak (2004). "Synthesis of N-(beta-D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase." *Bioorg Med Chem* **12**(18): 4861-4870.
84. Habash, M. and M. O. Taha (2011). "Ligand-based modelling followed by synthetic exploration unveil novel glycogen phosphorylase inhibitory leads." *Bioorg Med Chem* **19**(16): 4746-4771.
85. Hayes, J. M., A. L. Kantsadi and D. D. Leonidas (2014). "Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes." *Phytochemistry Reviews* **13**(2): 471-498.
86. Hayes, J. M. and D. D. Leonidas (2010). "Computation as a tool for glycogen phosphorylase inhibitor design." *Mini Rev. Med. Chem.* **10**(12): 1156-1174.
87. Helmreich, E. and C. F. Cori (1964). "The Role of Adenylic Acid in the Activation of Phosphorylase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 131-138.

88. Helmreich, E., M. C. Michaelides and C. F. Cori (1967). "Effects of substrates and a substrate analog on the binding of 5'-adenylic acid to muscle phosphorylase a." Biochemistry **6**(12): 3695-3710.
89. Helmreich, E. J. and H. W. Klein (1980). "The role of pyridoxal phosphate in the catalysis of glycogen phosphorylases." Angew Chem Int Ed Engl **19**(6): 441-445.
90. Hernandez, M. Z., S. M. Cavalcanti, D. R. Moreira, W. F. de Azevedo Junior and A. C. Leite (2010). "Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design." Curr. Drug Targets **11**(3): 303-314.
91. Hoover, D. J., S. Lefkowitz-Snow, J. L. Burgess-Henry, W. H. Martin, S. J. Armento, I. A. Stock, R. K. McPherson, P. E. Genereux, E. M. Gibbs and J. L. Treadway (1998). "Indole-2-carboxamide inhibitors of human liver glycogen phosphorylase." J. Med. Chem. **41**: 2934-2938.
92. Hopkins, A. L. and C. R. Groom (2002). "The druggable genome." Nat Rev Drug Discov **1**(9): 727-730.
93. Hudson, J. W., G. B. Golding and M. M. Crerar (1993). "Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase." J Mol Biol **234**(3): 700-721.
94. Irwin, J. J. and B. K. Shoichet (2005). "ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening." J Chem Inf Model **45**(1): 177-182.
95. Jakobs, S., D. Fridrich, S. Hofem, G. Pahlke and G. Eisenbrand (2006). "Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase." Mol Nutr Food Res **50**(1): 52-57.
96. Johnson, L. N. (1992). "Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors." Faseb J **6**(6): 2274-2282.
97. Johnson, L. N., K. R. Acharya, M. D. Jordan and P. J. McLaughlin (1990). "Refined crystal structure of the phosphorylase-heptulose 2-phosphate-oligosaccharide-AMP complex." J. Mol. Biol. **211**: 645-661.
98. Johnson, L. N., J. Cheetham, P. J. McLaughlin, K. R. Acharya, D. Barford and D. C. Phillips (1988). "Protein-oligosaccharide interactions: lysozyme, phosphorylase, amylases." Curr. Top. Microbiol. Immunol. **139**: 81-134.
99. Johnson, L. N., J. Hajdu, K. R. Acharya, D. I. Stuart, P. J. McLaughlin, N. G. Oikonomakos and D. Barford (1989). Glycogen phosphorylase b. Allosteric Enzymes. G. Herve. Boca Raton, FL., CRC Press: 81-127.
100. Johnson, L. N., N. B. Madsen, J. Mosley and K. S. Wilson (1974). "The crystal structure of phosphorylase beta at 6 Å resolution." J Mol Biol **90**(4): 703-717.
101. Johnson, L. N., K. S. Wilson, I. T. Weber, D. L. Wild, J. A. Jenkins and E. A. Stura (1978). "Crystallographic studies on the structure and function of glycogen phosphorylase b." Biochem Soc Trans **6**(6): 1108-1111.
102. Jones, R. M. (2012). New Therapeutic Strategies for Type 2 Diabetes: Small Molecule Approaches. London, RSC Publishing.
103. Kam, Z., H. B. Shore and G. Feher (1978). "Crystallization of Proteins." Journal of Molecular Biology **123**(4): 539-555.

104. Kantsadi, A. L., A. Apostolou, S. Theofanous, G. A. Stravodimos, E. Kyriakis, V. A. Gorgogietas, D. S. Chatzileontiadou, K. Pegiou, V. T. Skamnaki, D. Stagos, D. Kouretas, A. M. Psarra, S. A. Haroutounian and D. D. Leonidas (2014). "Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase." Food Chem Toxicol **67**: 35-43.
105. Kantsadi, A. L., J. M. Hayes, S. Manta, V. T. Skamnaki, C. Kiritsis, A. M. Psarra, Z. Koutsogiannis, A. Dimopoulou, S. Theofanous, N. Nikoleousakos, P. Zoumpoulakis, M. Kontou, G. Papadopoulos, S. E. Zographos, D. Komiotis and D. D. Leonidas (2012). "The sigma-hole phenomenon of halogen atoms forms the structural basis of the strong inhibitory potency of C5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b." ChemMedChem **7**(4): 722-732.
