



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**  
**ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**



**ΚΟΥΛΑΣ ΣΥΜΕΩΝ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2017**

**ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ  
ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

**KINETIC AND CRYSTALLOGRAPHIC STUDIES ON  
INHIBITORS OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE**

# **ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

**ΟΝΟΜΑ: ΣΥΜΕΩΝ ΚΟΥΛΑΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ**

***ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ***

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ**

**ANNA MARIA ΨΑΡΡΑ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ: ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	6
I. Περίληψη.....	7
II. Abstract.....	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης.....	9-10
1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I.....	10-11
1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II.....	11-12
1.2 Ομοιόσταση της γλυκώζης.....	12
1.2.1 Ινσουλίνη – Ρόλος και μεταβολικές επιδράσεις.....	12-13
1.2.2 Γλυκαγόνη.....	14
1.2.3 Γλυκογόνο-Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	14-15
1.2.3.1 Σύνθεση του γλυκογόνου.....	15-16
1.2.3.2 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	16-17
1.3 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .....	18-19
1.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	19-21
1.4.1 Μυϊκή φωσφορυλάση.....	21-22
1.4.2 Ηπατική φωσφορυλάση.....	22-23
1.4.3 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης.....	23-24
1.4.4 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	25
1.4.4.1 Καταλυτικό κέντρο.....	25
1.4.4.2 Κέντρο αναστολής.....	26
1.4.4.3 Κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου.....	26
1.4.4.4 Αλλοστερικό κέντρο.....	26-27
1.4.4.5 Νέο αλλοστερικό κέντρο.....	27
1.4.4.6 Κέντρο πρόσδεσης κερσετίνης.....	27-28
1.4.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων...28-29	
1.5 Κρυσταλλογραφία.....	30
1.5.1 Τι είναι κρύσταλλος.....	30-31
1.5.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων.....	31-33
1.5.3 Η θεωρία της περίθλασης των ακτίνων Χ.....	33
1.5.4 Ο Νόμος του Bragg.....	34-35
1.5.5 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου.....	35-36
1.5.6 Διάγραμμα Ramachandran.....	36-37
1.5.7 Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες Χ αποκαλύπτει την τρισδιάστατη δομή σε ατομικό επίπεδο.....	37-38
1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων.....	38-40
1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα και κινητικές μελέτες.....	40-41
1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων .....	41-43
Σκοπός.....	44
2. Υλικά και μέθοδοι.....	45

2.1 Αντιδραστήρια.....	45-46
2.2 Οργανολογία.....	46
2.3 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	46-47
2.4 Στήλες υγρής χρωματογραφίας.....	47
2.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	47
2.5.1 Χημικός μετασχηματισμός.....	47
2.6 Υγρή χρωματογραφία - Σύστημα FPLC.....	47-49
2.6.1 Χρωματογραφία συγγένειας.....	49-50
2.6.1.1 Στήλη IMAC με ακινητοποιημένα Ni <sup>2+</sup> .....	50-51
2.6.2 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	51-53
2.6.2.1 Στήλη Resource Q.....	53
2.7 Πρωτεάση TEV.....	54
2.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	54-58
2.8.1 Χρώση πηκτώματος.....	58
2.9 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford.....	58-59
2.10 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGPb).....	59-65
2.11 Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης (hlGP).....	66-68
2.12 Φωσφορυλίωση της GP.....	68-69
2.13 Κινητικές μελέτες έναντι της GP.....	69
2.13.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου.....	69-70
2.13.2 Ενζυμικό διάλυμα.....	70-71
2.13.3 Υποστρώματα.....	71-75
2.13.4 Ανάλυση κινητικών δεδομένων.....	75-77
2.14 Κρυσταλλογραφικές μελέτες.....	77
2.14.1 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb.....	77-78
2.14.2 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	79-80
2.14.3 Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου.....	80-81
3. Αποτελέσματα.....	81
3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών.....	81
3.1.1 Καθαρισμός και απομόνωση της rmGPb.....	81-82
3.1.2 Καθαρισμός και απομόνωση της hlGPb.....	82-85
3.2 Κινητικές μελέτες.....	85
3.2.1 Προσδιορισμός της K <sub>i</sub> του αναστολέα 6077 έναντι της rmGPb.....	85
3.2.2 Προσδιορισμός της K <sub>i</sub> του αναστολέα 5903 έναντι της rmGPb.....	86
3.2.3 Προσδιορισμός της K <sub>i</sub> του αναστολέα 5903 έναντι της hlGPb.....	86
3.3 Δομικά αποτελέσματα.....	87-90
Συζήτηση.....	91
Παράρτημα.....	92
Βιβλιογραφία.....	93-96

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το Φεβρουάριο του 2017 έως το Σεπτέμβριο του 2017, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Βιοχημείας του ΤΒΒ, Δρ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του. Η καθοδήγηση, η ενθάρρυνση και η βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας ήταν καθοριστικές. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη θερμά τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική, για τη συνεργασία και για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Rainer Riedl και τον Δρ. Ζωγράφο Σπύρο για τη συνεισφορά του στη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια και τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους υποψήφιους διδάκτορες Γεώργιο Στραβοδήμο και Ευθύμιο Κυριάκη για την απεριόριστη στήριξη και βοήθεια που παρείχαν, αλλά και για την υπομονή και τη διάθεση τους, καθώς ήταν πάντοτε πρόθυμοι να με καθοδηγήσουν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την υποστήριξη τους, τη βοήθεια, την ηθική στήριξη και την πολύτιμη συμβολή τους όλα αυτά τα χρόνια.

## I. Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές, εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δε διατηρούνται σταθερά. Είναι μια ομάδα μεταβολικών ασθενειών οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπεργλυκαιμία, που προκύπτει από ελαττώματα στην έκκριση ινσουλίνης, στην δράση της ινσουλίνης ή και τα δύο. Ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για κάποιο κέντρο σύνδεσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπογλυκαιμικά φάρμακα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*Glycogen Phosphorylase, GP*) καταλύει το πρώτο βήμα καταβολισμού του γλυκογόνου για παράγωγη 1-φωσφορικής γλυκόζης. Υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: τη φωσφορυλιωμένη *GP<sub>a</sub>* (βρίσκεται στην *R* στεροδιαμόρφωση και εμφανίζει υψηλή δραστικότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα) και την από-φωσφορυλιωμένη *GP<sub>b</sub>* (βρίσκεται στην *T* στεροδιαμόρφωση και έχει χαμηλή δραστικότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα) οι οποίες είναι σε ισορροπία. Ο βρόχος *280s* (κατάλοιπα 282-286) είναι υπεύθυνος για την αλλοστερική μετατροπή από την *T* στην *R* στερεοδιαμόρφωση, καθώς στην *T* στερεοδιαμόρφωση μπλοκάρει την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Η *GP* αποτελεί έναν έγκυρο φαρμακευτικό στόχο για την ανακάλυψη νέων αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων για τη θεραπεία του ΣΔ. Διαθέτει 6 γνωστές θέσεις σύνδεσης προσδετών εκ των οποίων το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στο επίκεντρο πολλών μελετών, οι οποίες εστιάζουν στο σχεδιασμό αναλόγων γλυκόζης με βάση την τρισδιάστατη δομή του ένζυμου.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση της *GP* από κονίκλους (*rmGP*) και ανθρώπινης ηπατικής *GP<sub>b</sub>* (*hIGP<sub>b</sub>*) από μετασχηματισμένα βακτήρια με αυτοματοποιημένο σύστημα *ÅKTA-FPLC*. Πραγματοποιήσαμε φωσφορυλίωση της *hIGP*, ώστε να προκύψει η *hIGP<sub>a</sub>*. Στη συνέχεια μελετήθηκε η σύνδεση δύο παραγώγων γλυκόζης (5903 και 6077) στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου με κινητικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στην ταυτοποίηση της πρόσδεσης των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο, καθώς και στην ανάδειξη των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. Οι τιμές των σταθερών αναστολής  $K_i$  που υπολογίστηκαν για τον 6077 έναντι της *hIGP<sub>a</sub>* ήταν 19.46  $\mu\text{M}$ , ενώ η σταθερά αναστολής για τον 5903 έναντι της *hIGP<sub>a</sub>* ήταν 20.24  $\mu\text{M}$  και έναντι της *rmGP<sub>b</sub>* ήταν 8.3  $\mu\text{M}$ .

## II. Abstract

Diabetes mellitus, one of the most serious hormonal imbalance diseases, is characterised by elevated blood glucose levels. It is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, resulting from defects in insulin secretion, insulin action, or both. Enzymes and hormones receptors involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets for the structure-based design of potential hypoglycaemic drugs. GP is a key enzyme involved in glycogen metabolism by catalyzing the first step of glycogen breakdown towards glucose-1-phosphate (G1P). It exists in two interconvertible forms: a phosphorylated form (GP<sub>a</sub>, R state; high activity and substrate specificity) and an unphosphorylated (GP<sub>b</sub>, T state; low activity and substrate specificity), which are in equilibrium. The molecular basis of the allosteric transition from the T to R state lies with a flexible loop (280s, residues 282–286) which in the T state partially blocks access to the catalytic site. GP is a valid pharmaceutical target for the discovery of new potential anti-hyperglycemic compounds for the treatment of diabetes. GP has at least 6 regulatory sites with the catalytic site being the most well studied site for drug design. The majority of these studies use the 3D structure of GP to design new anti hyperglycaemic agents. In this study we isolated and purified GP<sub>b</sub> from rabbit muscle (rmGP<sub>b</sub>), and human liver GP<sub>b</sub> (hLGP<sub>b</sub>) from recombinant bacteria using the automated ÄKTA-FPLC system. We have phosphorylated hLGP<sub>b</sub> to produce hLGP<sub>a</sub>. The binding of two glucose derivatives (5903 and 6077) at GP was studied with kinetic and crystallographic studies. Structural analysis revealed that these inhibitors bind on the catalytic site of the enzyme. The  $K_i$  values measured for the inhibitors 6077 and 5903 were at 19.46  $\mu\text{M}$  and 20.14  $\mu\text{M}$  respectively for hLGP<sub>a</sub>. Also the  $K_i$  value measured for the inhibitor 5903 at 8.3  $\mu\text{M}$  for rmGP<sub>b</sub>.



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης έχει γίνει μια σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία και αποτελεί μία τεράστια κοινωνική κατάσταση [1]. Είναι μια ομάδα μεταβολικών ασθενειών οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπεργλυκαιμία, που προκύπτει από ελαττώματα στην έκκριση ινσουλίνης, στην δράση της ινσουλίνης ή και τα δύο. Η χρόνια υπεργλυκαιμία του διαβήτη σχετίζεται με μακροχρόνια καταστροφή και δυσλειτουργία πολλών οργάνων και ιδιαίτερα των ματιών, των νεφρών, της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων [2].

Αρκετές παθογόνες διαδικασίες εμπλέκονται στην ανάπτυξη του διαβήτη. Σε αυτές συγκαταλέγονται η αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια ινσουλίνης, αλλά και ανωμαλίες που καταλήγουν στην ανοχή στην δράση της ινσουλίνης. Η βάση των ανωμαλιών στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών σε περιπτώσεις διαβήτη είναι η ανεπαρκής δράση της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους. Αυτό είναι αποτέλεσμα ανεπαρκούς έκκρισης ινσουλίνης και/ή ελαττωμένης ανταπόκρισης του ιστού στην ινσουλίνη σε ένα ή περισσότερα σημεία στις σύνθετες οδούς ορμονικής δράσης. Η προβληματική έκκριση ινσουλίνης και τα ελαττώματα της δράσης της συχνά συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή και είναι ασαφές ποια ανωμαλία είναι η αιτία της υπεργλυκαιμίας.

Οι μακροχρόνιες επιπλοκές του διαβήτη περιλαμβάνουν αμφιβληστροειδοπάθεια με πιθανή απώλεια της όρασης, νεφροπάθεια που οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια, περιφερική νεφροπάθεια με κίνδυνο πρόκλησης έλκους του ποδιού και ακρωτηριασμό και νευροπάθεια που προκαλεί γαστρεντερικά, καρδιαγγειακά προβλήματα, σεξουαλική δυσλειτουργία. Οι ασθενείς με διαβήτη έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής, περιφερικής αγγειακής και εγκεφαλοαγγειακής νόσου. Η υπέρταση, οι ανωμαλίες του μεταβολισμού των λιποπρωτεϊνών και η περιοδοντική νόσος βρίσκονται συχνά σε άτομα με διαβήτη.

Τα συμπτώματα της χαρακτηρισμένης υπεργλυκαιμίας περιλαμβάνουν την πολουρία, την πολυδιψία, απώλεια βάρους, πολυφαγία και θολή όραση. Η καθυστέρηση της ανάπτυξης και η ευαισθησία σε ορισμένες λοιμώξεις μπορεί επίσης να συνοδεύει την χρόνια υπεργλυκαιμία. Οι απειλητικές για την ζωή συνέπειες του διαβήτη είναι η υπεργλυκαιμία με κετοξέωση ή το μη κετοξικό υπεροσμωτικό σύνδρομο [4].

Οι συναισθηματικές και κοινωνικές επιπτώσεις του διαβήτη και οι απαιτήσεις της θεραπείας μπορεί να προκαλέσουν σημαντική ψυχοκοινωνική δυσλειτουργία στους ασθενείς και τις οικογένειές τους.

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για τον Διαβήτη (*International Diabetes Federation, IDF*) το 2013 έπασχαν από διαβήτη 382 εκατομμύρια άνθρωποι και ο αριθμός αναμένεται να φτάσει τους 552 εκατομμύρια πάσχοντες έως το 2035 [3].

Οι κυριότεροι τύποι σακχαρώδη διαβήτη είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II και ο διαβήτης της κύησης. Σε αυτούς τους τύπους σακχαρώδη διαβήτη, ο μεταβολισμός των κύριων θρεπτικών ουσιών έχει αλλοιωθεί. Ως αποτέλεσμα, η συγκέντρωση της γλυκόζης του αίματος αυξάνεται, η κυτταρική κατανάλωση της γλυκόζης ελαττώνεται σημαντικά και η κατανάλωση των λιπών και των πρωτεϊνών αυξάνει. Υπάρχουν και κάποιες ειδικές κατηγορίες διαβήτη που οφείλονται σε γενετήσια έλλειψη των β-παγκρεατικών κυττάρων, γενετικά ελαττώματα στην δράση της ινσουλίνης, μολύνσεις, ενδοκρिनοπάθειες, ασθένειες του εξωκρινούς παγκρέατος, διαβήτης επαγόμενος από φάρμακα ή χημικά και διαβήτης που είναι αποτέλεσμα άλλων γενετικών συνδρόμων [4].

### **1.1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I**

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I ή αλλιώς ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης είναι αποτέλεσμα αυτοάνοσης καταστροφής των κυττάρων του παγκρέατος. Σε αυτή τη μορφή διαβήτη ο ρυθμός καταστροφής των β-κυττάρων του παγκρέατος δεν είναι σταθερός και είναι γρήγορος σε ορισμένους ασθενείς (κυρίως βρέφη και παιδιά) και αργός σε άλλους (κυρίως ενήλικες). Ορισμένοι ασθενείς, ιδιαίτερα τα παιδιά και οι έφηβοι, εμφανίζουν κετοξέωση στο πρώτο στάδιο εκδήλωσης της νόσου, ενώ άλλοι έχουν υπεργλυκαιμία που μπορεί γρήγορα να μετατραπεί σε σοβαρή υπεργλυκαιμία και κετοξέωση παρουσία μόλυνσης ή άλλου στρεσογόνου παράγοντα [4]. Η διαβητική κετοξέωση προκύπτει από ανεπάρκεια ινσουλίνης η οποία διεγείρει την αύξηση "ανταγωνιστικών" ορμονών όπως γλυκαγόνης, κατεχολαμινών, κορτιζόλης και αυξητικής ορμόνης. Χωρίς την δυνατότητα χρήσης γλυκόζης το σώμα χρειάζεται εναλλακτικές πηγές ενέργειας. Αυξάνεται η δραστηριότητα της ορμονο-ευαίσθητης λιπάσης προκαλώντας διάσπαση του λιπώδους ιστού που παράγει ελεύθερα λιπαρά οξέα. Αυτά τα συστατικά μετατρέπονται σε ακέτυλο-συνένζυμο Α μέρος του οποίου εισέρχεται στον κύκλο του Krebs για παραγωγή ενέργειας. Το υπόλοιπο διασπάται σε κετόνες (ακετόνη, ακετοξικό, υδροξυβουτηρικό). Οι κετόνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ενέργεια. Επίσης το γλυκογόνο και οι πρωτεΐνες καταβολίζονται για να σχηματίζουν γλυκόζη. Αυτοί οι παράγοντες προάγουν την υπεργλυκαιμία, η οποία οδηγεί σε ωσμωτική διούρηση που οδηγεί σε αφυδάτωση, μεταβολική οξέωση και υπεροσμωτική κατάσταση [5].

Υπάρχουν περιπτώσεις που αφορούν κυρίως ενήλικες στις οποίες διατηρείται η λειτουργία των υπολειπόμενων β-κυττάρων και είναι επαρκής για την πρόληψη της κετοξέωσης για πολλά χρόνια. Πολλά τέτοια άτομα με αυτή την μορφή του ΣΔ

τύπου I τελικά εξαρτώνται από την ινσουλίνη για την επιβίωση τους. Σε αυτό το τελευταίο στάδιο εμφάνισης της νόσου, υπάρχει μικρή έως μηδενική έκκριση ινσουλίνης. Ο ανοσομεσολαβούμενος διαβήτης εμφανίζεται συνήθως κατά την παιδική ηλικία και την εφηβεία αλλά μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε ηλικία, ακόμα και στην όγδοη και ένατη δεκαετία της ζωής. Η αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων έχει πολλαπλές γενετικές προδιαθέσεις και σχετίζεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι ακόμα δεν έχουν αποσαφηνιστεί, ενώ για την διάγνωση του διαβήτη τύπου I λαμβάνεται υπόψη και η παχυσαρκία [4].

### 1.1.2 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II ή αλλιώς μη-ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης (NIDDM), οφείλεται σε ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης. Η μειωμένη αυτή ευαισθησία προς την ινσουλίνη συχνά αναφέρεται ως αντίσταση στην ινσουλίνη. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II είναι κατά πολύ συχνότερος από τον τύπο I και αποτελεί περίπου το 90-95% των περιπτώσεων του σακχαρώδους διαβήτη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο διαβήτης τύπου II εμφανίζεται στην ηλικία των 30, αρκετά συχνά στην ηλικία των 50 ή 60, ενώ η νόσος εξελίσσεται σταδιακά. Για αυτό το λόγο η νόσος αποκαλείται και σακχαρώδης διαβήτης της ενηλικίωσης. Παρ' όλα αυτά τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σταθερή αύξηση της εμφάνισης της νόσου σε μικρότερες ηλικίες, ακόμα και νωρίτερα από τα 20 έτη. Αυτό σχετίζεται κυρίως με την αύξηση του ποσοστού της παχυσαρκίας, η οποία αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα ανάπτυξης σακχαρώδους διαβήτη τύπου II τόσο στα παιδιά όσο και στους ενήλικους.

Η παχυσαρκία, η αντίσταση στην ινσουλίνη και το "μεταβολικό σύνδρομο" συνήθως προϋπάρχουν κατά την ανάπτυξη του διαβήτη τύπου II. Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου I, ο διαβήτης τύπου II σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση ινσουλίνης στο πλάσμα (υπερινσουλιναίμια). Αυτό οφείλεται στην αντιρροπιστική απάντηση των β-κυττάρων του παγκρέατος ώστε να μειωθεί η ευαισθησία των ιστών στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης, μια κατάσταση που ονομάζεται αντίσταση στην ινσουλίνη. Η μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη προκαλεί ελάττωση του καταβολισμού και της αποθήκευσης των υδατανθράκων, με αποτέλεσμα την αύξηση της γλυκόζης στο αίμα και την ενεργοποίηση αντισταθμικής αύξησης στην έκκριση της ινσουλίνης [6].

Η ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη και η μείωση του μεταβολισμού της γλυκόζης είναι σταδιακά αναπτυσσόμενες καταστάσεις που αρχίζουν με την αύξηση του σωματικού βάρους και την παχυσαρκία. Οι μηχανισμοί που συνδέουν την παχυσαρκία με την αντίσταση είναι ακόμα άγνωστοι. Η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελεί μέρος μιας σειράς διαταραχών που καλείται "μεταβολικό σύνδρομο".