106. Kantsadi, A. L., J. M. Hayes, S. Manta, V. T. Skamnaki, C. Kiritsis, A. M. G. Psarra, Z. Koutsogiannis, A. Dimopoulou, S. Theofanous, N. Nikoleousakos, P. Zoumpoulakis, M. Kontou, G. Papadopoulos, S. E. Zographos, D. Komiotis and D. D. Leonidas (2012). "The s-Hole Phenomenon of Halogen Atoms Forms the Structural Basis of the Strong Inhibitory Potency of C5 Halogen Substituted Glucopyranosyl Nucleosides towards Glycogen Phosphorylase b." Chemmedchem **7**(4): 722-732.
107. Kantsadi, A. L., S. Manta, A. M. Psarra, A. Dimopoulou, C. Kiritsis, V. Parmenopoulou, V. T. Skamnaki, P. Zoumpoulakis, S. E. Zographos, D. D. Leonidas and D. Komiotis (2012). "The binding of C5-alkynyl and alkylfuranol[2,3-d]pyrimidine glucopyranonucleosides to glycogen phosphorylase b: synthesis, biochemical and biological assessment." Eur J Med Chem **54**: 740-749.
108. Kapust, R. B., J. Tozser, J. D. Fox, D. E. Anderson, S. Cherry, T. D. Copeland and D. S. Waugh (2001). "Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency." Protein Eng **14**(12): 993-1000.
109. Kastenschmidt, L. L., J. Kastenschmidt and E. Helmreich (1968). "Subunit interactions and their relationship to the allosteric properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase b." Biochemistry **7**(10): 3590-3608.
110. Kastenschmidt, L. L., J. Kastenschmidt and E. J. M. Helmreich (1968). "Subunit interactions and their relationship to the allosteric properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase b." Biochemistry **7**: 3590-3608.
111. Kasvinsky, P. J., N. B. Madsen and R. J. Fletterick (1978). "Glycogen Phosphorylase-a Regulation by Nucleotide Derivatives." Federation Proceedings **37**(6): 1429-1429.
112. Kasvinsky, P. J., N. B. Madsen, J. Sygusch and R. J. Fletterick (1978). "Regulation of Glycogen Phosphorylase-a by Nucleotide Derivatives - Kinetic and X-Ray Crystallographic Studies." Journal of Biological Chemistry **253**(9): 3343-3351.
113. Kasvinsky, P. J., N. B. Madsen, J. Sygusch and R. J. Fletterick (1978). "The regulation of glycogen phosphorylase alpha by nucleotide derivatives. Kinetic and x-ray crystallographic studies." J Biol Chem **253**(9): 3343-3351.

114. Kasvinsky, P. J., S. Shechosky and R. J. Fletterick (1978). "Synergistic regulation of phosphorylase a by glucose and caffeine." *J Biol Chem* **253**(24): 9102-9106.
115. Klabunde, T., K. U. Wendt, D. Kadereit, V. Brachvogel, H. J. Burger, A. W. Herling, N. G. Oikonomakos, M. N. Kosmopoulou, D. Schmoll, E. Sarubbi, E. von Roedern, K. Schonafinger and E. Defossa (2005). "Acyl ureas as human liver glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes." *J Med Chem* **48**(20): 6178-6193.
116. Kleywegt, G. J. (2007). "Separating model optimization and model validation in statistical cross-validation as applied to crystallography." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**(Pt 9): 939-940.
117. Konya, B., T. Docsa, P. Gergely and L. Somsak (2012). "Synthesis of heterocyclic N-(beta-D-glucopyranosyl)carboxamides for inhibition of glycogen phosphorylase." *Carbohydr Res* **351**: 56-63.
118. Krimm, I., J. M. Lancelin and J. P. Praly (2012). "Binding evaluation of fragment-based scaffolds for probing allosteric enzymes." *J Med Chem* **55**(3): 1287-1295.
119. Kumar, A., A. Voet and K. Y. Zhang (2012). "Fragment based drug design: from experimental to computational approaches." *Curr Med Chem* **19**(30): 5128-5147.
120. Kun, S., E. Bokor, G. Varga, B. Szocs, A. Pahi, K. Czifrak, M. Toth, L. Juhasz, T. Docsa, P. Gergely and L. Somsak (2014). "New synthesis of 3-(beta-D-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazoles, nanomolar inhibitors of glycogen phosphorylase." *Eur J Med Chem* **76**: 567-579.
121. Kun, S., G. Z. Nagy, M. Toth, L. Czece, A. N. Van Nhien, T. Docsa, P. Gergely, M. D. Charavgi, P. V. Skourti, E. D. Chrysinia, T. Patonay and L. Somsak (2011). "Synthesis of variously coupled conjugates of D-glucose, 1,3,4-oxadiazole, and 1,2,3-triazole for inhibition of glycogen phosphorylase." *Carbohydr Res* **346**(12): 1427-1438.
122. Kurukulasuriya, R., J. T. Link, D. J. Madar, Z. Pei, S. J. Richards, J. J. Rohde, A. J. Souers and B. G. Szczepankiewicz (2003). "Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of hepatic glucose production." *Curr Med Chem* **10**(2): 123-153.