Ορισμένα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου είναι (1) η παχυσαρκία, (2) η αντίσταση στην ινσουλίνη, (3) η υπεργλυκαιμία της νηστείας, (4) οι λιπιδικές διαταραχές, (5) η υπέρταση. Τα περισσότερα στοιχεία του μεταβολικού συνδρόμου είναι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών διαταραχών, και η αντίσταση στην ινσουλίνη προδιαθέτει στην ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη τύπου II, ο οποίος είναι επίσης κύρια αιτία εμφάνισης της καρδιαγγειακής νόσου. Η ανάπτυξη ικανής ιστικής αντίστασης στην ινσουλίνη και ο διαβήτης τύπου II μπορεί να οφείλεται σε άλλες επίκτητες ή γενετικές καταστάσεις που μειώνουν την ευαισθησία των περιφερικών ιστών προς την ινσουλίνη [6].

## **1.2 Ομοίωση της γλυκόζης**

### **1.2.1 Ινσουλίνη - Ρόλος και Μεταβολικές επιδράσεις**

Η ινσουλίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη που αποτελείται από 2 πεπτιδικές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Όταν οι 2 αλυσίδες των αμινοξέων διαχωρίζονται, η λειτουργική δραστηριότητα του μορίου της ινσουλίνης μηδενίζεται. Η ινσουλίνη συντίθεται στα β-κύτταρα με τον συνήθη μηχανισμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης και αρχικά σχηματίζεται η προϊνσουλίνη που αποτελείται από τρεις πεπτιδικές αλυσίδες Α, Β και C. Το μεγαλύτερο μέρος της προϊνσουλίνης κόβεται, περαιτέρω, σε μικρότερα κομμάτια στη συσκευή Golgi και έτσι παράγεται η ινσουλίνη, η οποία αποτελείται από την Α και Β αλυσίδα που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Για την έναρξη των επιδράσεων της ινσουλίνης στα κύτταρα στόχους, η ινσουλίνη συνδέεται πρώτα με ένα πρωτεϊνικό υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης. Οι επακόλουθες επιδράσεις προκαλούνται από αυτό τον ενεργοποιημένο υποδοχέα και όχι από την ινσουλίνη. Ο υποδοχέας για την ινσουλίνη αποτελείται από 4 υπομονάδες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς: δύο άλφα υπομονάδες που βρίσκονται εντελώς έξω από την κυτταρική μεμβράνη και δύο βήτα υπομονάδες που διαπερνούν την μεμβράνη και το ένα άκρο τους προεξέχει μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Η ινσουλίνη συνδέεται με τις άλφα υπομονάδες, που βρίσκονται έξω από το κύτταρο. Εξαιτίας όμως των δεσμών με τις β-υπομονάδες, τα τμήματα των β-υπομονάδων που προεξέχουν προς το εσωτερικό του κυττάρου υφίστανται αυτοφωσφορυλίωση. Η αυτοφωσφορυλίωση των β-υπομονάδων των υποδοχέων ενεργοποιεί μια τοπική κίνηση τυροσίνης, η οποία με την σειρά της προκαλεί φωσφορυλίωση αρκετών άλλων ενδοκυττάρων ενζύμων, όπως είναι η ομάδα που ονομάζεται υπόστρωμα του υποδοχέα ινσουλίνης (IRS). Έτσι με αυτό τον έμμεσο τρόπο η ινσουλίνη κατευθύνει τον ενδοκυττάριο μεταβολικό μηχανισμό για να προκαλεί τις επιθυμητές επιδράσεις στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών.

Αμέσως μετά από γεύμα με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, η γλυκόζη που απορροφάται προς το αίμα προκαλεί ταχεία έκκριση ινσουλίνης. Η ινσουλίνη

με την σειρά της, προκαλεί ταχεία πρόσληψη, αποθήκευση και χρήση της γλυκόζης από όλους σχεδόν τους ιστούς του σώματος, αλλά ιδιαίτερα από τους μύες, τον λιπώδη ιστό και το ήπαρ. Μία από τις σημαντικότερες επιδράσεις της ινσουλίνης είναι η προαγωγή της αποθήκευσης του μεγαλύτερου μέρους της γλυκόζης που απορροφάται από το έντερο μετά από γεύμα σχεδόν αμέσως στο ήπαρ, με τη μορφή γλυκογόνου. Στη συνέχεια, στα μεταξύ των γευμάτων χρονικά διαστήματα, όταν δεν υπάρχει διαθέσιμη τροφή και η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα αρχίζει να ελαττώνεται, η έκκριση της ινσουλίνης μειώνεται και το γλυκογόνο του ήπατος αρχίζει να διασπάται προς γλυκόζη, που αποδίδεται προς το αίμα για τη διατήρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε ικανοποιητικό επίπεδο.

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου I γίνεται με χορήγηση αρκετής ινσουλίνης ώστε ο ασθενής να έχει όσο το δυνατόν πιο φυσιολογικό μεταβολισμό υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών. Η ινσουλίνη διατίθεται σε διάφορες μορφές. Η "συνήθης" ινσουλίνη έχει διάρκεια δράσης 3 έως 8 ώρες, ενώ άλλες μορφές της ινσουλίνης (που περιέχουν ψευδάργυρο ή άλλα πρωτεϊνικά παράγωγα) απορροφώνται βραδέως από την θέση έγχυσης και για αυτό το λόγο έχουν διάρκεια δράσης 10 έως 48 ωρών. Συνήθως ο ασθενής με σοβαρό διαβήτη τύπου I δέχεται ημερήσια εφάπαξ δόση ινσουλίνης παρατεταμένης δράσης, ώστε να αυξηθεί ο μεταβολισμός των υδατανθράκων καθόλη τη διάρκεια της ημέρας. Στη συνέχεια, πρόσθετες ποσότητες της συνήθους ινσουλίνης χορηγούνται κατά την διάρκεια της ημέρας όταν τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος τείνουν να αυξηθούν όπως και κατά την διάρκεια των γευμάτων. Επομένως η θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη εξατομικεύεται για κάθε ασθενή. Στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, συνιστάται η μείωση του σωματικού βάρους και η καθημερινή άσκηση, ώστε να αναστραφεί η ιστική αντίσταση προς την ινσουλίνη. Αν τα μέτρα αυτά αποτυγχάνουν, τότε πρέπει να χορηγηθούν φάρμακα που αυξάνουν την ιστική ευαισθησία προς την ινσουλίνη ή που διεγείρουν την αυξημένη σύνθεση ινσουλίνης από το πάγκρεας, Παρ' όλα αυτά, σε πολλούς ασθενείς απαιτείται η εξωγενής χορήγηση ινσουλίνης, για τη ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος [6].

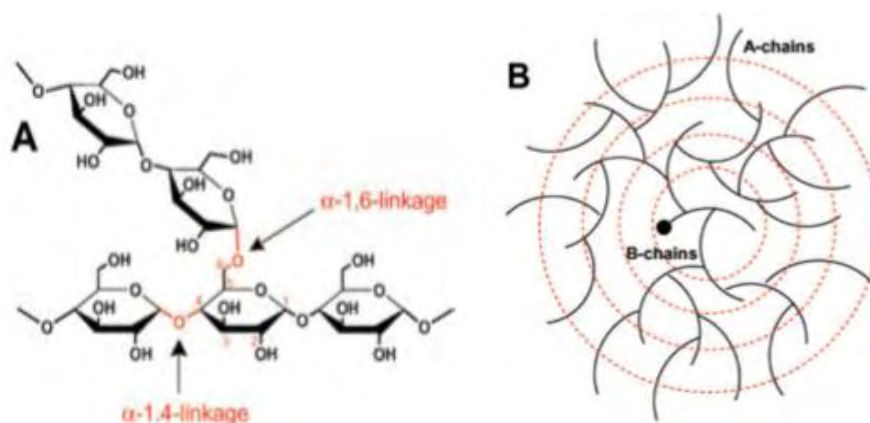
### 1.2.2 Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη είναι μια ορμόνη που εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans, όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ελαττώνεται, και έχει πολλαπλές λειτουργίες. Η σημαντικότερη από αυτές είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα, επίδραση που είναι ακριβώς αντίθετη από εκείνη της ινσουλίνης. Οι κύριες επιδράσεις της γλυκαγόνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης είναι (1) η διάσπαση του γλυκογόνου του ήπατος (γλυκογονόλυση) και (2) η αύξηση της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ. Η γλυκαγόνη προάγει τη γλυκογονόλυση και αυξάνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Αυτό γίνεται με το ακόλουθο σύμπλεγμα αλυσιδωτών αντιδράσεων. Η γλυκαγόνη ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση στη μεμβράνη των ηπατικών κυττάρων και σχηματίζεται κυκλική AMP. Έτσι, ενεργοποιείται η πρωτεϊνική κινάση A η οποία ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης (PhK) που με τη σειρά της ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) η οποία προάγει τη διάσπαση του γλυκογόνου [6].

### 1.2.3 Γλυκογόνο – Μεταβολισμός του Γλυκογόνου

Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης που λειτουργεί ως μέσο αποθήκευσης της γλυκόζης στα κύτταρα σε περιόδους διατροφικής αφθονίας και χρησιμοποιείται όταν η προσλαμβανόμενη γλυκόζη δεν είναι αρκετή. Το γλυκογόνο υπάρχει σε οργανισμούς όπως τα βακτήρια, τα αρχαία και ο άνθρωπος. Τα φυτά συνθέτουν συναφή πολυμερή γλυκόζης με τη μορφή αμύλου το οποίο αποτελείται από αμυλοπεκτίνη, που είναι ένας πολυσακχαρίτης χημικά παρόμοιος με το γλυκογόνο και την αμυλόζη, που είναι ένα μη διακλαδισμένο γραμμικό πολυμερές γλυκόζης. Η ανακάλυψη του γλυκογόνου του ήπατος αποδίδεται στον Claude Bernard το 1857. Περίπου 150 χρόνια αργότερα, αρκετές από τις αρχικές του αρχές εξακολουθούν να γίνονται αποδεκτές και η μελέτη του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο δεύτερο μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα εισήγαγε νέες βιοχημικές έννοιες, οι οποίες τώρα ενσωματώνονται στην τρέχουσα γνώση για τη βιολογική ρύθμιση και έχουν ως αποτέλεσμα την απονομή τεσσάρων βραβείων Νόμπελ (Carl και Gerty Cori το 1947, Louis Leloir το 1970, Earl Sutherland το 1971, Edwin Krebs και Edmond Fischer το 1992). Ο πρωταρχικός πολυμερισμός του γλυκογόνου παρέχεται από α-1,4- γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ καταλοίπων γλυκόζης και οι διακλαδώσεις εισάγονται από α-1,6- γλυκοζιτικούς δεσμούς [7].

Το γλυκογόνο δεν είναι τόσο ανηγμένο όσο τα λιπαρά οξέα και επομένως δεν είναι τόσο πλούσιο σε ενέργεια. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Επομένως, το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Επίσης, η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και έτσι είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική και έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Στο ήπαρ η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα της γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως σύνολο. Αντίθετα, στους μύες οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών και μόνο [8].



Εικόνα 1: **A)** Παρατηρούνται οι  $\alpha$ -1,4- και  $\alpha$ -1,6- γλυκοζιτικοί δεσμοί **B)** Παρουσιάζεται η οργάνωση του γλυκογόνου σε εσωτερικές  $\beta$ -αλυσίδες που φέρουν κατά μέσο όρο δύο διακλαδώσεις και σε εξωτερικές  $\alpha$ -αλυσίδες που δεν έχουν διακλαδώσεις. Η μαύρη κουκίδα δηλώνει τη θέση της γλυκογονίνης [7].

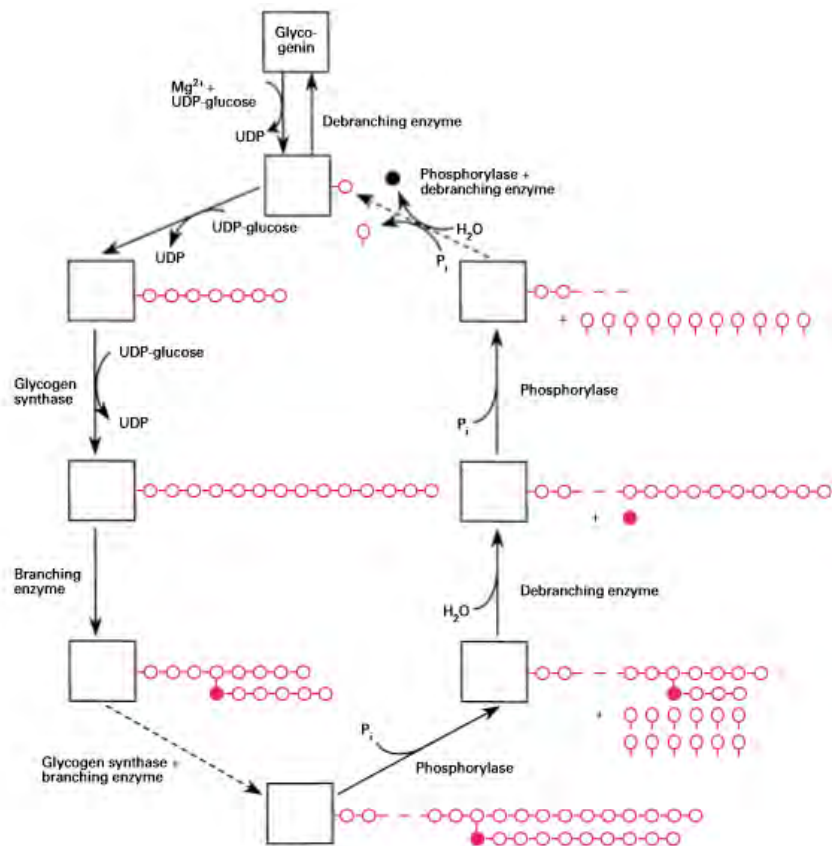
### 1.2.3.1 Σύνθεση του γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου απαιτεί την πρόσληψη εξωκυττάριας γλυκόζης από τα κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του μεταφορέα γλυκόζης. Οι πρόδρομοι για τη σύνθεση του γλυκογόνου είναι, είτε γλυκόζη που προέρχεται από πρόσφατα απορροφούμενους υδατάνθρακες, είτε πρόδρομοι γλυκονεογένεσης, όπως το γαλακτικό και η αλανίνη. Για την "άμεση οδό" απαιτείται μεταφορά γλυκόζης από έναν ή περισσότερους GLUTS (μεταφορές γλυκόζης). Το 1957, ο Luis Lenoir έδειξε ότι το γλυκογόνο συντίθεται με μια πορεία που χρησιμοποιεί ουριδινοφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη). Η UDP-γλυκόζη συντίθεται από 1-φωσφορική γλυκόζη και τριφωσφορική ουριδίνη (UTP) σε μία αντίδραση που καταλύεται από την πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης. Υπάρχει ένα εξειδικευμένο εναρκτήριο

βήμα στο οποίο η γλυκογονίνη αυτό-γλυκοζυλιώνεται για να σχηματίσει μια πρόδρομη αλυσίδα ολιγοσακχαριτών. Η γλυκογονίνη, μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου, μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα με τη συνθάση του γλυκογόνου που είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των α-1,4- γλυκοζιτικών δεσμών. Ο σχηματισμός των α-1,6- γλυκοζιτικών δεσμών χρειάζεται τη δράση μιας μεταφοράσης [7].

### 1.2.3.2 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου συνίσταται σε τρία βήματα: (1) απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο, (2) ανακατασκευή του υποστρώματος γλυκογόνου για νέα αποικοδόμηση, (3) μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6 φωσφορική γλυκόζη. Η αποδοτική αποικοδόμηση του γλυκογόνου για να προμηθεύσει 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό χρειάζεται τέσσερις ενζυμικές δραστηριότητες: μία να αποικοδομεί το γλυκογόνο, δύο να ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο ώστε να παραμένει ένα υπόστρωμα για αποικοδόμηση και μία να μετατρέπει το προϊόν του καταβολισμού του γλυκογόνου σε μια μορφή κατάλληλη για περαιτέρω μεταβολισμό. Παρακάτω εξετάζεται καθεμία από αυτές τις δραστηριότητες [8].



Εικόνα 2 : Τα στάδια της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου[9]



Η σύνθεση και η διάσπαση του γλυκογόνου απαιτεί και την συμμετοχή άλλων ενζύμων, όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.

➤ Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase, GP)

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου (τα άκρα με μια ελεύθερη 4-υδροξυλική ομάδα). Αποτελεί καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, και διασπά το γλυκογόνο με την προσθήκη ορθοφωσφορικού (Pi) προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση. Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά διότι το απελευθερούμενο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα μια υδρολυτική διάσπαση θα απέδιδε γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια θα έπρεπε να φωσφορυλιωθεί με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου συνεχίζει την δράση της μέχρι να συναντήσει ένα εμπόδιο. Οι γλυκοζιτικοί δεσμοί α-1,6 στα σημεία διακλάδωσης δε διασπώνται από τη φωσφορυλάση, καθώς αυτή σταματά τη διάσπαση των δεσμών α-1,4 όταν φθάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο διακλάδωσης. Επειδή περίπου 1 στα 10 κατάλοιπα βρίσκονται σε διακλάδωση, η αποικοδόμηση του γλυκογόνου με τη φωσφορυλάση θα σταματήσει μετά την απελευθέρωση έξι μορίων γλυκόζης ανά διακλάδωση [8].

Για να συνεχιστεί η αποικοδόμηση του γλυκογόνου απαιτείται η δράση δύο επιπλέον ενζύμων:

➤ Μεταφοράση

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 [8].

➤ Γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6

Η γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6 γνωστή επίσης 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 με το γλυκολυτικό ένζυμο εξοκινάση [8].

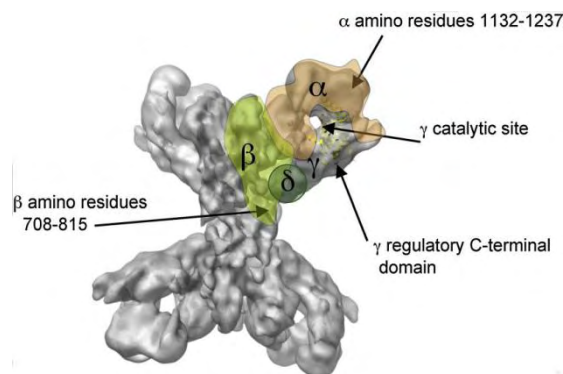
Έτσι, η μεταφοράση και το ένζυμο αποδιακλάδωσης μετατρέπουν τη δομή σε γραμμική, γεγονός που ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω διάσπαση από τη φωσφορυλάση [8].

### 1.3 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών που απαρτίζουν μία από τις μεγαλύτερες γνωστές οικογένειες πρωτεϊνών, με περισσότερα από 100 ομόλογα ένζυμα στη ζύμη και περισσότερα από 55 στον άνθρωπο. Αυτή η πολλαπλότητα των ενζύμων επιτρέπει τον ακριβή συντονισμό της ρύθμισης σύμφωνα με το συγκεκριμένο ιστό, τον χρόνο ή το υπόστρωμα. Τα ένζυμα αυτά μεταφέρουν φωσφορικές ομάδες από την ATP σε εξειδικευμένα κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης των πρωτεϊνών.

Η κινάση της φωσφορυλάσης είναι ένα ένζυμο το οποίο τροποποιεί ομοιοπολικά τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου μετατρέποντας την από την GPb στην GPα ισομορφή, ως απόκριση σε ορμονικά ερεθίσματα. Είναι ένα εξαδεκαμερές που αποτελείται από 4 υπομονάδες (αβγδ)<sub>4</sub>, έχει δομή που μοιάζει με πεταλούδα και έχει συνολική μάζα 1.3 MDa. Η υπομονάδα δ είναι ταυτόσημη με την καλμοδουλίνη και προσδίδει ενεργοποίηση της κινάσης από Ca<sup>2+</sup>. Αυτός ο τρόπος ενεργοποίησης είναι σημαντικός για τους μύς, όπου το έναυσμα της σύσπασης τους είναι η απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Σε αντίθεση με τα περισσότερα ένζυμα που ρυθμίζονται από καλμοδουλίνη, η κινάση της φωσφορυλάσης διατηρεί την δ-υπομονάδα της, ακόμα και απουσία Ca<sup>2+</sup>. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στην γ-υπομονάδα (45kDa), που περιέχει μια περιοχή κινάσης και ένα καρβοξυτελικό άκρο πρόσδεσης καλμοδουλίνης. Η α-υπομονάδα (138 kDa) και η β-υπομονάδα (125 kDa) είναι πολύ παρόμοιες στη δομή τους, με μοναδική διαφορά να αποτελούν οι αλληλουχίες που περιβάλλουν τις θέσεις φωσφορυλίωσης [9].

Η κινάση της φωσφορυλάσης ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση και μετατρέπεται από μια μορφή χαμηλής δραστηριότητας σε μια υψηλής δραστηριότητας με φωσφορυλίωση της υπομονάδας β. Το ένζυμο που καταλύει την ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφορυλάσης είναι η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) η οποία αρχίζει να λειτουργεί με ένα δεύτερο αγγελιαφόρο, την κυκλική AMP. Η κινάση επιτυγχάνει τη μέγιστη δραστηριότητα μόνο ύστερα από φωσφορυλίωση της υπομονάδας β και ενεργοποίηση της υπομονάδας δ με δέσμευση Ca<sup>2+</sup> [8].