123. Kurukulasuriya, R., J. T. Link, D. J. Madar, Z. Pei, J. J. Rohde, S. J. Richards, A. J. Souers and B. G. Szczepankiewicz (2003). "Prospects for pharmacologic inhibition of hepatic glucose production." *Curr Med Chem* **10**(2): 99-121.
124. Kyriakis, E., G. A. Stravodimos, A. L. Kantsadi, D. S. Chatzileontiadou, V. T. Skamnaki and D. D. Leonidas (2015). "Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b." *FEBS Lett* **589**(15): 1787-1794.
125. Lattman, E. E. and P. J. Loll (2008). *Protein Crystallography*. Baltimore, The John Hopkins University Press.
126. Leatherbarrow, R. J. (1992). "GraFit version 3.0." *Erithacus Software Ltd Staines, U.K.*
127. Leatherbarrow, R. J. (2007). *GraFit Version 6.0*. Erithacus Software, Staines, UK.
128. Leonidas, D. D., N. G. Oikonomakos and A. C. Papageorgiou (1991). "Sulphate activates phosphorylase b by binding to the Ser (P) site." *Biochim Biophys Acta* **1076**(2): 305-307.

129. Leonidas, D. D., N. G. Oikonomakos, A. C. Papageorgiou and T. G. Sotiroidis (1992). "Kinetic properties of tetrameric glycogen phosphorylase b in solution and in the crystalline state." Protein Sci **1**(9): 1123-1132.
130. Leonidas, D. D., N. G. Oikonomakos, A. C. Papageorgiou, A. Xenakis, C. T. Cazianis and F. Bem (1990). "The ammonium sulfate activation of phosphorylase b." FEBS Lett **261**(1): 23-27.
131. Lerin, C., E. Montell, T. Nolasco, M. Garcia-Rocha, J. J. Guinovart and A. M. Gomez-Foix (2004). "Regulation of glycogen metabolism in cultured human muscles by the glycogen phosphorylase inhibitor CP-91149." Biochem J **378**(Pt 3): 1073-1077.
132. Leslie, A. G. W. and H. R. Powell (2007). Processing Diffraction Data with Mosflm. Evolving Methods for Macromolecular Crystallography. R. J. Read and J. I. Sussman, Springer. **245**: 41-51.
133. Levitt, M. and C. Chothia (1976). "Structural patterns in globular proteins." Nature **261**(5561): 552-558.
134. Lipinski, C. A., F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney (1997). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Advanced Drug Delivery Reviews **23**(1-3): 3-25.
135. Lorenzo, C., L. E. Wagenknecht, R. B. D'Agostino, Jr., M. J. Rewers, A. J. Karter and S. M. Haffner (2010). "Insulin resistance, beta-cell dysfunction, and conversion to type 2 diabetes in a multiethnic population: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study." Diabetes Care **33**(1): 67-72.
136. Lu, Z., J. Bohn, R. Bergeron, Q. Deng, K. P. Ellsworth, W. M. Geissler, G. Harris, P. E. McCann, B. McKeever, R. W. Myers, R. Saperstein, C. A. Willoughby, J. Yao and K. Chapman (2003). "A new class of glycogen phosphorylase inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **13**(22): 4125-4128.
137. Madsen, N. B., K. O. Honikel and M. N. G. James (1972). Studies on glycogen phosphorylase in solution and in the crystalline state. Metabolic Interconversion of Enzymes. O. Wieland, E. Helmreich and H. Holzer. Berlin, Springer: 55-71.
138. Mandel, M. and A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." J Mol Biol **53**(1): 159-162.
139. Manta, S., A. Xipnitou, C. Kiritsis, A. L. Kantsadi, J. M. Hayes, V. T. Skamnaki, C. Lamprakis, M. Kontou, P. Zoumpoulakis, S. E. Zographos, D. D. Leonidas and D. Komiotis (2012). "³H-Axial CH₂OH Substitution on Glucopyranose does not Increase Glycogen Phosphorylase Inhibitory Potency. QM/MM-PBSA Calculations Suggest Why." Chemical Biology & Drug Design **79**(5): 663-673.
140. Martin, J. L., L. N. Johnson and S. G. Withers (1990). "Comparison of the binding of glucose and glucose 1-phosphate derivatives to T-state glycogen phosphorylase b." Biochemistry **29**(48): 10745-10757.
141. Martin, J. L., K. Veluraja, K. Ross, L. N. Johnson, G. W. J. Fleet, N. G. Ramsden, I. Bruce, M. G. Orchard, N. G. Oikonomakos, A. C. Papageorgiou, D. D. Leonidas and H. S. Tsitoura

- (1991). "Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: The design of potential drugs for diabetes." Biochemistry (USA) **30**(42): 10101-10116.
142. Martin, W. H., D. J. Hoover, S. J. Armento, I. A. Stock, R. K. McPherson, D. E. Danley, R. W. Stevenson, E. J. Barrett and J. L. Treadway (1998). "Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**: 1776-1781.
143. Massillon, D., N. Barzilai, W. Chen, M. Hu and L. Rossetti (1996). "Glucose regulates in vivo glucose-6-phosphatase gene expression in the liver of diabetic rats." J Biol Chem **271**(17): 9871-9874.