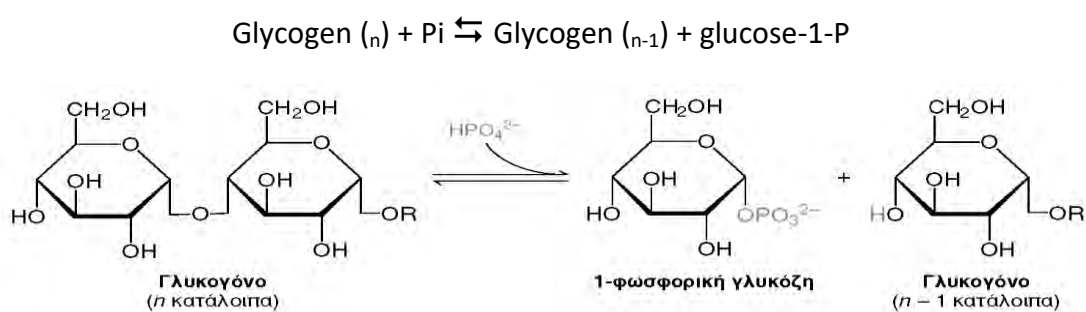
Εικόνα 3 : Σχηματική απεικόνιση του ολοενζύμου της PhK όπου παρουσιάζονται οι 4 υπομονάδες

του, από μελέτες κρουσηλεκτρονιακής μικροσκοπίας του ενζύμου [10].

#### 1.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου κατέχει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και έτσι μπορεί να αξιοποιηθεί ως δυνητικός στόχος για σχεδιασμό ισχυρών αναστολέων με βάση τη δομή, που μπορεί να είναι σχετικοί με τον έλεγχο των συγκεντρώσεων γλυκόζης στο Διαβήτη τύπου II [11].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου κατάλυσει το πρώτο βήμα της αποικοδομητικής πορείας του γλυκογόνου, καθώς διασπά το γλυκογόνο με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού (Pi) προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης.



Εικόνα 4: Αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου [8]

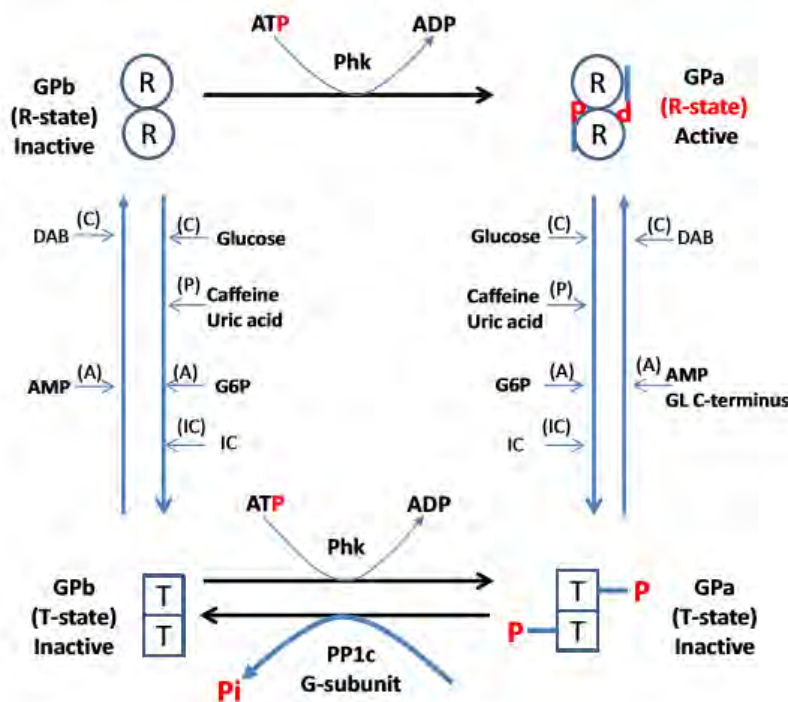
Η φωσφορολυτική διάσπαση των α-1,4-γλυκοζιτικών δεσμών πραγματοποιείται από τα μη αναγωγικά άκρα της αλυσίδας του γλυκογόνου, και η φωσφορυλάση επεκτείνει τη δράση της μέχρι το τέταρτο κατάλοιπο από το σημείο της διακλάδωσης. Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro* και ο λόγος ισορροπίας της 1-φωσφορικής γλυκόζης προς το ορθοφωσφορικό είναι 0.28 σε pH 6.8. Ωστόσο, το ένζυμο *in vivo* δρα μόνο προς την κατεύθυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης του γλυκογόνου, επειδή στο κύτταρο η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου είναι σημαντικά περισσότερη από την συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης [12].

Υπάρχουν 3 ισομορφές της φωσφορυλάσης οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια PYGL, PYGM και PYGB και εκφράζονται στο ήπαρ, στους μύες και στον εγκέφαλο αντίστοιχα. Στον άνθρωπο, η ηπατική και η μυϊκή φωσφορυλάση είναι κατά προσέγγιση 90% παρόμοιες στην αλληλουχία αμινοξέων. Και οι τρεις ισομορφές της φωσφορυλάσης ρυθμίζονται αλλοστερικά με δέσμευση μεταβολιτών και με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της σερίνης 14. Η φωσφορυλάση ήταν το πρώτο ένζυμο που φαίνεται ότι ρυθμίζεται με ομοιοπολική φωσφορυλίωση. Η μυϊκή φωσφορυλάση από κόνικλους (rmGb) έχει 97 % ομολογία με την ανθρώπινη μυϊκή φωσφορυλάση (hmGP) με βάση την αμινοξική αλληλουχία. Επιπλέον, τα τρία ισοένζυμα που υπάρχουν στον άνθρωπο μοιράζονται μεταξύ τους 80-83 % ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία ενώ μεταξύ της rmGP και της ηπατικής

φωσφορυλάσης (hIGP) δεν υπάρχουν δομικές διαφορές στο καταλυτικό και στα αλλοστερικά κέντρα.

Η φωσφορυλιωμένη και η από-φωσφορυλιωμένη μορφή, ορίζονται αντιστοίχως ως GP<sub>a</sub> και GP<sub>b</sub>. Η GP βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργούς χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T. Η φωσφορυλίωση από την κινάση της φωσφορυλάσης (PhK) και η πρόσδεση ποικίλων αλλοστερικών ενεργοποιητών, όπως η AMP, μετατοπίζουν την ισορροπία στην κατάσταση R. Αντίθετα, η αποφωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) και η πρόσδεση αναστολέων, όπως η γλυκόζη, προωθούν την μετάβαση από την κατάσταση R στην κατάσταση T [13].

Η κατάσταση R έχει μεγαλύτερη συγγένεια για υποστρώματα και συγκεκριμένους αλλοστερικούς τελεστές όπως η AMP. Η κατάσταση T έχει μικρότερη συγγένεια για το γλυκογόνο και τα ορθοφωσφορικά ιόντα (P<sub>i</sub>). Η φωσφορυλίωση της σερίνης 14 και η πρόσδεση της AMP στο "αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης" ευνοεί την κατάσταση R. Αυτό το "αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης της AMP" το οποίο είναι γειτονικό της θέσης φωσφορυλίωσης μπορεί να προσδέσει πολλούς φωσφορολυτικούς προσδέτες συμπεριλαμβανομένων της 6-φωσφορικής γλυκόζης, της 1-φωσφορικής γλυκόζης, της ATP, ADP, IMP, οι οποίοι σταθεροποιούν την κατάσταση T. Το καταλυτικό κέντρο προσδένει τα υποστρώματα P<sub>i</sub> και G1P που σταθεροποιούν την κατάσταση R και προσδένει γλυκόζη που σταθεροποιεί την κατάσταση T. Το γλυκογόνο προσδένεται στο αλλοστερικό ή στο κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου και ευνοεί την R κατάσταση, ενώ στο αλλοστερικό κέντρο αναστολέων πουρίνης, που βρίσκεται κοντά το καταλυτικό κέντρο προσδένεται, καφεΐνη και άλλα ανάλογα πουρίνης όπως AMP. Οι προσδέτες σε αυτό το κέντρο σταθεροποιούν την κατάσταση T μαζί με την γλυκόζη που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο [14].



Εικόνα 5: Έλεγχος της φωσφορυλάσης με φωσφορυλίωση και αλλοστερικές τροποποιήσεις. Η κινάση της φωσφορυλάσης (Phk) καταλύει τη μετατροπή της GPb σε GPa με φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου σερίνης στο N-τελικό άκρο της κάθε υπομονάδας του κάθε διμερούς. Οι αλλοστερικοί προσδέτες σταθεροποιούν είτε την R είτε την T διαμόρφωση. Οι προσδέτες που σταθεροποιούν την κατάσταση T είναι η γλυκόζη που προσδέεται στο καταλυτικό κέντρο, η καφεΐνη και το ουρικό οξύ (P) και η 6-φωσφορική γλυκόζη (P) που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο. Επίσης η AMP και το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης GL προσδέονται στο κέντρο σύνδεσης της AMP και σταθεροποιούν την κατάσταση R. Οι αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μπορούν να σταθεροποιήσουν είτε την κατάσταση R (το DAB προσδέεται στο καταλυτικό κέντρο), είτε την κατάσταση T. Στην κατάσταση T, το N-τελικό άκρο είναι προσβάσιμο για αποφωσφορυλίωση της σερίνης 14 από την πρωτεϊνική φωσφατάση-1 (PP1c) σε συνδυασμό με μία πρωτεΐνη στόχευσης γλυκογόνου (υπομονάδα G), με αποτέλεσμα τη μετατροπή της Gpa σε Gpb [14].

#### 1.4.1 Μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι διμερής και υπάρχει σε δύο αλληλομετατρεπόμενες μορφές: μια συνήθως ενεργό φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργό φωσφορυλάση b. Κάθε μία από τις δύο αυτές μορφές βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργούς χαλαρής R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για τη φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R ενώ η ισορροπία για την φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μία φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η φωσφορυλάση b μετατρέπεται στη φωσφορυλάση a όταν αυτή φωσφορυλιώνεται σε ένα απλό κατάλοιπο σερίνης (σερίνη 14) σε κάθε υπομονάδα, από το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης που όπως προαναφέρθηκε καταλύει αυτή την ομοιοπολική τροποποίηση.

Η σύγκριση των δομών της φωσφορυλάσης α και της φωσφορυλάσης β αποκάλυψε ότι λεπτές δομικές αλλαγές στις επιφάνειες επαφής των υπομονάδων μεταφέρονται στο ενεργό κέντρο. Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση β) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση α) συνεπάγεται μια στροφή 10 μοιρών γύρω από τον άξονα συμμετρίας δευτέρας τάξεως του διμερούς. Η μετάβαση αυτή συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α-έλικες οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι, η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργός διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδιζόμενο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό ιόν είναι καλά οργανωμένη. Η θέση ισορροπίας της φωσφορυλάσης β μεταξύ των καταστάσεων T και R ανταποκρίνεται στις συνθήκες του κυττάρου. Η μυϊκή φωσφορυλάση β είναι ενεργός μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης β στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής, αναταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως, η μετάπτωση της φωσφορυλάσης β από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Στις περισσότερες φυσιολογικές συνθήκες, η φωσφορυλάση β είναι ανενεργός λόγω των ανασταλτικών αντιδράσεων της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση α είναι πλήρως ενεργός, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP, της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Στους μυς που βρίσκονται σε ηρεμία, σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή β. Όταν αρχίζει η άσκηση, το αυξημένο επίπεδο της AMP οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης β. Η άσκηση επίσης θα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ορμόνη η οποία προκαλεί τη δημιουργία της φωσφορυλιωμένης μορφής α του ενζύμου. [8]

#### **1.4.2 Ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου**

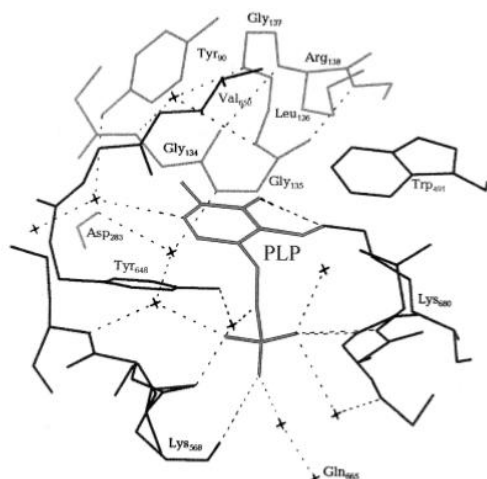
Στον άνθρωπο, η ηπατική και μυϊκή φωσφορυλάση είναι κατά προσέγγιση 90% παρόμοιες στην αλληλουχία αμινοξέων. Μία πολύ σημαντική διαφορά είναι ότι η AMP προκαλεί μικρή ενεργοποίηση της ηπατικής GPb. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α και όχι η β παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την κατάσταση R στην T, απενεργοποιώντας το ένζυμο. Η γλυκόζη λειτουργεί ως ένας αρνητικός ρυθμιστής της φωσφορυλάσης α, καθώς ο ρόλος της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι η παράγωγή γλυκόζης για εξαγωγή σε άλλους ιστούς, όταν το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλό. Άρα, αν ελεύθερη γλυκόζη

προέρχεται από μερικές άλλες πηγές, όπως η διατροφή, δεν υπάρχει ανάγκη κινητοποίησης του γλυκογόνου [8].

### 1.4.3 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης

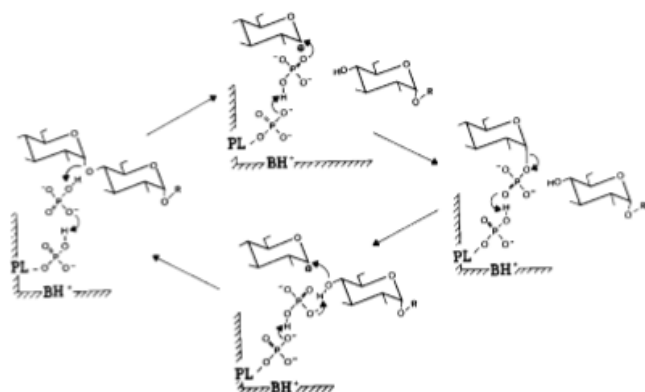
Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση της ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό νερού από το ενεργό κέντρο. Διάφορες ενδείξεις παρέχουν πληροφορίες γύρω από το μηχανισμό με τον οποίο η φωσφορυλάση επιτυγχάνει τον αποκλεισμό νερού. Πρώτον, τόσο το υπόστρωμα γλυκογόνου όσο και η παραγόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση  $\alpha$  στον C-1. Μία άμεση προσβολή της φωσφορικής ομάδας στον C-1 ενός σακχάρου θα ανέστρεφε τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα, διότι η αντίδραση θα προχωρούσε μέσω μιας πενταθενούς μεταβατικής κατάστασης. Επειδή η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση  $\alpha$  παρά  $\beta$ , απαιτείται ένας αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Η πιο πιθανή εξήγηση για τα αποτελέσματα αυτά είναι ότι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν [8].

Η φωσφορική πυριδοξάλη είναι μέρος του καταλυτικού μηχανισμού της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ανακαλύφθηκε το 1957 από τον Baranowski στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου από μύες κονίκλων. Η PLP συμμετέχει ως συμπαραγοντας σε πολλές ενζυμικές αντιδράσεις του μεταβολισμού των αμινοξέων (τρανσαμίνωση, αποκαρβοξυλίωση και άλλες) χρησιμοποιώντας ένα κοινό μηχανισμό. Σύμφωνα με αυτό το μηχανισμό, το βασικό ενδιάμεσο βήμα σε αυτού του τύπου αντιδράσεις, είναι ο σχηματισμός μιας βάσης Schiff μεταξύ της φωσφορικής πυριδοξάλης και του κατάλληλου αμινοξέος. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου η αλδεϋδική ομάδα της PLP σχηματίζει μία βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης 680 του ενζύμου. Η παρουσία αυτού του δεσμού είναι απαραίτητη για την εμφάνιση καταλυτικής δραστηριότητας. Η χρήση διαφορετικών χημικών αναλόγων της PLP με τροποποιήσεις σε κάθε θέση γύρω από τον δακτύλιο πυριδίνης έδειξε ότι η PLP υποστηρίζει την φυσική δομή του ενζύμου και συμμετέχει και στην κατάλυση [12].



Εικόνα 6: Παρουσιάζεται η ενεργός περιοχή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η PLP σταθεροποιείται σε μια σταθερή διαμόρφωση μέσω πολλών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων των πλευρικών αλυσίδων του συνενζύμου και των αμινοξικών καταλοίπων των καρβοξυτελικών και αμινοτελικών περιοχών. Τα μόρια του νερού απεικονίζονται με σταυρούς. [12]

Τα αποτελέσματα δομικών μελετών υποδηλώνουν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μια θέση μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό λειτουργώντας ως δότης πρωτονίων και στη συνέχεια ως δέκτης πρωτονίων (δηλαδή σαν ένας οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό ιόν ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο, που είναι στον άνθρακα 4 της αποχωρούσας αλυσίδας του γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν, που σχηματίζεται στο βήμα αυτό, προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό προς σχηματισμό φωσφορικής γλυκόζης δεσμού α-1, με την επακόλουθη επιστροφή ενός ατόμου υδρογόνου στη φωσφορική πυριδοξάλη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης [8].



Εικόνα 7 : Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η PLP συμμετέχει στην ενζυμική αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Το σχήμα της αντίδρασης δείχνει την αντιστρεψιμότητα της φωσφορόλυσης των ολιγοσακχαριτών (R) παρουσία ορθοφωσφορικού ιόντος (πάνω μισό) και την σύνθεση παρουσία 1-φωσφορικής γλυκόζης (κάτω μισό). PL = πυριδοξάλη,  $\text{BH}^+$  = πρωτονιωμένη γενική βάση που προσφέρεται από το πρωτεϊνικό ένζυμο. [12]



#### 1.4.4 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα διμερές το οποίο αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες των 97 kDa (842 κατάλοιπα). Κάθε υπομονάδα αποτελείται από δύο περιοχές, μία αμινοτελική δομική περιοχή και μία καρβοξυτελική δομική περιοχή. Η αμινοτελική περιοχή (480 κατάλοιπα) χαρακτηρίζεται από πολλές ρυθμιστικές περιοχές, όπως η σερίνη 14, η οποία τροποποιείται με φωσφορυλίωση, το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης AMP, και το κέντρο πρόσδεσης γλυκογόνου. Η καρβοξυτελική περιοχή (360 κατάλοιπα) διαθέτει τη θέση πρόσδεσης του συνενζύμου PLP και μαζί με την αμινοτελική περιοχή σχηματίζουν το καταλυτικό κέντρο το οποίο βρίσκεται σε μια σχισμή που καλύπτεται από μια πύλη αποτελούμενη από κατάλοιπα της N-τελικής περιοχής [8,14].

Έχουν αναγνωρισθεί 6 διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου: το καταλυτικό κέντρο, το αλλοστερικό κέντρο, το νέο αλλοστερικό κέντρο, το κέντρο αναστολής, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου και το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης που ανακαλύφθηκε πρόσφατα [1].

##### 1.4.4.1 Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου βρίσκεται στο κέντρο κάθε υπομονάδας του ενζύμου. Περιλαμβάνει το συμπαράγοντα PLP και είναι προσβάσιμο στο διαλύτη μέσω ενός καναλιού μήκους 15 Å. Οι αναστολείς που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s (κατάλοιπα 282-287) και επιπλέον παρεμποδίζουν την πρόσβαση του υποστρώματος και προωθούν την ανενεργό κατάσταση T. Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε φωσφορυλάση του γλυκογόνου που προέρχεται από μύες κονίκλων, εξαιτίας της διαθεσιμότητας και της ικανότητας να παράγονται υψηλής ποιότητας κρύσταλλοι. Οι αναστολείς που προσδένονται πιο ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο είναι ανάλογα γλυκόζης. Έχει δειχθεί σε πρόσφατη μελέτη (Nagy et al., 2013) ότι τα ανάλογα γλυκόζης είναι ικανά να μειώσουν τα επίπεδα γλυκόζης σε ποντίκια κάτω από φυσιολογικές και υπεργλυκαιμικές συνθήκες. Ο φυσιολογικός αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι η α-D-γλυκόζη με σταθερά αναστολής  $K_i$  1.7 mM για την rmGPb, ενώ το ανωμερές β-D-γλυκόζη προσδένεται με σταθερά αναστολής 7.4 mM. Τα ανάλογα γλυκόζης αποτελούν τους πλέον διερευνημένους αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με α- και β-υποκαταστάσεις στο ανωμερικό C1 άτομο [1].