144. Matschinsky, F. M. (2002). "Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics." Diabetes **51**(Suppl 3): S394-404.
145. Matschinsky, F. M., M. A. Magnuson, D. Zelent, T. L. Jetton, N. Doliba, Y. Han, R. Taub and J. Grimsby (2006). "The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy." Diabetes **55**(1): 1-12.
146. McCormack, J. G., N. Westergaard, M. Kristiansen, C. L. Brand and J. Lau (2001). "Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy." Curr Pharm Des **7**(14): 1451-1474.
147. McPherson, A. (1999). Crystallization of Biological Macromolecules. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
148. Melpidou, A. E. and N. G. Oikonomakos (1983). "Effect of Glucose-6-P on the Catalytic and Structural-Properties of Glycogen Phosphorylase-A." Febs Letters **154**(1): 105-110.
149. Mikol, V. and R. Giege (1992). The physical chemistry of protein crystallization: Crystallization of Nucleic acids and proteins. A practical approach, IRL Press.
150. Moller, D. E. (2001). "New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome." Nature **414**(6865): 821-827.
151. Monod, J., J. P. Changeux and F. Jacob (1963). "Allosteric proteins and cellular control systems." J Mol Biol **6**: 306-329.
152. Monod, J., J. Wyman and J. P. Changeux (1965). "On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model." J Mol Biol **12**: 88-118.
153. Morris, R. J. and G. Bricogne (2003). "Sheldrick's 1.2 Å rule and beyond." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **59**(Pt 3): 615-617.
154. Mountain, V. (2003). "Astex, Structural Genomix, and Syrrx. I can see clearly now: structural biology and drug discovery." Chem Biol **10**(2): 95-98.
155. Murata, G. H., W. C. Duckworth, R. M. Hoffman, C. S. Wendel, M. J. Mohler and J. H. Shah (2004). "Hypoglycemia in type 2 diabetes: a critical review." Biomed Pharmacother **58**(10): 551-559.
156. Nagy, L., T. Docsa, M. Szanto, A. Brunyanszki, C. Hegedus, J. Marton, B. Konya, L. Virag, L. Somsak, P. Gergely and P. Bai (2013). "Glycogen Phosphorylase Inhibitor N-(3,5-Dimethyl-Benzoyl)-N'-(beta-D-Glucopyranosyl)Urea Improves Glucose Tolerance under Normoglycemic and Diabetic Conditions and Rearranges Hepatic Metabolism." Plos One **8**(7).

157. Nagy, V., M. Benlifa, S. Vidal, E. Berzsenyi, C. Teilhet, K. Czifrak, G. Batta, T. Docsa, P. Gergely, L. Somsak and J.-P. Praly (2009). "Glucose-based spiro-heterocycles as potent inhibitors of glycogen phosphorylase." Bioorganic & Medicinal Chemistry **17**(15): 5696-5707.
158. Nagy, V., N. Felfoldi, B. Konya, J. P. Praly, T. Docsa, P. Gergely, E. D. Chrysin, C. Tiraidis, M. N. Kosmopoulou, K. M. Alexacou, M. Konstantakaki, D. D. Leonidas, S. E. Zographos, N. G. Oikonomakos, S. Kozmon, I. Tvaroska and L. Somsak (2012). "N-(4-Substituted-benzoyl)-N'-(beta-d-glucopyranosyl)ureas as inhibitors of glycogen phosphorylase: Synthesis and evaluation by kinetic, crystallographic, and molecular modelling methods." Bioorg Med Chem **20**(5): 1801-1816.
159. Nagy, V., N. Felfoldi, B. Konya, J. P. Praly, T. Docsa, P. Gergely, E. D. Chrysin, C. Tiraidis, M. N. Kosmopoulou, K. M. Alexacou, M. Konstantakaki, D. D. Leonidas, S. E. Zographos, N. G. Oikonomakos, S. Kozmon, I. Tvaroska and L. Somsak (2012). "N-(4-Substituted-benzoyl)-N'-(beta-D-glucopyranosyl)ureas as inhibitors of glycogen phosphorylase: Synthesis and evaluation by kinetic, crystallographic, and molecular modelling methods." Bioorganic & Medicinal Chemistry **20**(5): 1801-1816.
160. Nallamsetty, S., R. B. Kapust, J. Tozser, S. Cherry, J. E. Tropea, T. D. Copeland and D. S. Waugh (2004). "Efficient site-specific processing of fusion proteins by tobacco vein mottling virus protease in vivo and in vitro." Protein Expr Purif **38**(1): 108-115.
161. Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz (2000). "The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis." Science **289**(5481): 920-930.
162. Oezguen, N., L. Adamian, Y. Xu, K. Rajarathnam and W. Braun (2002). "Automated assignment and 3D structure calculations using combinations of 2D homonuclear and 3D heteronuclear NOESY spectra." J Biomol NMR **22**(3): 249-263.
163. Oikonomakos, N. G. (2002). "Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy." Curr. Protein. Pept. Sci. **3**(6): 561-586.
164. Oikonomakos, N. G., K. R. Acharya and L. N. Johnson (1992). Rabbit muscle glycogen phosphorylase b. The structural basis of activation and catalysis. Post-Translational Modification of Proteins. J. J. Harding and M. J. C. Crabbe. Boca Raton, Florida, CRC Press Inc.: 81-151.