#### 1.4.4.2 Κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής, που είναι επίσης γνωστό ως κέντρο πρόσδεσης της καφεΐνης, βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση προσδετών σε αυτό το κέντρο γίνεται κυρίως μέσω της παρεμβολής των αρωματικών αλυσίδων των καταλοίπων Phe285 και Tyr613 μέσω σχηματισμού αλληλεπιδράσεων π-π. Οι προσδέτες είναι πιο ισχυροί παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης. Έτσι, η ανασταλτική δραστηριότητα μπορεί να ρυθμιστεί από τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και να μειωθεί όταν τα επίπεδα γλυκόζης πλησιάσουν στο κανονικό, μειώνοντας τον κίνδυνο για υπεργλυκαιμία. Η καφεΐνη ήταν ο πρώτος αναστολέας που βρέθηκε να δεσμεύεται σε αυτό το κέντρο ( $K_i=0,1$  mM). Κατά τη σύνδεση με την gmGPb, η καφεΐνη παρεμβάλλεται μεταξύ 2 αρωματικών καταλοίπων, Phe285 και Tyr613, και σχηματίζει πολλούς δεσμούς Van der Waals. Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι τα φλαβονοειδή λειτουργούν ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ωστόσο δεν έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης και διαφορετικά φλαβονοειδή προσδένονται σε διαφορετικά κέντρα σύνδεσης της GP [1].

#### 1.4.4.3 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου

Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και είναι η περιοχή του ενζύμου που συνδέεται το γλυκογόνο. Αποτελείται από 2 έλικες (κατάλοιπα 396-418 και 420-439) και ένα βρόχο που συνδέει 2 αντιπαράλληλους κλώνους (κατάλοιπα 430-432 και 437-411). Για την πρόσδεση α- ( $K_i=47,1$  mM), β- ( $K_i=14,1$  mM) και γ- ( $K_i=7,4$  mM) κυκλοδεξτρινών στην gmGPb έχουν γίνει κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες (Pinotsis et al 2003). Άλλοι αναστολείς που προσδένονται σε αυτή τη θέση είναι η ακαρβόζη ( $K_i=26$  mM για την gmGPα), μαλτοπεντόζη (G5) και μαλτοεπτάζη (G7) ( $K_i=1$  mM για την gmGPb). Η δομική βάση της πρόσδεσης αυτών των μελετημένων προσδετών (κυκλικών και γραμμικών) είναι παρόμοια και περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα Ser429, Lys473 και Asn407, καθώς και αλληλεπιδράσεις με μόρια νερού με τα κατάλοιπα Gln401, Arg426, Val431 και Gln433 [1].

#### 1.4.4.4 Αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου συντίθεται από δομικά στοιχεία που προέρχονται και από τις δύο υπομονάδες του λειτουργικού διμερούς και βρίσκεται σε αντίθετες πλευρές του μορίου του ενζύμου. Δύο α-έλικες (κατάλοιπα 47-78 και 289-314 αντίστοιχα) και τέσσερις β-κλώνοι (κατάλοιπα 153-160, 191-193, 222-232 και 237-247) δημιουργούν μια κοιλότητα σχήματος V η οποία κλείνει από μία περιοχή που αποτελείται από τα κατάλοιπα 36' έως 47 της

συμμετρικής υπομονάδας, και σχηματίζεται το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο αυτό αναγνωρίζει μεγάλη ποικιλία φωσφορυλιωμένων συστατικών όπως AMP, IMP, ATP, UDP γλυκόζη, 6-φωσφορική γλυκόζη, β-γλυκεροφωσφορικό και ανόργανο φωσφόρο. Η 6-φωσφορική γλυκόζη είναι ο ισχυρότερος φυσικός αναστολέας της GPb που προσδένεται στο αλλοστερικό κέντρο ( $K_d=20-70 \mu\text{M}$  για την GPb,  $K_d=1700 \mu\text{M}$  για την GPa). Η σύνδεση των προσδετών σε αυτό το κέντρο αναστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, είτε ανταγωνίζοντας την AMP που είναι φυσιολογικός ενεργοποιητής είτε σταθεροποιώντας την ανενεργό διαμόρφωση T του ενζύμου [1].

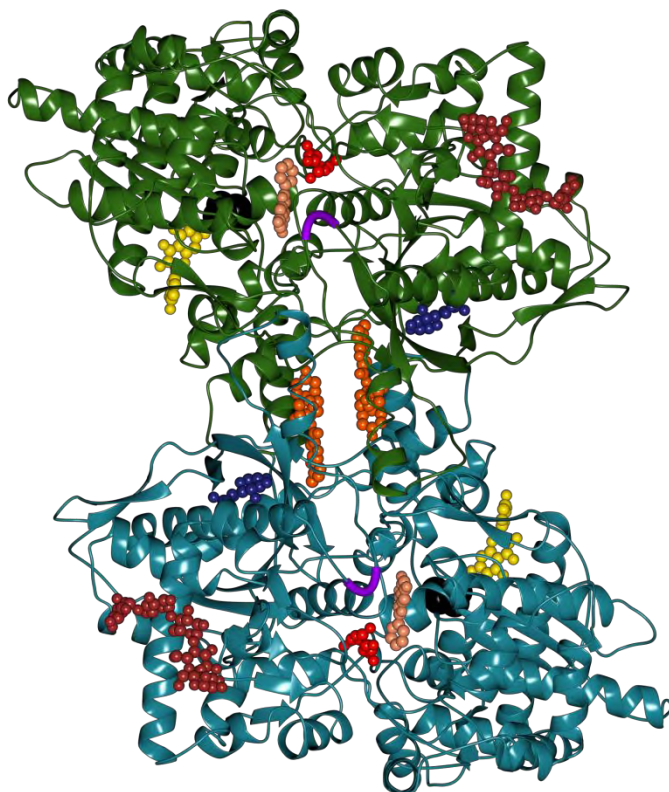
#### 1.4.4.5 Νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στο κέντρο της κοιλότητας του διμερούς ενζύμου που σχηματίζεται από τις δύο υπομονάδες. Η κεντρική κοιλότητα του νέου αλλοστερικού κέντρου σχηματίζεται στο ένα άκρο από κατάλοιπα της *car'* περιοχής και  $\alpha 2$  έλικες (Arg33, His34, Arg60 και Asp61 και τα συμμετρικά τους ισοδύναμα) και το άλλο άκρο από τον  $\alpha 7$  πύργο ελίκων (κατάλοιπα Asn270, Glu273, Ser276 και τα συμμετρικά τους ισοδύναμα). Τα 18 αμινοξέα (9 από κάθε υπομονάδα) που συνθέτουν αυτό το κέντρο είναι πολύ συντηρημένα στην ανθρώπινη ηπατική και μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου, και στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών, του ήπατος και του εγκεφάλου κονίκλων. Το νέο αλλοστερικό κέντρο απέχει 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολέα. Ο ισχυρότερος φυσικός αναστολέας του νέου αλλοστερικού κέντρου είναι το ινδόλιο. Οι αναστολείς που προσδένονται λειτουργούν σαν κλασσικοί αλλοστερικοί αναστολείς σταθεροποιώντας την κατάσταση T (ανενεργός) και εμφανίζουν συνέργεια με άλλους αναστολείς, όπως η γλυκόζη [1].

#### 1.4.4.6 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Σε μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από από το Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας (Kantsadi et al., 2014) βρέθηκε ότι ενώ η χρυσίνη και η φλαβοπυριδόλη δεσμεύονται αποκλειστικά στο αλλοστερικό κέντρο, η κερσετίνη προσδένεται σε ένα νέο κέντρο. Αυτό το κέντρο απέχει 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Επίσης η βρέθηκε ότι η κερσετίνη είναι το περισσότερο βιοδραστικό συστατικό ανάμεσα σε 13 πολυφαινολικά εκχυλίσματα που προέρχονταν από υποπροϊόντα οινοποίησης της ελληνικής ποικιλίας *Vitis vinifera* (Kantsadi et. al., 2014). Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Lys544, Arg551, Lys665 και Tyr548 της C-περιοχής και από τα κατάλοιπα Glu120 και Glu123 της N-περιοχής. Συγκριτική

δομική ανάλυση των T και R διαμορφώσεων, μεταξύ του συμπλέγματος gmGPb – κερσετίνης και της ελεύθερης gmGPb, έδειξαν ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην R-κατάσταση, ενώ στην T-κατάσταση (ανενεργός) οι διαφορές είναι μικρές. Επιπλέον, φαίνεται ότι η πρόσδεση της κερσετίνης σε αυτό το κέντρο ευνοεί την λιγότερο ενεργό κατάσταση T, μέσω σταθεροποίησης της διαμόρφωσης του βρόχου (κατάλοιπα 548-556) στην κατάσταση T [1].



Εικόνα 8: Η κρυσταλλική δομή της GPb με τα έξι κέντρα πρόσδεσης: **καταλυτικό κέντρο** (G6P), **κέντρο αναστολής** (3EB0), κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου (1P29), **νέο αλλοστερικό κέντρο** (1H5U), **κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης** (4MRA), αλλοστερικό κέντρο (1GPY), βρόχος **280s** και η **Ser14**.

#### 1.4.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 [15]. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο

στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. [16].

Ωστόσο η ύπαρξη των τριών ισομορφών (της ηπατικής, της μυϊκής και του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Συγκεκριμένα για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο άλλες ισομορφές [17]. Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ [18].

Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιορισθεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων [19].

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP.

## 1.5 Κρυσταλλογραφία

### 1.5.1 Τι είναι κρύσταλλος;

Οι κρύσταλλοι είναι στερεά σώματα που αποτελούνται από ακριβείς επαναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου. Τα μόρια σε ένα κρύσταλλο τοποθετούνται με τάξη, δηλαδή κανονικά, συμμετρικά και επαναλαμβανόμενα. Η μονάδα που περιγράφει έναν κρύσταλλο είναι η μοναδιαία κυψελίδα. Κατά συνέπεια ένας κρύσταλλος μπορεί να παραχθεί από ένα μόριο, επαναλαμβάνοντας την εφαρμογή ενός συνόλου πράξεων (ή τελεστών) συμμετρίας (μετατόπισης ή στροφής). Κατά συνέπεια στην περιγραφή ενός κρυστάλλου χρειάζεται να περιγραφεί μόνο η λιγότερο συμμετρική μονάδα καθώς και η συμμετρία που μας δίνει ένα κρύσταλλο. Σε ένα κρύσταλλο, η μοριακή οντότητα που αντιστοιχεί στο επίπεδο χωρίς καμία συμμετρία, καλείται ασύμμετρη μονάδα. Αρχίζοντας από την ασύμμετρη μονάδα μπορούν να εφαρμοστούν πράξεις περιστροφής και ελικώσεως (δηλαδή μετατόπισης και στροφής), για να κατασκευαστεί το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος. Το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος μετατοπίζεται και προς τις τρεις διαστάσεις, σχηματίζοντας μια κανονική και επαναλαμβανόμενη διάταξη, που αποκαλείται κρυσταλλικό πλέγμα. Τα γειτονικά σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους για να αποτελέσουν τις κορυφές τρισδιάστατων κουτιών, τα οποία είναι οι μοναδιαίες ή στοιχειώδεις κυψελίδες. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιλαμβάνει όλα τα άτομα των μοτίβων του κρυσταλλικού πλέγματος και της ασύμμετρης μονάδας. Οι ακμές της μοναδιαίας κυψελίδας ορίζουν ένα σύνολο μοναδιαίων διανυσματικών αξόνων  $a, b$  και  $c$ , με τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας να απεικονίζονται στα αντίστοιχα μήκη τους  $a, b$  και  $c$ . Η σχέση μεταξύ των μηκών  $a, b$ , και  $c$  και των γωνιών μεταξύ των αξόνων καθορίζουν μοναδικά τη μορφή και το μέγεθος της μοναδιαίας κυψελίδας. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί για τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας. Ένας κρύσταλλος είναι μια επαναλαμβανόμενη σε τρεις διαστάσεις διάταξη (χωρίς κενά) των μοναδιαίων κυψελίδων, που οικοδομεί ένα κρυσταλλικό πλέγμα και κατασκευάζεται με τη μετατόπιση των μοναδιαίων κυψελίδων σε τρεις διαστάσεις, ώστε να γεμίσει ένας όγκος. Η μοναδιαία κυψελίδα κατασκευάζεται με τη μετατόπιση του επαναλαμβανόμενου μοτίβου (τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος) και το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος παράγεται με την εφαρμογή των πράξεων συμμετρίας στην ασύμμετρη μονάδα. Η μορφολογία ενός κρυστάλλου καθορίζεται από το μέγεθος και τη μορφή μιας μοναδιαίας κυψελίδας (τα μήκη του  $a$ , του  $b$  και του  $c$  και τις γωνίες του) καθώς και από τη συμμετρία του μοτίβου. Οι περιορισμοί που τίθενται για τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας επιτρέπουν την κατασκευή 14 μοναδικών κρυσταλλικών πλεγμάτων. Αυτά είναι τα κρυσταλλικά πλέγματα Bravais. Ο συνδυασμός των 32 τύπων συμμετρίας μαζί με τα 14 κρυσταλλικά πλέγματα Bravais περιγράφουν όλες τις πιθανές μορφολογίες των

κρυστάλλων που παράγουν τις μορφές και τη συμμετρία 230 διαφορετικών ομάδων χώρου, όπου κάθε ομάδα χώρου καθορίζει μοναδικά τον αριθμό των ασύμμετρων μονάδων, που συναποτελούν τη μοναδιαία κυψελίδα του κρυστάλλου. [21]

### 1.5.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων

Ένας κρύσταλλος είναι ένα στερεό σώμα, αλλά τα μακρομόρια υπάρχουν συνήθως σε μορφή υδατικών διαλυμάτων. Κατά συνέπεια για την δημιουργία ενός κρυστάλλου πρέπει τα διαλελυμένα μόρια να οδηγηθούν εκτός διαλύματος ή να κατακρημνιστούν με έναν ελεγχόμενο τρόπο που να ευνοεί την τάξη. Ένα μόριο εγκαταλείπει το διάλυμα, όταν η συγκέντρωση του υπερβεί την εγγενή του διαλυτότητα  $S^0$  ( η  $S^0$  δεν είναι πραγματικά μια εγγενής ιδιότητα, αλλά εξαρτάται από εξωγενείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, της πίεσης και του διαλύτη). Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου απαιτεί την αύξηση της συγκέντρωσης του υλικού στην υπέρκορη κατάσταση. Η συγκέντρωση του μορίου μπορεί να αυξηθεί με την αφαίρεση μέρος του διαλύτη, προκειμένου να μειωθεί ο συνολικός όγκος του διαλύματος. Μια δεύτερη στρατηγική για την κατακρήμιση ενός μορίου είναι να μειωθεί η εγγενής του διαλυτότητα  $S^0$  για μια σταθερή συγκέντρωση του υλικού, μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία ή τροποποιώντας το διαλύτη (με αύξηση ή μείωση της ιοντικής ισχύς του διαλύματος). Η βέλτιστη διαλυτότητα πολυηλεκτρολυτών όπως πολυπεπίδια ή πολυνουκλεοτίδια εμπίπτει σε μια συγκεκριμένη περιοχή των συγκεντρώσεων αλάτων. Εάν η ιοντική ισχύς του διαλύματος αυξηθεί πέραν αυτής της περιοχής με την προσθήκη άλατος ή με εξάτμιση, ή μειωθεί κάτω από αυτήν με διαπίδυση, η εγγενής διαλυτότητα θα μειωθεί και το μόριο θα κατακρημνιστεί. Αυτές είναι οι τυπικές διαδικασίες εναλάτωσης (salting in) και εξαλάτωσης (salting out) που χρησιμοποιούνται σε πολλές τεχνικές καθαρισμού μορίων.

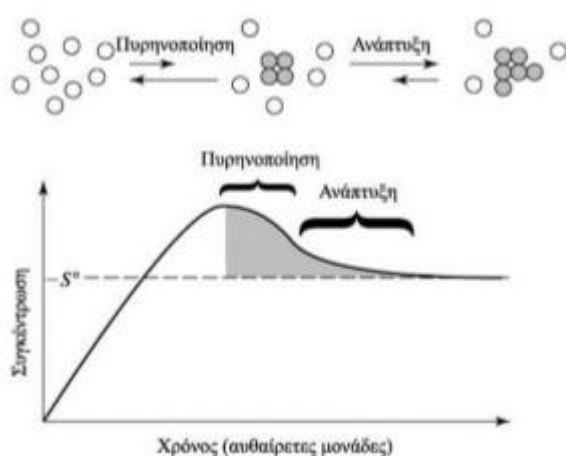
Υπάρχουν διάφοροι σημαντικοί παράγοντες, που επηρεάζουν την κρυστάλλωση ενός μορίου. Ο σημαντικότερος είναι η καθαρότητα του δείγματος. Ένα δείγμα θεωρείται ως βιοχημικά καθαρό, όταν κάθε μακρομόριο στο δείγμα έχει τον ίδιο μοριακό τύπο. Αυτή είναι η ιδανική κατάσταση και γενικά δεν επιτυγχάνεται. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένα μακρομόριο πρέπει να είναι περισσότερο από 95% καθαρό για να κρυσταλλωθεί. Ακόμη και ένα χημικά καθαρό δείγμα μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα ιδιαίτερα ετερογενή πληθυσμό διαμορφώσεων. Έτσι, τα διαλύματα και οι μέθοδοι κρυστάλλωσης επιλέγονται ώστε να διαμορφώσουν τη φυσική διαμόρφωση του μακρομορίου.

Η κρυστάλλωση ενός μακρομορίου απαιτεί την εύρεση συνθηκών που ισορροπούν τη διαλυτότητα με τη δομική ομοιογένεια, ενώ παραμένει δύσκολος ο προσδιορισμός των συγκεκριμένων συνθηκών κρυστάλλωσης ακόμα και αν είναι

γνωστές οι συνθήκες υπό τις οποίες ένα μακρομόριο έχει μια σταθερή στερεοδομή και είναι αδιάλυτο. Για αυτό το λόγο η εύρεση των συνθηκών κρυστάλλωσης είναι ουσιαστικά αποτέλεσμα εμπειρικών δοκιμών, που το μόριο τοποθετείται σε πλήθος διαφορετικών συνθηκών διαλύματος με στόχο την ανάπτυξη κρυστάλλου. [21]

Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου συμβαίνει σε δύο διακριτά βήματα, όπως φαίνεται και στην εικόνα :

- 1) ένα βήμα χαμηλής πιθανότητας για την πυρήνωση.
- 2) ένα βήμα υψηλής πιθανότητας για την αύξηση (ή διάδοση) του μεγέθους του κρυστάλλου.



Εικόνα 9: Ο μηχανισμός της κρυστάλλωσης. Το αρχικό βήμα είναι ο σχηματισμός κρυστάλλων ενός ελάχιστου κρυσταλλικού πλέγματος. Αυτό είναι ένα μικρής πιθανότητας βήμα που εμφανίζεται σε ένα υπέρκορο διάλυμα. Ο κρύσταλλος αναπτύσσεται με την προσθήκη μορίων στην επιφάνεια του πυρήνα. Αυτό συμβαίνει σε συγκέντρωση κοντά στην εγγενή διαλυτότητα  $S^0$  [21].

Το στάδιο της πυρήνωσης απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη. Η απαραίτητη οδηγός δύναμη για την πυρήνωση προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή αρκετά υψηλότερη από την εγγενή τους διαλυτότητα (υπερκορεσμός). 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 πυρήνωση είναι το σημαντικότερο από τα δύο βήματα, Εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, ο πυρήνας δε σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλαπλούς πυρήνες, που θα εξαντλήσουν γρήγορα τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μία



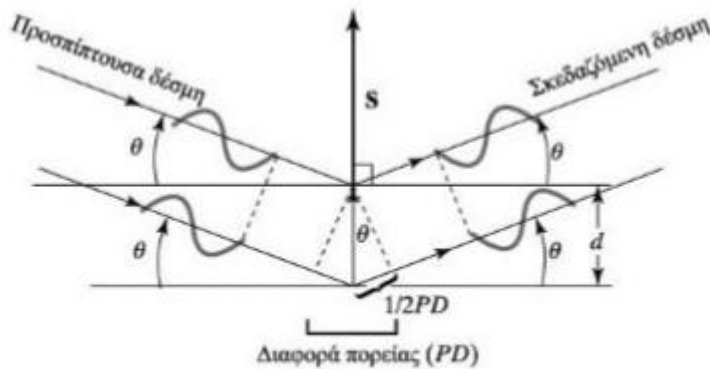
πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Πρέπει να υπάρξει μία ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν αρκούντως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παρέχουν υψηλής ευκρίνειας δεδομένα περίθλασης ακτίνων Χ. Άρα το διάλυμα των μακρομορίων πρέπει να συμπυκνωθεί με έναν πολύ καλά ελεγχόμενο τρόπο [21].