165. Oikonomakos, N. G., K. R. Acharya, D. I. Stuart, A. E. Melpidou, P. J. McLaughlin and L. N. Johnson (1988). "Uridine(5')diphospho(1)-alpha-D-glucose. A binding study to glycogen phosphorylase b in the crystal." Eur J Biochem **173**(3): 569-578.
166. Oikonomakos, N. G., M. Kontou, S. E. Zographos, H. S. Tsitoura, L. N. Johnson, K. A. Watson, E. P. Mitchell, G. W. J. Fleet, J. C. Son, C. J. F. Bichard, D. D. Leonidas and K. R. Acharya (1994). "The design of potential antidiabetic drugs: Experimental investigation of a number of beta-D-glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase." Eur. J. Drug Metabol. & Pharmacokin. **19**(3): 185-192.
167. Oikonomakos, N. G., M. Kontou, S. E. Zographos, K. A. Watson, L. N. Johnson, C. J. Bichard, G. W. Fleet and K. R. Acharya (1995). "N-acetyl-beta-D-glucopyranosylamine: a potent T-state inhibitor of glycogen phosphorylase. A comparison with alpha-D-glucose." Protein Sci **4**(12): 2469-2477.

168. Oikonomakos, N. G., M. Kosmopoulou, S. E. Zographos, D. D. Leonidas, E. D. Chrysina, L. Somsak, V. Nagy, J. P. Praly, T. Docsa, B. Toth and P. Gergely (2002). "Binding of N-acetyl-N'-beta-d-glucopyranosyl urea and N-benzoyl-N'-beta-d-glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase b." Eur J Biochem **269**(6): 1684-1696.
169. Oikonomakos, N. G., M. N. Kosmopoulou, E. D. Chrysina, D. D. Leonidas, I. D. Kostas, K. U. Wendt, T. Klabunde and E. Defossa (2005). "Crystallographic studies on acyl ureas, a new class of glycogen phosphorylase inhibitors, as potential antidiabetic drugs." Protein Sci **14**(7): 1760-1771.
170. Oikonomakos, N. G., A. E. Melpidou and L. N. Johnson (1985). "Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalytic characterization." Biochim Biophys Acta **832**(3): 248-256.
171. Oikonomakos, N. G., J. B. Schnier, S. E. Zographos, V. T. Skamnaki, K. E. Tsitsanou and L. N. Johnson (2000). "Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site." J Biol Chem **275**(44): 34566-34573.
172. Oikonomakos, N. G., V. T. Skamnaki, E. Osz, L. Szilagyi, L. Somsak, T. Docsa, B. Toth and P. Gergely (2002). "Kinetic and crystallographic studies of Glucopyranosylidene Spirothiohydantoin Binding to Glycogen Phosphorylase b." Bioorg. Med. Chem. **10**(2): 261-268.
173. Oikonomakos, N. G., V. T. Skamnaki, K. E. Tsitsanou, N. G. Gavalas and L. N. Johnson (2000). "A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions." Structure **8**: 575-584.
174. Oikonomakos, N. G. and L. Somsak (2008). "Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design." Current Opinion in Investigational Drugs **9**(4): 379-395.
175. Oikonomakos, N. G., C. Tiraidis, D. D. Leonidas, S. E. Zographos, M. Kristiansen, C. U. Jessen, L. Norskov-Lauritsen and L. Agius (2006). "Iminosugars as potential inhibitors of glycogenolysis: structural insights into the molecular basis of glycogen phosphorylase inhibition." J Med Chem **49**(19): 5687-5701.
176. Oikonomakos, N. G., S. E. Zographos, V. T. Skamnaki and G. Archontis (2002). "The 1.76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase b complexed with glucose, and CP320626, a potential antidiabetic drug." Bioorg. Med. Chem. **10**(5): 1313-1319.
177. Oikonomakos, N. G., S. E. Zographos, V. T. Skamnaki and G. Archontis (2002). "The 1.76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase B complexed with glucose, and CP320626, a potential antidiabetic drug." Bioorg Med Chem **10**(5): 1313-1319.
178. Otwinowski, Z. and W. Minor (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Methods Enzymol. C. W. J. Carter and R. M. Sweet. New York, Academic Press. **276**: 307-326.
179. Palm, D. C., J. M. Rohwer and J. H. Hofmeyr (2013). "Regulation of glycogen synthase from mammalian skeletal muscle--a unifying view of allosteric and covalent regulation." FEBS J **280**(1): 2-27.

180. Papageorgiou, A. C., N. G. Oikonomakos and D. D. Leonidas (1989). "Inhibition of rabbit muscle glycogen phosphorylase by D- gluconohydroximo-1,5-lactone-N-phenylurethane." Archives of Biochemistry and Biophysics **272**(2): 376-385.
181. Papageorgiou, A. C., N. G. Oikonomakos, D. D. Leonidas, B. Bernet, D. Beer and A. Vasella (1991). "The binding of D-gluconohydroximo-1,5-lactone to glycogen phosphorylase. Kinetic, ultracentrifugation and crystallographic studies." Biochem. J. **274**(2): 329-338.