### 1.5.3 Η θεωρία της περίθλασης των ακτίνων Χ

Το μήκος της ακτινοβολίας των ακτίνων-Χ είναι κατάλληλο για τη διάκριση ατόμων σε απόσταση ομοιοπολικού δεσμού. Η ενέργεια ενός κβάντου αυτής της ακτινοβολίας είναι περίπου 8 keV, που είναι περίπου η ενέργεια των ηλεκτρονίων στα ατομικά τροχιακά τους. Αυτή η ισοδυναμία της ενέργειας οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις, έτσι ώστε τα ηλεκτρόνια ενός ατόμου να είναι πρώτιστα υπεύθυνα για τη σκέδαση των ακτίνων-Χ. Ο αριθμός των ηλεκτρονίων σε έναν δεδομένο όγκο του χώρου (η πυκνότητα των ηλεκτρονίων) καθορίζει, πόσο έντονα ένα άτομο σκεδάζει τις ακτίνες-Χ. Η συμβολή των σκεδαζόμενων ακτίνων-Χ οδηγεί στο γενικό φαινόμενο της περίθλασης. Το φαινόμενο της περίθλασης των ακτίνων-Χ, απαιτεί την παραδοχή της κυματικής φύσης της ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολίας. Οι γενικές θεωρίες και οι συνέπειες της περίθλασης ισχύουν για ακτινοβολίες οποιασδήποτε ενέργειας. Η εφαρμογή της περίθλασης στο ορατό φως χρησιμοποιείται συχνά για να επεξηγηθούν οι αρχές που διέπουν την περίθλαση των ακτίνων-Χ από ένα κρύσταλλο. Η σκέδαση αναφέρεται απλά στην ικανότητα των αντικειμένων να αλλάζουν την κατεύθυνση ενός κύματος. Στην περίπτωση του ορατού φωτός, το απλούστερο παράδειγμα είναι η ανάκλαση από ένα κάτοπτρο. Το κάτοπτρο αλλάζει απλώς την κατεύθυνση των φωτεινών κυμάτων. Μη ανακλώντα αντικείμενα μπορούν επίσης να σκεδάσουν τα φωτεινά κύματα. Ένα αντικείμενο που τοποθετείται στην πορεία μια φωτεινής δέσμης, προερχόμενης από μια σημειακή πηγή, δεν μπορεί να σχηματίσει σκιά με σαφή όρια, λόγω της σκέδασης από τις ακμές του. Η προέλευση της σκέδασης μπορεί να αναλυθεί καλύτερα με αφετηρία την αρχή του Huygen, η οποία δηλώνει ότι κάθε σημείο ενός μετώπου κύματος μπορεί να θεωρηθεί ως πηγή ενός νέου μετώπου κύματος. Η ταχύτητα αυτού του νέου μετώπου κύματος είναι ίση με αυτή του αρχικού. Για ένα ανεμπόδιο μέτωπο κύματος, το δευτερογενές μέτωπο μπορεί να κατασκευαστεί σχεδιάζοντας κύκλους ακτίνας  $r=vt$  (όπου  $v$  είναι η ταχύτητα του κύματος και  $t$  είναι ο χρόνος) σε σημεία επί του αρχικού μετώπου και μετά συνδέοντας τις εφαπτόμενες σε κάθε έναν από αυτούς τους κύκλους. Αντικείμενα που τοποθετούνται στην πορεία ενός μετώπου κύματος, ενεργούν ως σημεία διάδοσης για τα νέα μέτωπα. Το εντελώς νέο μέτωπο κύματος, που προκύπτει από αυτά, καλείται σκεδαζόμενο κύμα [21].

### 1.5.4 Ο Νόμος του Bragg

Το 1912, ο W. L. Bragg ανέπτυξε μια απλή σχέση για να εξηγήσει, το πώς η περίθλαση σχετίζεται με τις γενικές θέσεις των σημειακών αντικειμένων στον χώρο. Για την παραγωγή του νόμου του Bragg για την περίθλαση, αρχικά απλοποιήθηκε το εννοιολογικό μοντέλο της περίθλασης, θεωρώντας τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος βρίσκονται σε οικογένειες παράλληλων επιπέδων. Ένα απλό μοντέλο μονοδιάστατου κρυστάλλου προκύπτει από τη στοίβαξη διαδοχικών παράλληλων ανακλώντων επιπέδων σε ίσες αποστάσεις  $d$  (εικόνα 10). Σε αυτό το μοντέλο, ένα κύμα ακτίνων-Χ (με μήκος κύματος  $\lambda$ ) προσπίπτει στα ανακλώντα υπό γωνία  $\theta$ . Η ανάκλαση από τα επίπεδα σκεδάζει το κύμα υπό την ίδια γωνία [21].



Εικόνα 10 : Ο νόμος του Bragg για την περίθλαση. Μια δέσμη ακτίνων-Χ προσπίπτει σε μια περιοδική διάταξη ανακλώντων επιπέδων υπό γωνία  $\theta$  και ανακλάται υπό την ίδια γωνία. Η ενισχυτική συμβολή των ανακλώμενων ή σκεδαζόμενων ακτίνων-Χ συμβαίνει, όταν η διαφορά πορείας  $PD$  μεταξύ των ανακλώμενων δεσμών από διαδοχικά επίπεδα (σε απόσταση  $d$  μεταξύ τους) είναι ίση με το ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος. Το διάνυσμα σκέδασης  $S$  είναι κάθετο στα ανακλώντα επίπεδα και το μέτρο του είναι ίσο με το αντίστροφο της απόστασης μεταξύ των επιπέδων ανάκλασης. [21]

Η απόσταση του σημείου παρατήρησης είναι πολύ μεγάλη έναντι του  $d$ , ώστε οι ανεξάρτητες διαδρομές του σκεδαζόμενου φωτός θα είναι ουσιαστικά παράλληλες. Επειδή υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός επιπέδων, παρατηρείται ενισχυτική συμβολή μόνο όταν τα ανακλώμενα κύματα είναι ακριβώς εν φάσει (κορυφές κυμάτων που ευθυγραμμίζονται με κορυφές, κόμβοι με κόμβους, και κοιλάδες με κοιλάδες). Αυτή η συνθήκη ικανοποιείται, μόνο όταν η διαφορά μεταξύ του μήκους διαδρομής του προσπίπτοντος και του ανακλώμενου κύματος,  $PD$ , είναι ίση με ακέραιο ( $n$ ) πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ακτίνων-Χ .

$$PD = n\lambda \quad (1)$$

Αυτή η διαφορά στα μήκη των διαδρομών συσχετίζεται με την απόσταση που χωρίζει τα ανακλώντα επίπεδα με την απλή τριγωνομετρική σχέση,

$$\frac{1}{2} PD = d \sin \theta \quad (2)$$

Αντικαθιστώντας την εξίσωση (2) στην (1), παράγεται ο νόμος του Bragg για την περίθλαση

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (3) \quad \eta \quad 2 \sin \theta / \lambda = n/d \quad (4)$$

Αυτή η απλή σχέση διατυπώνει δύο θεμελιώδεις προτάσεις σχετικά με τις ιδιότητες της περίθλασης. Καταρχήν, από την εξίσωση (3) αποδεικνύεται ότι οι γωνίες στις οποίες παρατηρείται η περίθλαση είναι κβαντισμένες για ακέραιες τιμές του  $n$  (0,1,2,...). Για έναν στοίχο άπειρων σκεδαστών, η μόνη προϋπόθεση για να παρατηρηθεί μια ανάκλαση, είναι να ικανοποιείται ο νόμος του Bragg. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η σκεδαζόμενη ακτινοβολία εκμηδενίζεται. Δεύτερον, υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της γωνίας Bragg ( $\theta$ ) και της ισαπόστασης μεταξύ των ανακλώντων επιπέδων ( $d$ ). Αυτό σημαίνει ότι μεγαλύτερες αποστάσεις μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μονάδων σε ένα κρύσταλλο οδηγούν σε μικρότερες γωνίες περίθλασης [21].

### 1.5.5 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου

Η ποιότητα του υπολογιζόμενου χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας εξαρτάται πολύ από την ποιότητα των πειραματικών δεδομένων και από το μοντέλο. Η ποιότητα των δεδομένων δεν μπορεί να αλλαχθεί, εκτός και εάν πραγματοποιηθεί ανάπτυξη νέων κρυστάλλων και συλλεχθούν καλύτερα δεδομένα περίθλασης. Εντούτοις, είναι δυνατή η βελτίωση του μοντέλου με βελτιστοποίηση της δομής, ώστε να ταιριάζει καλύτερα με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Σε αυτή την διαδικασία βελτιστοποίησης, το μοντέλο υποβάλλεται σε μικρές αλλαγές για την βελτίωση των λεπτομερειών του. Το μοντέλο αυτό θα μπορούσε να προσαρμοστεί οπτικά στους υπολογιζόμενους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Υπάρχει όμως ένα πρόβλημα με τους υπολογιζόμενους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας από παράγοντες δομής που προέρχονται από τις παρατηρηθείσες έντασεις. Μόνο το  $|F(S)_{obs}|$  μπορεί να προσδιοριστεί από τα δεδομένα έντασης. Οι πληροφορίες φάσεων μπορούν να υπολογιστούν μόνο από το μοντέλο,  $F(S)_{calc}$ . Αυτό σημαίνει ότι το μοντέλο επηρεάζει έντονα τους χάρτες, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

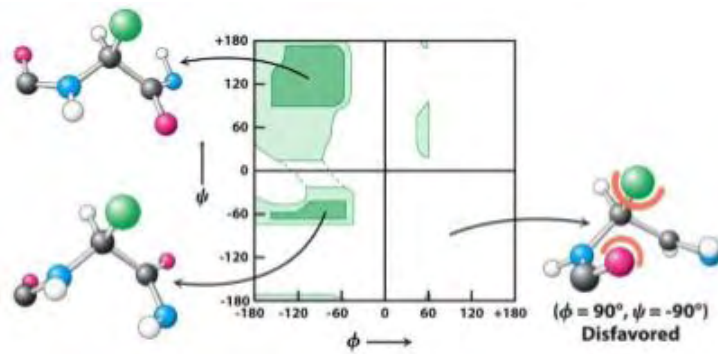
Ένα αντικειμενικότερο κριτήριο για την αξιολόγηση του πόσο καλά ένα μοντέλο συμφωνεί με τα δεδομένα είναι ο δείκτης αξιοπιστίας  $R$  (ή παράγοντας  $R$ ):

$$R = \frac{\sum |F(S)_{obs}| - |F(S)_{calc}|}{\sum |F(S)_{obs}|}$$

Σε αυτήν την περίπτωση, συγκρίνονται μόνο τα μέτρα των μετρηθέντων και υπολογισθέντων παραγόντων δομής. Γενικά, οι δείκτες αξιοπιστίας R κυμαίνονται μεταξύ του 70% (0.7) για ένα τυχαίο «ταίριασμα» και μίας τιμής που πλησιάζει το 0% για ένα ιδανικό τέλειο ταίριασμα. Ένα ιδανικό ταίριασμα δεν είναι επιτεύξιμο, πρώτιστα λόγω των εγγενών περιορισμών στην ποιότητα των δεδομένων και των ατελειών στον κρύσταλλο. Ένας γενικός κανόνας για τα μακρομόρια είναι, ότι ένα μοντέλο μπορεί να προταθεί ως μια λύση στη δομή, όταν η βελτιστοποίηση φθάσει ως έναν παράγοντα R 20% (0,2) ή χαμηλότερο. Για να επιτευχθεί αυτό το επίπεδο σχηματισμού μεταξύ του μοντέλου και των δεδομένων, πρέπει να ορισθεί με ακρίβεια η δομή του μακρομορίου μαζί με ένα μεγάλο ποσοστό του διαλύτη. Είναι διαθέσιμα διάφορα αντικειμενικά κριτήρια για την αξιολόγηση της ποιότητας των προκυπτόντων μοντέλων. Πρόσφατα, οι κρυσταλλογράφοι έχουν αναγνωρίσει την ανάγκη ύπαρξης ενός μέτρου αξιολόγησης της συμβατότητας του μοντέλου, χωρίς αυτό να προκαταλαμβάνεται από το ίδιο μοντέλο. Η προσέγγιση που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η εξής: Αρχικά διαχωρίζεται ένα μέρος (περίπου 5% έως 10%) από τα συνολικά πειραματικά δεδομένα για να χρησιμοποιηθεί ως σετ δεδομένων ελέγχου. Το μοντέλο βελτιστοποιείται μόνο ως προς τα υπόλοιπα δεδομένα (σετ δεδομένων εργασίας). Κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης του μοντέλου, ο παράγοντας R υπολογίζεται τόσο για το σετ δεδομένων εργασίας όσο και για το σετ ελέγχου. Ο δεύτερος παράγοντας R καλείται  $R_{free}$ , αναγνωρίζοντας ότι θα πρέπει να είναι απαλλαγμένος από την επίδραση του μοντέλου. Εάν κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης το μοντέλο βελτιώνεται πραγματικά (αντικειμενικά), τότε ο  $R_{free}$ , θα πρέπει να συνεχίσει να μειώνεται. Από κάποιο σημείο, ωστόσο, ο  $R_{free}$  θα πάψει να μειώνεται και ακόμα και αν η περαιτέρω βελτιστοποίηση ή οι προσθήκες στο μοντέλο μειώνουν τον παράγοντα R των δεδομένων εργασίας, το μοντέλο θεωρείται ότι έφθασε πλέον το επίπεδο ποιότητας που του επιτρέπουν τα δεδομένα. Με περαιτέρω προσθήκες στο μοντέλο, ο  $R_{free}$  μπορεί όντως να αρχίσει να αυξάνεται, ακόμη και όταν ο R για το σετ δεδομένων εργασίας αρχίζει να μειώνεται. Αυτό μαρτυρά, ότι τα δεδομένα είναι πλέον υπερπροσαρμοσμένα (περισσότερες μεταβλητές από ότι τα δεδομένα επιτρέπουν) [21].

### 1.5.6 Διάγραμμα Ramachandran

Μετά την βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου, απαιτείται έλεγχος του έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ο N. G. Ramachandran, διαπίστωσε ότι πολλοί συνδυασμοί  $\phi$  και  $\psi$  γωνιών δεν είναι δυνατοί λόγω των στερικών συγκρούσεων μεταξύ των ατόμων. Οι τιμές που επιτρέπονται μπορούν να τοποθετηθούν σε ένα δισδιάστατο σχήμα που ονομάζεται διάγραμμα Ramachandran (Εικόνα 11) [21].



Εικόνα 11 : Ένα διάγραμμα Ramachandran που δείχνει τις γωνίες  $\phi$  και  $\psi$ . Οι τιμές  $\phi$  και  $\psi$  είναι περιορισμένες λόγω των συγκρούσεων μεταξύ των ατόμων. Οι επιτρεπτές τιμές  $\phi$  και  $\psi$  φαίνονται με σκούρο πράσινο, ενώ οι οριακές τιμές φαίνονται με ανοιχτό πράσινο. Η δομή που φαίνεται δεξιά είναι εκείνη που δημιουργεί τις λιγότερες συγκρούσεις μεταξύ των ατόμων. [21]

### 1.5.7 Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X αποκαλύπτει την τρισδιάσταση δομή σε ατομικό επίπεδο

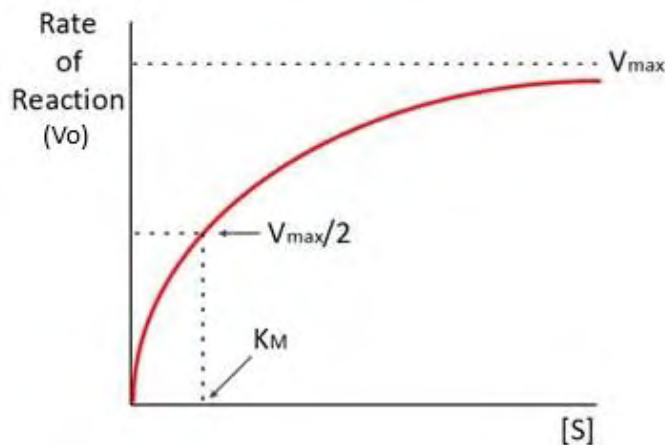
Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X παρέχει πληροφορίες για την πρωτεϊνική δομή με τη μεγαλύτερη δυνατή ευκρίνεια. Με την τεχνική αυτή αποκαλύπτεται η λεπτομερής τοποθέτηση των περισσότερων ατόμων του πρωτεϊνικού μορίου στον χώρο. Η χρήση των ακτίνων X δίνει την καλύτερη ευκρίνεια διότι το μήκος κύματος των ακτίνων βρίσκεται περίπου στο επίπεδο του μήκους κύματος του ομοιοπολικού δεσμού. Τα τρία βασικά συστατικά της ανάλυσης με ακτίνες X είναι: ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος, μια πηγή ακτίνων X και ένας ανιχνευτής. Η τεχνική απαιτεί όλα τα μόρια της πρωτεΐνης να έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και για αυτό το πρώτο στάδιο της έγκειται στην επιτυχή κρυστάλλωση της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια απαιτείται μια πηγή ακτίνων X. Η δέσμη ακτίνων X μήκους κύματος 1,54 Å παράγεται από ηλεκτρόνια που επιταχύνονται προς ένα στόχο χαλκού. Μια στενή δέσμη ακτίνων X προσκρούει στον πρωτεϊνικό κρύσταλλο. Μέρος της περνά τον κρύσταλλο, ενώ το υπόλοιπο σκεδάζεται προς διάφορες κατευθύνσεις. Τελικά, η δέσμη που σκεδάζεται, ή περιθλάται, μπορεί να ανιχνευθεί σε φιλμ ακτίνων X, του οποίου το μαύρισμα είναι ανάλογο της έντασης των ακτίνων X, ή από ένα ηλεκτρονικό ανιχνευτή στερεάς κατάστασης. Ο τρόπος σκέδασης προσφέρει πολλές πληροφορίες για τη δομή της πρωτεΐνης.

Ο κρύσταλλος της πρωτεΐνης τοποθετείται σε ένα τριχοειδή σωλήνα και παίρνει ένα συγκεκριμένο προσανατολισμό σε σχέση με τις ακτίνες X και τα φιλμ. Ο κρύσταλλος περιστρέφεται έτσι ώστε η δέσμη ακτίνων X να προσκρούει σε πολλά σημεία του κρυστάλλου. Η μεταπτωτική αυτή κίνηση του κρυστάλλου έχει ως αποτέλεσμα μία φωτογραφία με ακτίνες X που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες σειρές σημείων που λέγονται ανακλάσεις. Η ένταση κάθε

σημείου μπορεί να μετρηθεί. Αυτές οι εντάσεις και οι θέσεις τους είναι τα βασικά πειραματικά δεδομένα μιας κρυσταλλογραφικής ανάλυσης με ακτίνες Χ. Το επόμενο βήμα είναι η ανασύνθεση της εικόνας της πρωτεΐνης από τις παρατηρούμενες εντάσεις. Η εικόνα σχηματίζεται μετά από μια μαθηματική ανάλυση που λέγεται μετασχηματισμός Fourier. Επομένως τώρα μπορούν να γίνουν οι υπολογισμοί ενός χάρτη πυκνότητας ηλεκτρονίων, που δίνει την πυκνότητα των ηλεκτρονίων για έναν μεγάλο αριθμό σημείων σε τακτές αποστάσεις στον κρύσταλλο. Αυτή η τρισδιάστατη κατανομή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας αντιπροσωπεύεται από μια σειρά παράλληλων τομών που τοποθετούνται η μία πάνω στην άλλη. Το επόμενο βήμα είναι η ανάλυση του χάρτη πυκνότητας ηλεκτρονίων. Ένας βασικός παράγοντας είναι η διακριτική ικανότητα των ακτίνων Χ που καθορίζεται από τον αριθμό των περιθλώμενων εντάσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη σύνθεση Fourier. Η απόλυτη αναλυτική ικανότητα μιας ανάλυσης με ακτίνες Χ καθορίζεται από τον βαθμό τελειότητας ενός κρυστάλλου. Για τις πρωτεΐνες το όριο ανάλυσης συνήθως είναι περίπου 2 Å. [21]

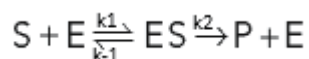
### **1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων**

Η πρωταρχική λειτουργία των ενζύμων είναι να αυξάνουν τις ταχύτητες των αντιδράσεων, έτσι ώστε να είναι συμβατές με τις ανάγκες του οργανισμού. Για πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης  $V_0$ , η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο, μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, [S]. Η ταχύτητα της κατάλυσης αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος και στη συνέχεια αρχίζει να σταθεροποιείται και να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Πριν από περίπου 100 χρόνια οι Michaelis και Menten δημοσίευσαν την, πολύ διαδεδομένη πλέον, κλασική δημοσίευση, μέσα από την οποία έδειξαν ότι ο ρυθμός μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten, είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, όπως δείχνεται και από την εξίσωση Michaelis-Menten, χρησιμοποιώντας της ιμπερτάση ως ένζυμο για τις μελέτες τους [22].



Εικόνα 12 : Διάγραμμα της ταχύτητας  $V_0$  μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten, όπου δείχνεται ότι η μέγιστη ταχύτητα  $V_{max}$  προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά  $K_M$  είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας  $V_{max}/2$ .

Το μοντέλο που προτάθηκε το οποίο είναι το απλούστερο που εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων, είναι :



Όπου:

$k_1, k_2, k_{-1}$  : οι σταθερές ταχύτητας των αντίστοιχων αντιδράσεων

S: υπόστρωμα

ES: σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P: προϊόν

Για να απλοποιηθούν τα πράγματα χρησιμοποιείται η υπόθεση της σταθεροποιημένης κατάστασης (steady state). Στη σταθερή κατάσταση οι συγκεντρώσεις των ενδιάμεσων, στην περίπτωση αυτή το ES, παραμένουν σταθερές, ενώ οι συγκεντρώσεις των αρχικών ενώσεων και των προϊόντων αλλάζουν.

Οι Michaelis και Menten κατέληξαν στη μαθηματική σχέση

$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Όπου  $V_0$ : η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

$V_{max}$  : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Η μέγιστη ταχύτητα  $V_{max}$  αποκαλύπτει τον ρυθμό μετατροπής ενός ενζύμου, ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Η μέγιστη ταχύτητα,  $V_{max}$ , ισούται με την κινητική σταθερά  $k_2$ , η οποία ονομάζεται και  $k_{cat}$ .

$K_M$ : σταθερά Michaelis Menten που ορίζεται ως  $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

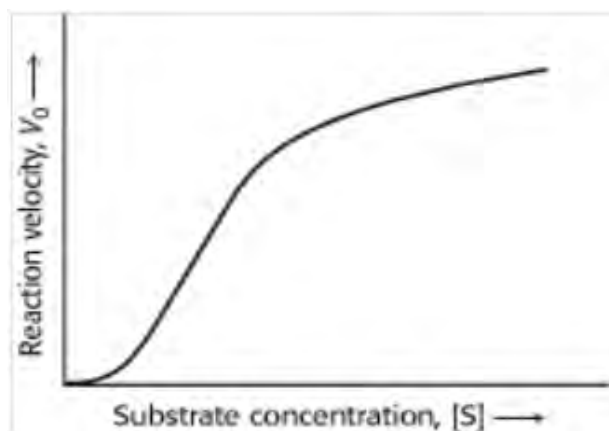
Επισημαίνεται ότι η  $K_M$  έχει μονάδες συγκέντρωσης. Είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αλληλεπιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος. Όταν  $[S]=K_M$ , τότε  $V_0=V_{max}/2$ . Έτσι η  $K_M$  είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η  $[S]$  είναι πολύ μικρότερη από την  $K_M$ ,  $V_0 = (V_{max}/K_M)/[S]$ , δηλαδή η ταχύτητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η  $[S]$  είναι πολύ μεγαλύτερη από την  $K_M$ ,  $V_0=V_{max}$ , δηλαδή η ταχύτητα είναι μέγιστη, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του υποστρώματος [8].

### 1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα και κινητικές μελέτες

Οι κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων δεν μπορούν να εξηγηθούν με το μοντέλο Michaelis-Menten. Μια σημαντική ομάδα ενζύμων τα οποία δεν υπακούουν στην κινητική Michaelis-Menten περιλαμβάνει τα αλλοστερικά ένζυμα. Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες και πολλαπλά ενεργά κέντρα. Τα αλλοστερικά κέντρα εμφανίζουν συχνά σιγμοειδείς γραφικές παραστάσεις της ταχύτητας της αντίδρασης και  $V_0$  σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , παρά ορθογώνιες υπερβολές που προβλέπονται από την εξίσωση Michaelis-Menten. Στα αλλοστερικά ένζυμα, η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες των άλλων ενεργών κέντρων στο ίδιο μόριο. Ένα πιθανό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής μεταξύ υπομονάδων είναι ότι η πρόσδεση του υποστρώματος γίνεται συνεργειακά, δηλαδή, η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο διευκολύνει την πρόσδεση στα άλλα ενεργά κέντρα. Από τέτοια συνεργειακότητα προκύπτει μια σιγμοειδής γραφική παράσταση της  $V_0$  σε συνάρτηση με το  $[S]$ . Επιπλέον, η δραστηριότητα των αλλοστερικών ενζύμων μπορεί να μεταβληθεί από ρυθμιστικά μόρια που προσδέονται αντιστρεπτά σε ειδικές περιοχές, διαφορετικές από τα καταλυτικά κέντρα. Με τον τρόπο αυτό οι καταλυτικές ιδιότητες των



αλλοστερικών ενζύμων μπορούν να ρυθμιστούν για να αντιμετωπιστούν οι άμεσες ανάγκες ενός κυττάρου. Για τον λόγο αυτό, τα αλλοστερικά ένζυμα είναι οι καθοριστικοί ρυθμιστές στις μεταβολικές πορείες του κυττάρου [8].



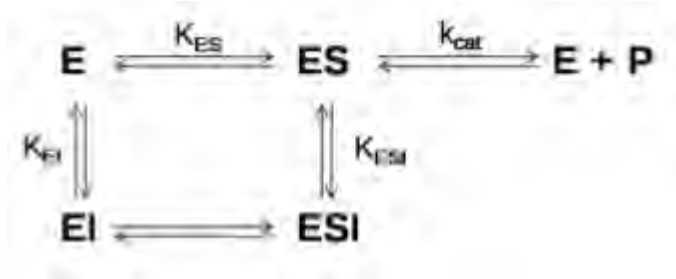
Εικόνα 13 : Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου. Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν σιγμοειδή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

### 1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Μερικοί μη αντιστρεπτοί αναστολείς είναι πολύ σπουδαία φάρμακα. Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από ένα ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδέσει υπόστρωμα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI) αλλά όχι και τα δύο (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ως εκ τούτου το υπόστρωμα εμποδίζεται από το να προσδεθεί στο ίδιο ενεργό κέντρο. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Σε μια οποιαδήποτε συγκέντρωση του αναστολέα, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το υπόστρωμα συναγωνίζεται τον αναστολέα για το ενεργό κέντρο. Στη συναγωνιστική αναστολή η  $V_{max}$  παραμένει ανεπηρέαστη, αλλά η φαινομενική  $K_M$  αυξάνεται.

Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου σε

διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Στην περίπτωση αυτή η  $K_M$  παραμένει σταθερή ενώ η  $V_{max}$  μειώνεται.



Εικόνα 14 : Διάγραμμα αναστολής ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Τα  $K_{ES}$ ,  $K_{EI}$ ,  $K_{ESI}$ , αποτελούν τις σταθερές διάστασης. Το ESI θεωρείται ότι είναι ανενεργό. [23]

Η εξίσωση Michaelis-Menten δίνεται από τη σχέση:  $V_o = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$

Αν γραφεί με τη μέθοδο του διπλού αντιστρόφου τότε προκύπτει:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V} \frac{1}{S} + \frac{1}{V}$$

Η σταθερά Michaelis-Menten  $K_M$  προσδιορίζεται συνήθως με τη μέθοδο των Lineweaver και Burk. Η σχέση περιγράφει την ευθεία η οποία λαμβάνεται από τη γραφική παράσταση των Lineweaver-Burk, και η οποία προκύπτει εάν παραστήσουμε γραφικά τις τιμές  $1/V$  στον άξονα των τεταγμένων και  $1/[S]$  στον άξονα των τετμημένων. Η κλίση της ευθείας ισούται με  $K_M/V_{max}$ . Το σημείο στο οποίο η ευθεία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων ισούται με  $1/V_{max}$  και το σημείο στο οποίο τέμνει τον άξονα των τετμημένων ισούται με  $-1/K_M$ .

Η σταθερά αναστολής  $K_i$ , δηλαδή η σταθερά ισορροπίας μεταξύ του ενζύμου και ενός συναγωνιστικού αναστολέα που συνδέεται με αντιστρεπτό τρόπο, υπολογίζεται βασιζόμενοι στις εξίσωση των Michaelis-Menten για ένα συναγωνιστικό σύστημα:

$$V = 1 + \frac{V S}{K_M \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) + S} \quad \text{Εξίσωση A}$$

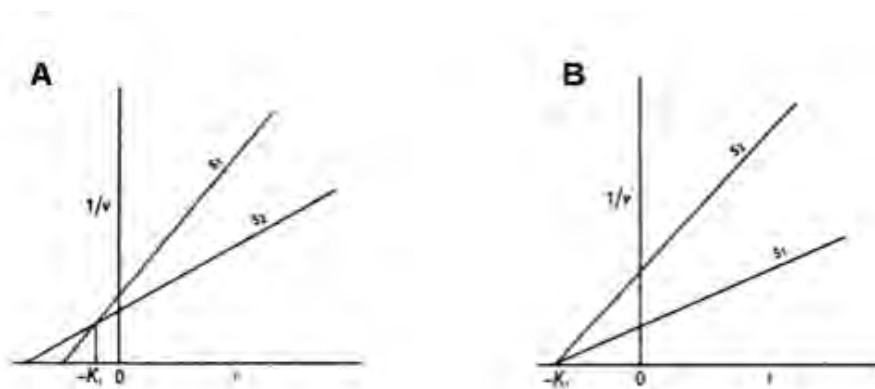
Όπου  $[i]$  η συγκέντρωση του αναστολέα

Για τον υπολογισμό της  $K_i$  υπάρχει μια απλή μέθοδος μέσω γραφικών παραστάσεων. Εάν σχεδιαστεί διάγραμμα  $1/v$  προς  $[i]$ , διατηρώντας τη

συγκέντρωση του υποστρώματος σταθερή, παρατηρείται ότι δημιουργείται μια ευθεία γραμμή. Εάν σε ένα διάγραμμα με τον ίδιο τρόπο απεικονιστούν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, οι γραμμές θα τέμνονται σε ένα σημείο αριστερά του κάθετου άξονα όπως φαίνεται στην εικόνα, με το σημείο τομής στον άξονα χ να προσδιορίζει την τιμή  $-K_i$ .

Κάθε γραμμή σύμφωνα με την εξίσωση A παίρνει τη μορφή:

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{VS} + \frac{1}{V} + \frac{Km}{VS} \frac{i}{Ki} \quad \text{Εξίσωση B}$$



Εικόνα 15: Α. Προσδιορισμός  $K_i$  σε συναγωνιστική αναστολή, Β. Προσδιορισμός  $K_i$  σε μη συναγωνιστική αναστολή. [18]

Στο σημείο της διασταύρωσης το  $1/v$  και το  $[i]$  όπως επίσης και η  $V_{max}$  θα είναι ίδια και για τις δύο γραμμές, όταν πρόκειται για συναγωνιστική αναστολή. Άρα:

$$\frac{Km}{S1} + 1 + \frac{Km}{S1} \frac{i}{Ki} = \frac{Km}{S2} + 1 + \frac{Km}{S2} \frac{i}{Ki} \quad \text{ή} \quad \frac{1}{S1} \left(1 + \frac{i}{Ki}\right) = \frac{1}{S2} \left(1 + \frac{i}{Ki}\right)$$

Τα παραπάνω μπορούν να ισχύουν μόνο αν  $[S1] = [S2]$  ή  $[i] = -K_i$

Στην περίπτωση της μη-συναγωνιστικής αναστολής, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της Εικόνα ..B, οι γραμμές δεν διασταυρώνονται, αλλά συναντώνται σε ένα σημείο που δίνει ξανά την τιμή  $-K_i$ . Αυτό φαίνεται εύκολα ορίζοντας ότι  $1/V = 0$  στην μη-συναγωνιστική εξίσωση. Οπότε προκύπτει:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{Km}{S}\right) \left(1 + \frac{i}{Ki}\right)$$

[24]

## Σκοπός

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μία μεταβολική διαταραχή που επηρεάζει την υγεία εκατομμυρίων ανθρώπων. Τα φάρμακα που χορηγούνται σήμερα, στοχεύουν κυρίως στη βέλτιστη αξιοποίηση της γλυκόζης από τα κύτταρα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι το κύριο ρυθμιστικό ένζυμο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, καταλύοντας τον καθοριστικό βήμα της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ με φωσφορόλυση και είναι άμεσα υπεύθυνη για τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα [8]. Στους ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη η γλυκογονόλυση είναι μια σημαντική πηγή γλυκόζης και αυξάνει περαιτέρω τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Έτσι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, αποτελεί μοριακό στόχο για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων και οι αναστολείς της θεωρούνται ως δυνητικοί αντιδιαβητικοί παράγοντες [16]. Έχουν αναγνωριστεί 6 διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου [1]. Οι μελέτες που γίνονται έχουν ως στόχο την εύρεση αναστολέων που θα προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο. Αυτοί είναι κυρίως ανάλογα γλυκόζης που σχεδιάσθηκαν με βάση την αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου, με τη χρήση κατάλληλων λογισμικών, ώστε να αυξηθούν οι ειδικές αλληλεπιδράσεις στο καταλυτικό κέντρο [25]. Οι αναστολείς θα πρέπει να μιμούνται τη δράση της γλυκόζης και να δρουν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτοί ως φαρμακευτικά προϊόντα). Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με  $K_i \approx 1$   $\mu$ M, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης. Η παρούσα διπλωματική επιδιώκει τη μελέτη του βαθμού αναστολής που έχουν δύο αναστολείς, που αποτελούν ανάλογα γλυκόζης, στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Αυτό καθίσταται δυνατό μέσω κινητικών και δομικών μελετών [26].

Παρόλο που πρωταρχικός στόχος για την ανακάλυψη των αναστολέων της GP είναι η ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση (hGPb), το μεγαλύτερο μέρος των μελετών έγινε σε φωσφορυλάση από μύες κονίκλων (rmGPb), λόγω της διαθεσιμότητάς της και της ιδιότητας να παράγει κρυστάλλους καλής ποιότητας. Οι διαφορές στη λειτουργικότητα μεταξύ της ηπατικής και της μυϊκής φωσφορυλάσης προκύπτουν από διαφορές στην επιφάνεια των υπομονάδων και όχι από αλλαγές σε κατάλοιπα που συνδέονται οι προσδέτες. Δεν υπάρχουν εισαγωγές ή διαγραφές στην αλληλουχία της hGPb συγκριτικά με τη rmGPb, εκτός από τις διαφορές σε 171 αμινοξέα. Ωστόσο, το 49% των αμινοξέων (85 αμινοξέα) είναι συντηρημένα και οι περισσότερες από τις αλλαγές είναι λειτουργικά ουδέτερες. Τα ενεργά κέντρα της rmGPb και της hGPb είναι ταυτόσημα, τόσο στην αλληλουχία αμινοξέων όσο και στη δομή τους. Επομένως, τα συμπεράσματα που εξάγονται από δομικές μελέτες στην rmGPb ισχύουν και για την hGPb [1].

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρία
Acetic acid (CH <sub>3</sub> COOH)	Sds
α-D-Glucose 1-Phosphate Dipotassium Salt hydrate	Sigma
Acrylamide	Serva
Activated Charcoal	Sigma
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma
Adenosine Triphosphate (ATP)	Sigma
Ammonium Molybdate	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Ammonium sulfate	ChemLab
Ampicillin	Serva
BES	Sigma
Bis acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay 5x	Biorad
Bromophenole blue	Research Organics
Calcium Chloride Dehydrate (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Imidazole 99%	Sigma
Imidazole BioUltra	Sigma
Inosine Monophosphate (IMP)	Sigma
KHCO <sub>3</sub>	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
LB-Agar	Serva
Magnesium acetate tetrahydrate (CH <sub>3</sub> COOH) <sub>2</sub> Mg	Applichem
Magnesium Chloride anhydrous (MgCl <sub>2</sub> )	Alfa Aesar
Manganese (II) Chloride (MnCl <sub>2</sub> )	Sigma
Methanol	Scharleu
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaCl	Scharleu
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck

NaOH	Merck
PMSF	AppliChem
Potassium chloride (KCl)	Merck
Pyridoxine	Sigma
SDS	Serva
Sodium carbonate anhydrous	Sds
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Spermine	Sigma
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra Pure	Appllichem
Tryptone	Serva
Yeast extract	Serva
Zinc acetate	Sigma
$\alpha$ -D-glucose-1-Phosphate	Sigma
$\beta$ -GP	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Πυκνό διάλυμα αμμωνίας	Fluka
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck

## 2.2 Οργανολογία

Όργανο	Εταιρεία
Φυγόκεντρος - Z36HK	HermLe
Πεχάμετρο	Metrohm
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρηση (mini gel)	BioRad
Υδατόλουτρο, WiseBath	Wisd
Φωτόμετρο	VWR
ÄKTA Purifier (FPLC)	GE Healthcare Life Sciences
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.45 $\mu$ M	Sartorius Stedim
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.2 $\mu$ M	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 30000 cut-off	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 10000 cut0off	Sartorius Stedim
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Σύστημα απεικόνισης	Protein Simple

## 2.3 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

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

hIGP	Eurofin
------	---------

## 2.4 Στήλες υγρής χρωματογραφίας

Στήλες συγγένεια	Εταιρεία
His-Trap (Ni <sup>2+</sup> Sepharose) υψηλής απόδοσης (HP)	GE Healthcare
Στήλες Ιοανταλλαγής	Εταιρεία
Resource Q	GE Healthcare

## 2.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Η δυνατότητα εισαγωγής συγκεκριμένων πλασμιδιακών μορίων DNA σε κύτταρα γίνεται με τη μέθοδο που ονομάζεται μετασχηματισμός. Υπάρχουν τέσσερα συστήματα μετασχηματισμού βακτηριακών κυττάρων τα οποία είναι η ηλεκτροδιάτρηση, η βαλλιστική μέθοδος, ο μετασχηματισμός με υπερήχους και ο χημικός μετασχηματισμός [27].

### 2.5.1 Χημικός μετασχηματισμός

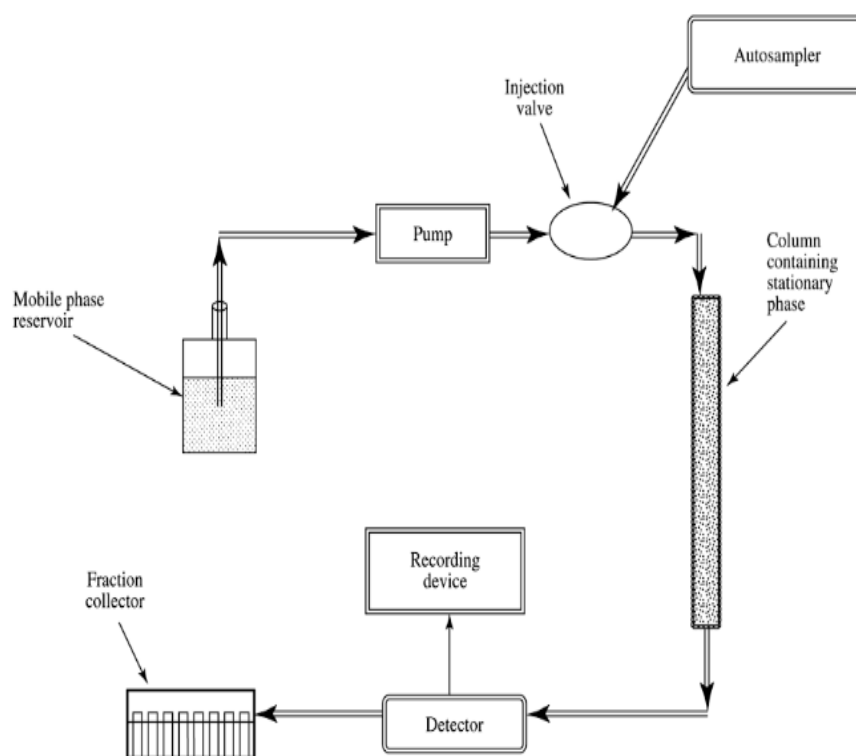
Έχουν αναπτυχθεί αρκετές χημικές μέθοδοι για το μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι μετασχηματισμού σήμερα είναι η κατεργασία με CaCl<sub>2</sub> και PEG (πολυαιθυλική γλυκόλη). Στο χημικό μετασχηματισμό με CaCl<sub>2</sub> τα επεξεργασμένα δεκτικά κύτταρα με CaCl<sub>2</sub>, επωάζονται με το πλασμίδιο σε θερμοκρασία 0 °C και στη συνέχεια για μικρή διάρκεια σε θερμοκρασία 42 °C (θερμικό σοκ). Το θερμικό αυτό σοκ προκαλεί εκπόλωση της μεμβράνης των δεκτικών κυττάρων που έχουν επεξεργαστεί με CaCl<sub>2</sub>, ώστε το πλασμίδιο να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου. Στη συνέχεια η μεταφορά των κυττάρων σε θερμοκρασία 4 °C εξασφαλίζει ότι η κυτταρική μεμβράνη θα επανέλθει στην αρχική της κατάσταση με αποτέλεσμα το πλασμιδιακό DNA που εισήχθη να παραμείνει στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου [27].