182. Parker, J. C., M. A. VanVolkenburg, C. B. Levy, W. H. Martin, S. H. Burk, Y. Kwon, C. Giragossian, T. G. Gant, P. A. Carpino, R. K. McPherson, P. Vestergaard and J. L. Treadway (1998). "Plasma glucose levels are reduced in rats and mice treated with an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase." Diabetes **47**(10): 1630-1636.
183. Pervushin, K., R. Riek, G. Wider and K. Wuthrich (1997). "Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12366-12371.
184. Pinotsis, N., D. D. Leonidas, E. D. Chrysina, N. G. Oikonomakos and I. M. Mavridis (2003). "The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies." Protein Sci **12**(9): 1914-1924.
185. Praly, J.-P. and S. Vidal (2010). "Inhibition of glycogen phosphorylase in the context of type 2 diabetes, with focus on recent inhibitors bound at the active site." Mini Rev Med Chem **10**(12): 1102-1126.
186. Rath, V. L., M. Ammirati, D. E. Danley, J. L. Ekstrom, E. M. Gibbs, T. R. Hynes, A. M. Mathiowetz, R. K. McPherson, T. V. Olson, J. L. Treadway and D. J. Hoover (2000). "Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site." Chem. Biol. **7**: 677-682.
187. Rath, V. L., M. Ammirati, P. K. LeMotte, K. F. Fennell, M. N. Mansour, D. E. Danley, T. R. Hynes, G. K. Schulte, D. J. Wasilko and J. Pandit (2000). "Activation of human liver glycogen phosphorylase by alteration of the secondary structure and packing of the catalytic core." Mol Cell **6**(1): 139-148.
188. Rhodes, G. (1999). Crystallography Made Crystal Clear. New York, Academic Press.
189. Roberts, N. A., J. A. Martin, D. Kinchington, A. V. Broadhurst, J. C. Craig, I. B. Duncan, S. A. Galpin, B. K. Handa, J. Kay, A. Krohn and et al. (1990). "Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors." Science **248**(4953): 358-361.
190. Saheki, S., A. Takeda and T. Shimazu (1985). "Assay of inorganic phosphate in the mild of pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity." Anal. Biochem. **148**: 277-281.
191. Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.
192. Saridakis, E. and N. E. Chayen (2003). "Systematic improvement of protein crystals by determining the supersolubility curves of phase diagrams." Biophys J **84**(2 Pt 1): 1218-1222.
193. Schinzel, R. (1991). "Active site lysine promotes catalytic function of pyridoxal 5'-phosphate in alpha-glucan phosphorylases." J Biol Chem **266**(15): 9428-9431.

194. Schinzel, R. and P. Drucekes (1991). "The phosphate recognition site of Escherichia coli maltodextrin phosphorylase." FEBS Lett **286**(1-2): 125-128.
195. Schinzel, R. and D. Palm (1990). "Escherichia coli maltodextrin phosphorylase: contribution of active site residues glutamate-637 and tyrosine-538 to the phosphorolytic cleavage of alpha-glucans." Biochemistry **29**(42): 9956-9962.
196. Schrödinger Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
197. Schrodinger, L. L. C. (2015). Modeling Software Suite. New York.
198. Schuttelkopf, A. W. and D. M. F. van Aalten (2004). "PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes." Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **60**: 1355-1363.
199. Segel, I. H. (1993). Enzyme Kinetics. New York, Wiley Interscience.
200. Shaltiel, S., J. L. Hedrick and E. H. Fischer (1966). "On the role of pyridoxal 5'-phosphate in phosphorylase. II. Resolution of rabbit muscle phosphorylase b." Biochemistry **5**(6): 2108-2116.
201. Skamnaki, V. T., D. J. Owen, M. E. Noble, E. D. Lowe, G. Lowe, N. G. Oikonomakos and L. N. Johnson (1999). "Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies." Biochemistry **38**(44): 14718-14730.
202. Somsak, L. (2011). "Glucose derived inhibitors of glycogen phosphorylase." Comptes Rendus Chimie **14**(2-3): 211-223.
203. Somsak, L., K. Czifrak, M. Toth, E. Bokor, E. D. Chrysina, K. M. Alexacou, J. M. Hayes, C. Tiraidis, E. Lazoura, D. D. Leonidas, S. E. Zographos and N. G. Oikonomakos (2008). "New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents." Curr Med Chem **15**(28): 2933-2983.
204. Sprang, S. R., K. R. Acharya, E. J. Goldsmith, D. I. Stuart, K. Varvill, R. J. Fletterick, N. B. Madsen and L. N. Johnson (1988). "Structural-Changes in Glycogen-Phosphorylase Induced by Phosphorylation." NATURE **336**(6196): 215-221.
205. Staehr, P., O. Hother-Nielsen and H. Beck-Nielsen (2002). "Hepatic glucose production: therapeutic target in type 2 diabetes?" Diabetes Obes Metab **4**(4): 215-223.
206. Stalmans, W., H. De Wulf, L. Hue and H. G. Hers (1973). "The sequential inactivation of glycogen phosphorylase and activation of glycogen synthetase in the liver after the administration of glucose to rats." Arch Int Physiol Biochim **81**(3): 598.