## 2.6 Υγρή χρωματογραφία-Σύστημα FPLC

Ο όρος χρωματογραφία προέρχεται από τις λέξεις «χρώμα» και «γράφειν». Η τεχνική χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τον Tswett το 1903 για το διαχωρισμό φυτικών χρωστικών και τώρα βρίσκει εφαρμογή σε όλα τα χημικά είδη. Εξαιτίας, του μεγάλου εύρους του μεγέθους, του σχήματος και της υδροφοβικότητας που έχει βρεθεί στα βιομόρια, έχουν αναπτυχθεί πολλές χρωματογραφικές τεχνικές κατάλληλες για την κάθε περίπτωση [28]. Η χρωματογραφία περιλαμβάνει μια ποικιλία τεχνικών που διαχωρίζουν μίγματα τα οποία περνάνε δια μέσου πορώδους υλικού, με διαφορετική ταχύτητα μετατόπισης των συστατικών τους. Σε αυτές τις διαδικασίες τα συστατικά του μίγματος διαχωρίζονται ως αποτέλεσμα της

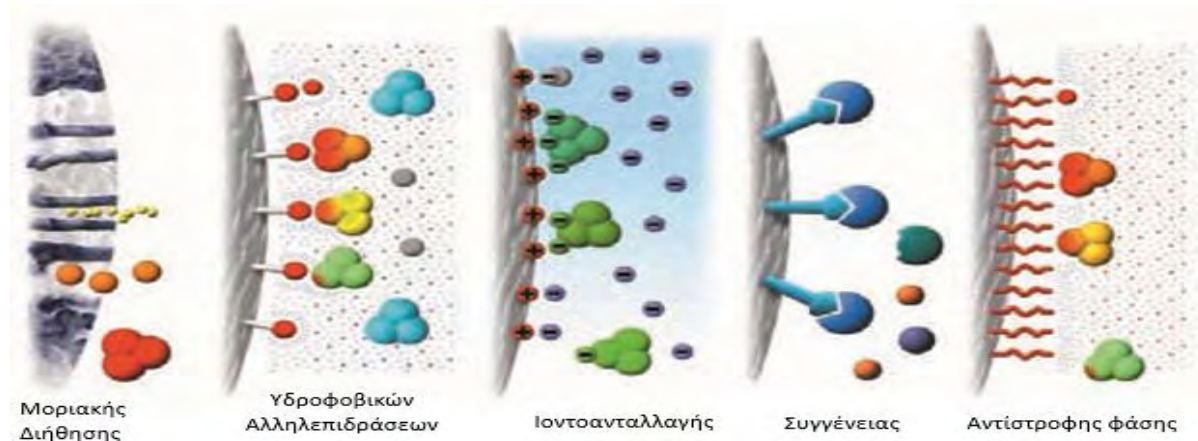
συνάφειας των ουσιών με μια στατική φάση (στερεή ή υγρή) ή μια κινούμενη φάση (αέρια ή υγρή). Τα κύρια φαινόμενα είναι η προσρόφηση, ανταλλαγή ιόντων και διάλυση σε μια στατική μήτρα ή διαλύτη. Οι διάφορες μορφές χρωματογραφίας περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα από αυτά τα φαινόμενα, ενώ κατά την διάρκεια μιας χρωματογραφικής ανάλυσης λαμβάνουν χώρα δύο ή περισσότερα φαινόμενα [29].

Το είδος της χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται υγρές κινητές φάσεις ονομάζεται υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC). Στην υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός συμβαίνει στη στήλη που αποτελεί την στατική φάση. Ο όγκος και το σχήμα της στήλης εξαρτάται από την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται αλλά και από την χρωματογραφική μέθοδο που χρησιμοποιείται. Η στατική φάση πακετάρεται στη στήλη και όσο το δείγμα διέρχεται από τη στατική φάση, συμβαίνει ο διαχωρισμός. Ένας τυπικός διαχωρισμός χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία LC φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [30].



Εικόνα 16 : Ένα τυπικό σύστημα υγρής χρωματογραφίας (LC) [30].





Εικόνα 17: Τα κυριότερα είδη της ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών [31].

### 2.6.1 Χρωματογραφία Συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας είναι μία μέθοδος που διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση μια αντιστρεπτή αλληλεπίδραση μεταξύ μίας πρωτεΐνης στόχου (ή ομάδα πρωτεϊνών) και ένα ειδικό προσδέτη που βρίσκεται συζευγμένος σε μία μήτρα χρωματογραφίας. Η τεχνική αυτή είναι ιδανική για την απομόνωση πρωτεϊνών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί όποτε είναι διαθέσιμος ένας κατάλληλος προσδέτης για την πρωτεΐνη (πρωτεΐνες) στόχο. Οι βιολογικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του προσδέτη και του μορίου στόχου μπορεί να είναι αποτέλεσμα ηλεκτροστατικών ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, δυνάμεων Van der Waals ή δεσμών υδρογόνου. Οι αλληλεπιδράσεις υψηλής συγγένειας επιτρέπουν πολύ γρήγορο και υψηλής απόδοσης καθαρισμό και η πρωτεΐνη στόχος συλλέγεται σε καθαρή, συμπυκνωμένη μορφή. Μερικές τυπικές αλληλεπιδράσεις είναι αυτές μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος, προσδέτη και υποδοχέα ή αντιγόνου και αντισώματος. Για την έκλουση του μορίου στόχου από το υλικό της στήλης πρέπει να αναστραφεί η αλληλεπίδραση, είτε χρησιμοποιώντας ένα ανταγωνιστικό προσδέτη, ή μη-ειδικώς, αλλάζοντας το pH, την ιοντική ισχύ ή την πολικότητα. Η διαδικασία του καθαρισμού πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να αναλυθεί στα εξής βήματα, όπως φαίνεται και στην εικόνα :

#### 1) Εξισορρόπηση

Το υλικό της στήλης εξισορροπείται με το διάλυμα όπου θέλουμε να γίνει η πρόσδεση της πρωτεΐνης (διάλυμα πρόσδεσης).

#### 2) Εισαγωγή δείγματος και πλύση

Το δείγμα εισέρχεται στη στήλη, κάτω από συνθήκες που ευνοούν την ειδική, αλλά αντιστρεπτή, σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου στο υλικό της στήλης με το οποίο εμφανίζει συγγένεια, λόγω της πρόσδεσης ενός ακινητοποιημένου προσδέτη. Τα

επιπλέον συστατικά του κυτταροπλάσματος που δεν συνδέονται απομακρύνονται από τη στήλη με πλύση.

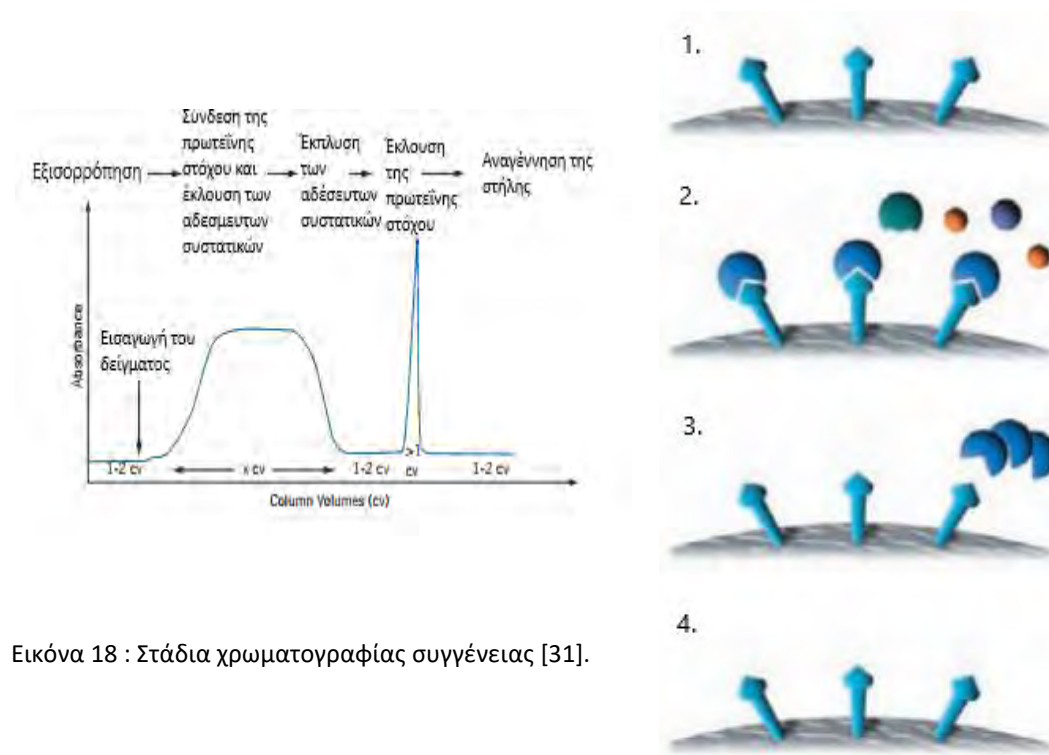
### 3) Έκλυση

Η πρωτεΐνη στόχος ανακτάται μεταβάλλοντας τις συνθήκες που ευνοούν την έκλυση των δεσμευμένων μορίων. Η έκλυση γίνεται χρησιμοποιώντας είτε ανταγωνιστικό προσδέτη, είτε αλλάζοντας το pH, την ιοντική ισχύ ή την πολικότητα. Η πρωτεΐνη στόχος συλλέγεται σε καθαρή, συμπυκνωμένη μορφή.

### 4) Αναγέννηση

Το υλικό της στήλης επανα-εξισορροπείται με το διάλυμα πρόσδεσης για επόμενη χρήση.

[31]



Εικόνα 18 : Στάδια χρωματογραφίας συγγένειας [31].

#### 2.6.1.2 Στήλη IMAC με ακινητοποιημένα Ni<sup>2+</sup>

Μία μεγάλη κατηγορία στη χρωματογραφία συγγένειας, αποτελεί η χρωματογραφία συγγένειας με χρήση ακινητοποιημένων μετάλλων πάνω σε σφαιρίδια αγαρόζης ή σεφαρόζης (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC). Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα μέταλλα κινητοποιούνται σε ένα μέσο χρωματογραφίας. Τα μέταλλα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής: Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>,

$\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ή  $\text{Fe}^{2+}$ . Ορισμένα αμινοξέα, κυρίως η ιστιδίνη (His) και η κυστεΐνη (Cys), σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ακινητοποιημένα μέταλλα σε τιμές pH 6-8 και κυρίως η περιεκτικότητα μιας πρωτεΐνης σε ιστιδίνη είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση της στα ακινητοποιημένα μέταλλα. Η χρωματογραφία συγγένειας με χρήση ακινητοποιημένων μετάλλων είναι ιδανική για την απομόνωση και τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που διαθέθουν ετικέτα 6 ιστιδινών και έχουν υψηλή συγγένεια ως προς τα  $\text{Ni}^{2+}$ . Η αντίδραση δέσμευσης με την πρωτεΐνη-στόχο είναι εξαρτώμενη από το pH και η δεσμευμένη πρωτεΐνη εκλούεται συνηθέστερα με μείωση του pH και αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος ή με προσθήκη EDTA ή ιμιδαζολίου στο διάλυμα [31].

### 2.6.2 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής διαχωρίζει τα μόρια με βάση τις διαφορές στο επιφανειακό τους φορτίο. Τα μόρια διαφέρουν σημαντικά στις ιδιότητες του φορτίου τους και παρουσιάζουν διαφορετικούς βαθμούς αλληλεπίδρασης με τα φορτισμένα μέσα χρωματογραφίας σύμφωνα με τις διαφορές που υπάρχουν στο συνολικό τους φορτίο, την πυκνότητα του φορτίου και την κατανομή του επιφανειακού φορτίου. Το καθαρό επιφανειακό φορτίο των μορίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούνται από πολλά διαφορετικά αμινοξέα που περιέχουν ασθενείς όξινες και βασικές ομάδες, το καθαρό επιφανειακό φορτίο θα αλλάζει σταδιακά καθώς αλλάζει το pH του περιβάλλοντος, δηλαδή οι πρωτεΐνες είναι επαμφοτερίζοντα μόρια.

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι η σχέση μεταξύ καθαρού επιφανειακού φορτίου και pH είναι μοναδική για μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Σε έναν διαχωρισμό με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, οι αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φορτισμένων μορίων και αντιθέτως φορτισμένων μέσων χρωματογραφίας ελέγχονται για να ευνοηθούν η δέσμευση ή η έκλυση συγκεκριμένων μορίων και να επιτευχθεί διαχωρισμός. Μια πρωτεΐνη που δεν έχει καθαρό φορτίο σε ένα ισοδύναμο pH με το ισοηλεκτρικό σημείο της ( $pI$ ) δεν θα αλληλεπιδρά με ένα φορτισμένο μέσο. Εν τούτοις, σε ένα pH πάνω από το  $pI$ , μία πρωτεΐνη θα δεσμεύεται σε ένα θετικά φορτισμένο μέσο ή ανιοανταλλάκτη και, σε ένα pH κάτω από το  $pI$ , μία πρωτεΐνη θα δεσμεύεται σε ένα αρνητικά φορτισμένο μέσο ή κατιοντοανταλλάκτη. Εκτός από την αλληλεπίδραση ανταλλαγής ιόντων, μπορούν να συμβούν και άλλοι τύποι δέσμευσης, αλλά αυτά τα φαινόμενα είναι πολύ μικρά και οφείλονται κυρίως στις δυνάμεις Van der Waals και τις μη πολικές αλληλεπιδράσεις. Ένα μέσο χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής περιλαμβάνει μια μήτρα σφαιρικών σωματιδίων υποκατεστημένων με ιονικές ομάδες που είναι αρνητικά ή θετικά

φορτισμένες. Η μήτρα είναι συνήθως πορώδης για να δώσει μια υψηλή εσωτερική επιφάνεια. Το μέσο συσκευάζεται σε μια στήλη και η στήλη εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο γεμίζει τους πόρους της μήτρας και τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων.

#### ➤ Εξισορρόπηση

Το πρώτο βήμα είναι η εξισορρόπηση της στατικής φάσης στις επιθυμητές συνθήκες εκκίνησης. Όταν επιτευχθεί ισορροπία, όλες οι φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης δεσμεύονται με ανταλλάξιμα αντίθετα φορτισμένα ιόντα, όπως χλώριο ή νάτριο. Το pH και η ιοντική ισχύς του διαλύματος εξισορρόπησης επιλέγονται έτσι ώστε να διασφαλίζεται ότι, όταν το δείγμα φορτωθεί, οι πρωτεΐνες στόχοι να δεσμευτούν στο μέσο και θα απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες πρωτεΐνες.

#### ➤ Εισαγωγή του δείγματος και πλύση

Το δεύτερο βήμα είναι η εισαγωγή του δείγματος και η πλύση. Ο στόχος σε αυτό το βήμα είναι να δεσμευτούν τα μόρια-στόχοι και να απομακρυνθούν όλα τα μόρια που δεν έχουν συνδεθεί. Το ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος θα πρέπει να έχει το ίδιο pH και την ίδια ιοντική ισχύ με το διάλυμα εξισορρόπησης προκειμένου να δεσμεύσει όλες τις φορτισμένες πρωτεΐνες στόχους. Αντίθετα φορτισμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται σε ιονικές ομάδες του υλικού της στήλης και συγκεντρώνονται στη στήλη. Οι μη φορτισμένες πρωτεΐνες ή εκείνες με το ίδιο φορτίο περνούν μέσω της στήλης με ταχύτητα ίδια με τη ροή του ρυθμιστικού διαλύματος, και εκλούνται κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά την εισαγωγή του δείγματος, ανάλογα με τον συνολικό όγκο του δείγματος που φορτώθηκε.

#### ➤ Έκλουση

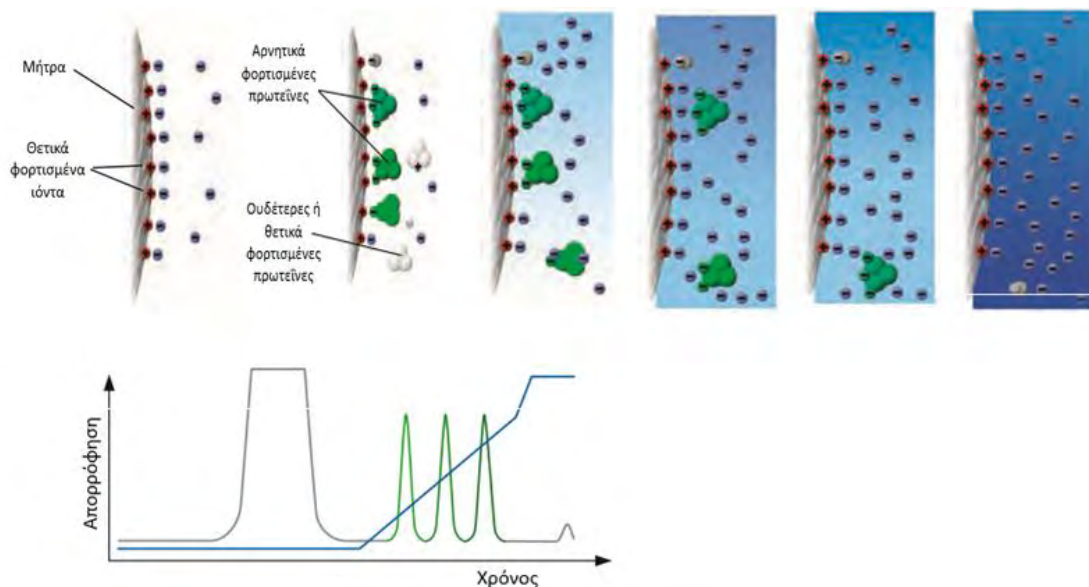
Αφού φορτωθεί όλο το δείγμα και η στήλη πλυθεί με διάλυμα εξισορρόπησης, οι συνθήκες μεταβάλλονται για να εκλουθούν οι δεσμευμένες πρωτεΐνες. Πιο συχνά, οι πρωτεΐνες εκλούνται αυξάνοντας την ιοντική ισχύ (συγκέντρωση άλατος) του διαλύματος ή αλλάζοντας το pH. Καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνει, τα ιόντα των αλάτων (τυπικά  $\text{Na}^+$  ή  $\text{Cl}^-$ ) ανταγωνίζονται τους προσδεδεδεμένους παράγοντες στις φορτισμένες ομάδες της επιφάνειας του υλικού της στήλης και ένα ή περισσότερα προσδεδεδεμένα συστατικά θα αρχίσουν να εκλούνται και να κινούνται προς τα κάτω στη στήλη. Οι πρωτεΐνες με το χαμηλότερο καθαρό φορτίο στο επιλεγμένο pH θα είναι οι πρώτες που εκλούνται από τη στήλη καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνεται. Παρομοίως, οι πρωτεΐνες με το υψηλότερο φορτίο σε ένα ορισμένο pH θα διατηρηθούν με μεγάλη δύναμη και θα εκλουθούν τελευταίες. Όσο υψηλότερο είναι το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης, τόσο μεγαλύτερη είναι η ιοντική ισχύς που απαιτείται για την έκλουση. Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει η

διαβάθμιση της συγκέντρωσης του παράγοντα έκλυσης, οι πρωτεΐνες εκλύονται σε διαφορετικό στάδιο σε πιο καθαρή και συμπυκνωμένη μορφή.

➤ Αναγέννηση

Μια τελική πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος αναγεννά τη στήλη και απομακρύνει ότι έχει μείνει ισχυρά προσδεμένο στη στήλη. Αυτό οδηγεί σε πλήρη ανάκτηση της δεσμευτικής ικανότητας της στήλης ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά. Τέλος, η στήλη επανα-εξισορροπείται στο αρχικό διάλυμα πριν χρησιμοποιηθεί ξανά.

[32]



Εικόνα 19: Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Παράδειγμα απομόνωσης και καθαρισμού αρνητικά φορτισμένης πρωτεΐνης. Παρατηρούμε ότι οι λιγότερο ισχυρά προσδεμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται πρώτες στα κλάσματα της έκλυσης [32].