207. Stryer, L., J. M. Berg and J. L. Tymoczko (2002). Biochemistry, W.H. Freeman.
208. Toth, M., S. Kun, E. Bokor, M. Benlifa, G. Tallec, S. Vidal, T. Docsa, P. Gergely, L. Somsak and J.-P. Praly (2009). "Synthesis and structure-activity relationships of C-glycosylated oxadiazoles as inhibitors of glycogen phosphorylase." Bioorganic & Medicinal Chemistry **17**(13): 4773-4785.
209. Treadway, J. L., P. Mendys and D. J. Hoover (2001). "Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus." Expert Opin. Investig. Drugs **10**(3): 439-454.
210. Tsirkone, V. G., E. Tsoukala, C. Lamprakis, S. Manta, J. M. Hayes, V. T. Skamnaki, C. Drakou, S. E. Zographos, D. Komiotis and D. D. Leonidas (2010). "1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-

- glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies." Bioorg. Med. Chem. **18**(10): 3413-3425.
211. Tsitsanou, K. E., J. M. Hayes, M. Keramioti, M. Mamais, N. G. Oikonomakos, A. Kato, D. D. Leonidas and S. E. Zographos (2013). "Sourcing the affinity of flavonoids for the glycogen phosphorylase inhibitor site via crystallography, kinetics and QM/MM-PBSA binding studies: Comparison of chrysin and flavopiridol." Food Chem Toxicol **61**: 14-27.
212. Tsitsanou, K. E., N. G. Oikonomakos, S. E. Zographos, V. T. Skamnaki, M. Gregoriou, K. A. Watson, L. N. Johnson and G. W. Fleet (1999). "Effects of commonly used cryoprotectants on glycogen phosphorylase activity and structure." Protein Sci **8**(4): 741-749.
213. van Dijk, T. H., F. H. van der Sluijs, C. H. Wiegman, J. F. Baller, L. A. Gustafson, H. J. Burger, A. W. Herling, F. Kuipers, A. J. Meijer and D. J. Reijngoud (2001). "Acute inhibition of hepatic glucose-6-phosphatase does not affect gluconeogenesis but directs gluconeogenic flux toward glycogen in fasted rats. A pharmacological study with the chlorogenic acid derivative S4048." J Biol Chem **276**(28): 25727-25735.
214. van Poelje, P. D., S. C. Potter, V. C. Chandramouli, B. R. Landau, Q. Dang and M. D. Erion (2006). "Inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase reduces excessive endogenous glucose production and attenuates hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats." Diabetes **55**(6): 1747-1754.
215. Veber, D. F., S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward and K. D. Kopple (2002). "Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates." J Med Chem **45**(12): 2615-2623.
216. Velick, S. F. and L. F. Wicks (1951). "The amino acid composition of phosphorylase." J Biol Chem **190**(2): 741-751.
217. Vereb, G., A. Fodor and G. Bot (1987). "Kinetic characterization of rabbit skeletal muscle phosphorylase ab hybrid." Biochim Biophys Acta **915**(1): 19-27.
218. Verlinde, C. L. M. J. and W. G. J. Hol (1994). "Structure-Based Drug Design - Progress, Results and Challenges." Structure **2**(7): 577-587.
219. Vincent, M. F., M. D. Erion, H. E. Gruber and G. Van den Berghe (1996). "Hypoglycaemic effect of AICariboside in mice." Diabetologia **39**(10): 1148-1155.
220. Wagman, A. S. and J. M. Nuss (2001). "Current therapies and emerging targets for the treatment of diabetes." Curr Pharm Des **7**(6): 417-450.
221. Wajngot, A., V. Chandramouli, W. C. Schumann, K. Ekberg, P. K. Jones, S. Efendic and B. R. Landau (2001). "Quantitative contributions of gluconeogenesis to glucose production during fasting in type 2 diabetes mellitus." Metabolism **50**(1): 47-52.
222. Wallace, A. C., R. A. Laskowski and J. M. Thornton (1995). "LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions." Protein Eng **8**(2): 127-134.
223. Wang, J. H., M. L. Shonka and D. J. Graves (1965). "The Effect of Glucose on the Sedimentation and Catalytic Activity of Glycogen Phosphorylase." Biochem Biophys Res Commun **18**: 131-135.

224. Wanson, J. C. and P. Drochmans (1968). "Rabbit skeletal muscle glycogen. A morphological and biochemical study of glycogen beta-particles isolated by the precipitation-centrifugation method." *J Cell Biol* **38**(1): 130-150.
225. Watson, K. A., E. P. Mitchell, L. N. Johnson, G. Gruciani, J. C. Son, C. J. F. Bichard, G. W. J. Fleet, N. G. Oikonomakos, M. Kontou and S. E. Zographos (1995). "Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: from crystallographic analysis to drug prediction using GRID force-field and GOLPE variable selection." *Acta Crystallogr* **D51**: 458-472.
226. Weber, I. T., L. N. Johnson, K. S. Wilson, D. G. R. Yeates, D. L. Wild and J. A. Jenkins (1978). "Crystallographic studies on the activity of glycogen phosphorylase b." *Nature* **274**: 433-437.
227. Wen, X., H. Sun, J. Liu, K. Cheng, P. Zhang, L. Zhang, J. Hao, P. Ni, S. E. Zographos, D. D. Leonidas, K. M. Alexacou, T. Gimisis, J. M. Hayes and N. G. Oikonomakos (2008). "Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies." *J Med Chem* **51**(12): 3540-3554.
228. Westergaard, N., C. L. Brand, R. H. Lewinsky, H. S. Andersen, R. D. Carr, A. Burchell and K. Lundgren (1999). "Peroxyvanadium compounds inhibit glucose-6-phosphatase activity and glucagon-stimulated hepatic glucose output in the rat in vivo." *Arch Biochem Biophys* **366**(1): 55-60.
229. Westergaard, N., P. Madsen, J. M. Lundbeck, P. Jakobsen, A. Varming and B. Andersen (2002). "Identification of two novel and potent competitive inhibitors of the glucose-6-phosphatase catalytic protein." *Diabetes Obes Metab* **4**(2): 96-105.
230. Wlodawer, A., W. Minor, Z. Dauter and M. Jaskolski (2008). "Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures." *FEBS J* **275**(1): 1-21.
231. Wright, S. W., A. A. Carlo, M. D. Carty, D. E. Danley, D. L. Hageman, G. A. Karam, C. B. Levy, M. N. Mansour, A. M. Mathiowetz, L. D. McClure, N. B. Nestor, R. K. McPherson, J. Pandit, L. R. Pustilnik, G. K. Schulte, W. C. Soeller, J. L. Treadway, I. K. Wang and P. H. Bauer (2002). "Anilinoquinazoline inhibitors of fructose 1,6-bisphosphatase bind at a novel allosteric site: synthesis, in vitro characterization, and X-ray crystallography." *J Med Chem* **45**(18): 3865-3877.
232. Zheng, D., Y. J. Huang, H. N. Moseley, R. Xiao, J. Aramini, G. V. Swapna and G. T. Montelione (2003). "Automated protein fold determination using a minimal NMR constraint strategy." *Protein Sci* **12**(6): 1232-1246.
233. Zimmet, P., K. G. Alberti and J. Shaw (2001). "Global and societal implications of the diabetes epidemic." *Nature* **414**(6865): 782-787.
234. Zographos, S. E., N. G. Oikonomakos, K. E. Tsitsanou, D. D. Leonidas, E. D. Chrysina, V. T. Skamnaki, H. Bischoff, S. Goldmann, K. A. Watson and L. N. Johnson (1997). "The structure of glycogen phosphorylase b with an alkylidihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor." *Structure* **5**(11): 1413-1425.

235. Γλυκός, Ν. Μ. (2015). Μία μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών. Αθήνα, ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ.
236. Τσιτσάνου, Α. Ε. (2001). Σχεδιασμός αναστολέων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα: κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες. Διδακτορικό, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Συντμήσεις

Συντμήσεις	
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
AMP	5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη
ATP	τριφωσφορική αδενοσίνη
BES	N,N-δισ (2-υδροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθανοσουλφονικό οξύ
β-GP	μετά νατρίου άλας της β-φωσφορικής γλυκερόλης
cAMP	Κυκλική 5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DTT	διθειοθρεϊτόλη
EDTA	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
Glc-1-P	1-φωσφορική γλυκόζη
Glc-6-P	6-φωσφορική γλυκόζη
GP	φωσφορυλάση του γλυκογόνου
γ-PhK	γ-καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης
IMP	5'-μονοφωσφορική ινοσίνη
IPTG	Ισοπροπυλο-θειο-γαλακτοζίτης
K_i	σταθερά αναστολής
K_m	σταθερά Michaelis-Menten
MTG	Μono-θειο-γλυκερόλη
K_{map}	φαινόμενη σταθερά Michaelis-Menten
NaN₃	νατραζίδιο
P_i	ορθοφωσφορικό ανιόν
PKA	Πρωτεϊνική κινάση A
PLP	5'-φωσφορική πυριδοξάλη
PPI	Πρωτεϊνική φωσφατάση 1
SDS	δωδεκυλοθειϊκό νάτριο
TEA	τριαιθανολαμίνη
Tris	τρεις (υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο
UDP-Glc	Ουρινοδιφωσφορική γλυκόζη
V_{max}	Μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης (μmol P _i *mg ⁻¹ *min ⁻¹)

Συντμήσεις αμινοξέων	
Ala (A)	Αλανίνη
Arg (R)	Αργινίνη
Asn (N)	Ασπαραγίνη
Asp (D)	Ασπαρτικό
Cys (C)	Κυστεΐνη
Gln (Q)	Γλουταμίνη
Glu (E)	Γλουταμινικό
Gly (G)	Γλυκίνη
His (H)	Ιστιδίνη
Ile (I)	Ισολευκίνη
Leu (L)	Λευκίνη
Lys (K)	Λυσίνη
Met (M)	Μεθειονίνη
Phe (F)	Φαινυλαλανίνη
Pro (P)	Προλίνη
Ser (S)	Σερίνη
Thr (T)	Θρεονίνη
Trp (W)	Θρυπτοφάνη
Tyr (Y)	Τυροσίνη
Val (V)	Βαλίνη