### 2.6.2.1 Στήλη Resource Q

Το υλικό της στήλης της Resource Q (GE HealthCare) είναι θετικά φορτισμένο και ανήκει στην κατηγορία των ισχυρών ανιοανταλλακτών. Το εύρος pH που επιτρέπει η χρήση της συγκεκριμένης στήλης είναι 2-12 και το όριο δέσμευσης 45 mg (BSA) [32].

## 2.7 Πρωτεάση TEV

Ο ιολόγος William Doughterty και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που χαρακτήρισαν την πρωτεάση TEV στα τέλη της δεκαετίας του '80. Αρχικά αναγνωρίστηκε ως προϊόν της ιικής πολυπρωτεΐνης με μοριακό βάρος 49 kDa και ονομάστηκε "πρωτεΐνη πυρηνικής ενσωμάτωσης Ια" ή "N1α" και αργότερα αποδείχτηκε ότι η δραστηριότητα πρωτεάσης βρίσκεται στην C-τελική της περιοχή μοριακού βάρους 27 kDa. Πειραματικά προσδιορίστηκε ότι η θέση αναγνώρισης για την πρωτεάση TEV είναι ένας γραμμικός επίτοπος που αποτελείται από επτά υπολείμματα αμινοξέων. Αυτό επιβεβαιώθηκε αποδεικνύοντας ότι η ακολουθία ENLYFQ ↓ S θα μπορούσε να λειτουργήσει ως θέση πρόσδεσης της πρωτεάσης TEV όταν τοποθετηθεί σε ένα τεχνητό πλαίσιο και οδήγησε στην διαπίστωση ότι η πρωτεάση TEV μπορεί να είναι ένα χρήσιμο αντιδραστήριο για την απομάκρυνση των ετικετών συγγένειας με ειδική ενδοπρωτεόλυση. Η αμινοξική αλληλουχία που αναγνωρίζει και πρωτεολύει η πρωτεάση TEV είναι η Glu-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln ↓ Ser/Gly, όπου Xaa δηλώνει την παρουσία οποιουδήποτε αμινοξέος. Η TEV πρωτεάση έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την απομάκρυνση ετικετών συγγένειας με ιστιδίνες [33].

## 2.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

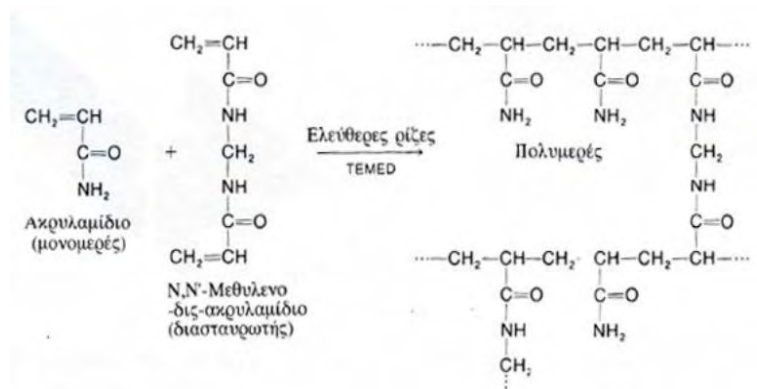
Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να παρέχει πληροφορίες για το μοριακό βάρος και το φορτίο, την δομή των υπομονάδων και την καθαρότητα μιας πρωτεΐνης. Είναι μια αρκετά απλή τεχνική και η πιο συχνή της χρήση είναι η ποσοτική ανάλυση των συστατικών ενός δείγματος πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή παρέχει την υψηλότερη ανάλυση από όλες τις διαθέσιμες μεθόδους διαχωρισμού, καθώς μπορεί να διαχωρίσει πολυπεπίδια που διαφέρουν κατά λίγες εκατοντάδες daltons στο μοριακό τους βάρος και κατά 0.1 μονάδα του pH στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει πολλές τεχνικές με την ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) να αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Η μέθοδος SDS-PAGE εφαρμόζεται συχνά στα κλάσματα που προέρχονται από τη χρωματογραφία πρωτεϊνών ή από άλλες διαδικασίες καθαρισμού. Κάθε συστατικό θα διατρέξει το πήκτωμα και θα διαχωριστεί ανάλογα με το μοριακό του βάρος. Απαιτείται αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις επιμέρους τους πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οπότε περιορίζεται η πληροφορία που παρέχεται ειδικότερα αν είναι επιθυμητή η διατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας των πρωτεϊνών. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Άλλη τεχνική ηλεκτροφόρησης είναι αυτή της ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF) στην οποία οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το φορτίο τους, ενώ η

ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D) που συνδυάζει τόσο την SDS-PAGE όσο και την IEF μέθοδο, προσδιορίζει σε μεγάλο βαθμό την καθαρότητα ενός πρωτεϊνικού δείγματος.

Η αρχή της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην ελεγχόμενη κίνηση των σωματιδίων σε ηλεκτρικά πεδία. Οι πρωτεΐνες είναι φορτισμένα σωματίδια και μετακινούνται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικών πεδίων. Οι πιο σημαντικές φυσικές τους ιδιότητες είναι οι ηλεκτροφορητικές τους κινητικές ικανότητες και τα ισοηλεκτρικά τους σημεία. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από το μέγεθος, το φορτίο και το σχήμα, ενώ το ισοηλεκτρικό σημείο εξαρτάται μόνο από το φορτίο. Οι πρωτεΐνες ως επαμφοτερικά μόρια μπορούν να φέρουν θετικό, αρνητικό ή καθόλου φορτίο ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται. Για κάθε πρωτεΐνη υπάρχει ένα συγκεκριμένο pH στο οποίο είναι αφόρτιστη. Αυτό το pH ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο ή pI. Μία πρωτεΐνη είναι θετικά φορτισμένη σε διαλύματα με pH χαμηλότερο του pI της και αρνητικά φορτισμένη σε διαλύματα με pH υψηλότερο του pI της. Αυτή η εξάρτηση του φορτίου από το pH επηρεάζει την κινητικότητα των πρωτεϊνών και την κατεύθυνση της μετακίνησης τους στο πήκτωμα.

Το σημείο “κλειδί” της ηλεκτροφόρησης είναι το πήκτωμα. Αυτό καθορίζει κυρίως την ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εκτός από το φορτίο τους και τις σταθεροποιεί στη συγκεκριμένη θέση μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ώστε να οπτικοποιηθεί στη συνέχεια με χρώση του πηκτώματος. Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται κυρίως πολυακρυλαμίδη αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η αγαρόζη για πρωτεΐνες με μέγεθος μεγαλύτερο από 500 kDa. Υπάρχουν ορισμένα χαρακτηριστικά της πολυακρυλαμίδης που την καθιστούν ιδανική για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, όπως: i) Είναι δυνατόν να παρασκευαστεί πήκτωμα με διαφορετικό μέγεθος πόρων, για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. ii) Η αντίδραση πολυμερισμού είναι εύκολη. iii) Το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από τις συνθήκες πολυμερισμού και μπορεί εύκολα να μεταβληθεί αλλάζοντας τη συγκέντρωση του μονομερούς. iv) Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι υδρόφιλα και ηλεκτρικά ουδέτερα τη στιγμή που παρασκευάζονται. v) Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι διάφανα στο φως σε μήκη κύματος πάνω από 250 nm και δεν προσδένουν χρωστικές των πρωτεϊνών.

Για τον σχηματισμό του πηκτώματος, αναμιγνύονται το ακρυλαμίδιο με το N'-N'-methylbisacrylamide (bis) και ξεκινούν να συν-πολυμερίζονται παρουσία ελευθέρων ριζών. Τα μονομερή του ακρυλαμίδιου πολυμερίζονται σε μακριές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με το μόριο bis ακρυλαμίδιου. Η προκύπτουσα δομή έχει τόσο στερεά όσο και υγρά συστατικά. Αποτελεί μία μάζα άκαμπτων ινών που δημιουργούν ένα δίκτυο με χώρους, που έχουν βυθιστεί σε υγρό. Το υγρό διατηρεί το τρισδιάστατο σχήμα του πηκτώματος και έτσι το στερεό πήκτωμα που σχηματίζεται διατηρεί τον διαλύτη στο εσωτερικό του πηκτώματος.



Εικόνα 20:  
Σχηματισμός πηκτών  
πολυακρυλαμιδίου

Η παρουσία των ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητη για την έναρξη του πολυμερισμού και δημιουργούνται από την παρουσία ammonium persulfate και N,N,N',N'tetramethylethylenediamine (TEMED). Το TEMED επιταχύνει την μετατροπή του APS σε ελεύθερες ρίζες θείου οι οποίες ξεκινούν τον πολυμερισμό με μεγαλύτερη απόδοση σε αλκαλικό pH. Ο ρυθμός του πολυμερισμού εξαρτάται:

i) από τη συγκέντρωση των μονομερών (ακρυλαμίδιο και bis ακρυλαμίδιο) που συμμετέχουν

ii) τη θερμοκρασία

iii) την καθαρότητα των αντιδραστηρίων στην αντίδραση πολυμερισμού. Για καλύτερης ποιότητας αποτελέσματα το οξυγόνο είναι προτιμότερο να απομακρύνεται από τα διαλύματα με απαέρωση. Ωστόσο, καλής ποιότητας πηκτώματα παράγονται και χωρίς να έχει προηγηθεί αφαίρεση του οξυγόνου.

Το πιο διαδεδομένο σύστημα ηλεκτροφόρησης είναι η μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής που ανακαλύφθηκε από το Laemmli (1970) όπου το SDS αποτελεί το κύριο συστατικό της πηκτής. Το SDS είναι ένα απορρυπαντικό που μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και είναι αρνητικά φορτισμένο, ενώνεται με όλες τις περιοχές των πρωτεϊνών, και προσδίδει σε όλες καθαρό αρνητικό φορτίο αλλά και ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα. Ο διαχωρισμός στην πηκτή SDS βασίζεται στο μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο πήκτωμα αυξάνεται γραμμικά από πάνω προς τα κάτω με αποτέλεσμα το μέγεθος των πόρων να μειώνεται όσο μεγαλώνει η απόσταση στο πήκτωμα. Καθώς οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος της πηκτής από περιοχές με μεγάλους πόρους σε περιοχές με μικρούς πόρους, ο ρυθμός μετακίνησης τους μειώνεται. Έτσι οι μικρότερες πρωτεΐνες κινούνται γρηγορότερα και περισσότερο, ενώ οι μεγαλύτερες κινούνται πιο αργά, καθώς το μεγαλύτερο μέγεθος αυξάνει την τριβή και μειώνει την κινητικότητα.

Η κατασκευή όπου θα δημιουργηθεί η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου είναι μια κάθετη διάταξη 2 τζαμιών τα οποία στην συγκεκριμένη απέχουν μεταξύ τους 1 mm. Οι θέσεις υποδοχής του δείγματος (ή πηγάδια) δημιουργούνται με την προσθήκη μιας χτένας που δημιουργεί τα πηγάδια κατά την πήξη της πηκτής επιστοιβάξης.



Μόλις παρασκευαστεί η πηκτή τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer: 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS) το οποίο πρέπει να είναι σε επαφή με την πηκτή σε όλο της το μήκος και πλάτος. Τα δείγματα προετοιμάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4x έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραίωση των δειγμάτων να είναι 1x (10 % glycerol, 154 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 0.01 % bromophenol blue, 1.25 % β-Mercaptoethanol). Στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5 min στους 95-98 °C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια, ενώ παράλληλα σε ένα από αυτά φορτώνεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται στο τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 120 V στο κλειστό κύκλωμα μεταξύ της δεξαμενής της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στον Πίνακα 1 φαίνεται η σύσταση για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης σε διαφορετικές πυκνότητες.

Παρασκευή πηκτωμάτων (% πυκνότητα)			
		10%	12%
	Επιστοιβάξης (3ml)	Διαχωρισμού (5ml)	
dH <sub>2</sub> O	2,1	1,9	1,6
30% Acrylamide-mix	0,5	1,7	2.0
Tris 1.5 M, pH8.8	-	1,3	1,3
Tris 1.0 M, pH 8.8	0,38	-	-
SDS (10%)	0,03	0,05	0,05
APS 10%	0,03	0,05	0,05
TEMED	0,003	0,002	0,002

Πίνακας 1: Αναλογία συστατικών για την παρασκευή πηκτωμάτων ακρυλαμίδιου διαφορετικής πυκνότητας

Σε ένα εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο οι πρωτεΐνες, οι οποίες είναι πια αρνητικά φορτισμένες λόγω και του SDS, κινούνται προς τη θετική άνοδο με διαφορετικούς ρυθμούς ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Συνήθως, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, χρησιμοποιείται η μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής του Laemmli, όπου το ρυθμιστικό διάλυμα στο πήκτωμα και στη δεξαμενή είναι διαφορετικά. Το σύστημα αποτελείται από το πήκτωμα επιστοιβάξης που έχει pH 6.8 (Tris-HCl, pH 6.8) το πήκτωμα διαχωρισμού με pH 8.8 (Tris-HCl, pH 8.8) και το διάλυμα ηλεκτροδίου με pH 8.3 (Tris-Glycine pH 8.3). Πρέπει να επισημανθεί ότι η γλυκίνη μπορεί να είναι θετικά, ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένη, ανάλογα με το pH. Όταν η ισχύς είναι ενεργοποιημένη, τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα γλυκίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων pH 8.3 αναγκάζονται να εισέλθουν στο πήκτωμα, όπου το pH είναι 6.8. Σε αυτό το περιβάλλον, η γλυκίνη μεταβαίνει κυρίως στην ουδέτερα φορτισμένη κατάσταση. Αυτή η απώλεια φορτίου τους αναγκάζει να

μετακινούνται πολύ αργά στο ηλεκτρικό πεδίο. Τα ιόντα Cl<sup>-</sup> (από το Tris-HCl), από την άλλη, κινούνται πολύ πιο γρήγορα στο ηλεκτρικό πεδίο και σχηματίζουν ένα μέτωπο ιόντων που μεταναστεύει μπροστά από τη γλυκίνη. Ο διαχωρισμός του Cl<sup>-</sup> από το ιόν Tris (που κινείται τώρα προς την άνοδο) δημιουργεί μια στενή ζώνη που τραβάει τη γλυκίνη πίσω από αυτό, με αποτέλεσμα δύο στενά διαχωρισμένα μέτωπα μεταναστευτικών ιόντων, τα οποία είναι το εξαιρετικά κινητικό μέτωπο Cl<sup>-</sup>, ακολουθούμενο από το πιο αργό, κυρίως ουδέτερο μέτωπο γλυκίνης. Όλες οι πρωτεΐνες στο δείγμα πηκτώματος έχουν ηλεκτροφορητική κινητικότητα που είναι ενδιάμεση της κινητικότητας της γλυκίνης και του Cl<sup>-</sup>, και έτσι οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται στη στενή ζώνη μεταξύ του Cl<sup>-</sup> και γλυκίνης. Αυτό συνεχίζεται μέχρι να φτάσουν στο σημείο του πηκτώματος, όπου το pH είναι 8.8. Σε αυτό το pH τα μόρια γλυκίνης είναι ως επί το πλείστον αρνητικά φορτισμένα και μπορούν να μεταναστεύσουν πολύ γρηγορότερα από τις πρωτεΐνες. Έτσι, το μέτωπο γλυκίνης επιταχύνει αφήνοντας πίσω του τις πρωτεΐνες. Το αποτέλεσμα είναι ότι οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε μία πολύ στενή ζώνη ανάμεσα στο πήκτωμα επιστοίβαξης και στο πήκτωμα διαχωρισμού και δεδομένου ότι η πηκτή διαχωρισμού έχει αυξημένη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου, η οποία επιβραδύνει την κίνηση των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους, αρχίζει ο διαχωρισμός [34].

### **2.8.1 Χρώση πηκτώματος**

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε 10% v/v διάλυμα οξικού οξέως μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 λεπτό. Το διάλυμα οξικού οξέως αποχύνεται και προστίθεται το διάλυμα χρώσης το οποίο περιέχει 0.1 % Coomassie Blue R250, 10 % οξικό οξύ και 50 % μεθανόλη. Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται και πάλι στο φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό και αφήνεται να αναδευτεί για 10 λεπτά. Μετά το πέρας των 10 λεπτών αποχύνεται το διάλυμα χρώσης και προστίθεται ξανά διάλυμα οξικού οξέος 10% v/v. Ακολουθεί ξανά βράσιμο σε φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό και το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται 3-5 φορές. Τέλος το πήκτωμα μένει με διάλυμα οξικού οξέος 10 % v/v μέχρι να απομακρυνθεί εντελώς ο θόρυβος που προκαλεί η χρώση με Coomassie Blue.

## **2.9 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών-Μέθοδος Bradford**

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για να μετρήσει την ολική ποσότητα πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Αρχή αυτής της μεθόδου είναι η δέσμευση των μορίων της πρωτεΐνης στη χρωστική Coomassie κάτω από όξινες συνθήκες κάτι το οποίο

οδηγεί σε αλλαγή του χρώματος από καφέ σε μπλε. Αυτή η μέθοδος ουσιαστικά μετράει την παρουσία των αμινοξέων αργινίνη, λυσίνη και ιστιδίνη τα οποία συμβάλλουν στο σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής Commassie, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Τυχόν αύξηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm είναι ενδεικτική της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη. Αρχικά, παρασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων διαλυμάτων πρωτεΐνης BSA γνωστής συγκεντρώσεως. Σε όγκο 20 μL από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα προσθέτονται 780 μL απιονισμένο ύδωρ και 200 μL αντιδραστηρίου Bradford 5x, έτσι ώστε να γίνει 1x. Στη συνέχεια τα διαλύματα αναδεύονται και αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι για 10 λεπτά. Ακολούθως αναδεύονται και φασματοφωτομετρούνται σε μήκος κύματος 595 nm, ενώ τέλος υπολογίζεται η συγκέντρωσή τους με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης.

## 2.10 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κόνικλων (*rmGPb*)

Η απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κόνικλων έγινε με τροποποίηση της μεθόδου Fisher&Krebs (Methods in Enzymology Vol V, p. 369-373, 1962). Αντί L-κυστεΐνης χρησιμοποιείται 2-μερκαπτο-αιθανόλη σε όλα τα στάδια της πορείας του καθαρισμού. Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί κόνικλοι της ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus*.

### ΥΛΙΚΑ:

- 3 αρσενικοί κόνικλοι ποικιλίας *oryctolagnus cuniculus*
- Διάλυμα οξικού οξέος CH<sub>3</sub>COOH 1N
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης).
- Κεκορεσμένο διάλυμα KHCO<sub>3</sub>, Διάλυμα 90 % w/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO<sub>3</sub> και 10mM EDTA στους 100°C, συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους και αποθήκευση σε 20% αιθανόλη στους 4°C )
- Διάλυμα 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1 M, pH 7.0
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris [τρεις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου]/HCl 0.001M] (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0 M
- Διάλυμα οξικού οξέος CH<sub>3</sub>COOH 1 N

- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ , 1.0 M pH 7.0
- Γλυκερόλη 100 %

## ΌΡΓΑΝΑ

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

## **Πειραματικό Μέρος**

### Ημέρα 1<sup>η</sup>

A. Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος.

1. Ο μυϊκός ιστός λαμβάνεται από τα πίσω πόδια καθώς και από τους ραχιαίους μυς κοντά στη σπονδυλική στήλη από τους 3 αρσενικούς κόνικλους και τοποθετείται αμέσως σε πάγο.
2. Ο μυϊκός ιστός ομογενοποιείται σε κρεατομηχανή, ζυγίζεται και επανατοποθετείται σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η άλεση όλου του ιστού.
3. Ο κιμάς εκχυλίζεται με απιονισμένο ύδωρ 3 φορές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία. Ο συνολικός χρόνος εκχύλισης δεν ξεπέρασε τα 30 min. Η διαδικασία αυτή, δηλαδή ζύμωμα του κιμά για 10min, πραγματοποιείται για να βγει η GRb από τα ζωικά κύτταρα.

Εκχύλιση 1<sup>η</sup> (10 min) 2300 mL

- a) Κιμάς + ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί 8 min
- b) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- c) Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

Εκχύλιση 2<sup>η</sup> (10 min) 2300 mL

- a) Κιμάς από την 1<sup>η</sup> εκχύλιση + ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί 8 min

- b) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- c) Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

Εκχύλιση 3<sup>η</sup> (10 min) 1150 mL

- a) Κιμάς από την 2<sup>η</sup> εκχύλιση + μίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί 8 min
- b) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- c) Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

4. Το εκχύλισμα διηθείται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών.

B. Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον

5. Ρύθμιση του pH του ψυχρού εκχυλίσματος σε 5.1 – 5.2 με προσθήκη 1 N CH<sub>3</sub>COOH υπό ελαφρά ανάδευση (το εκχύλισμα δεν χρειάζεται να βρίσκεται σε πάγο κατά τη ρύθμιση του pH). Η θολρότητα του εκχυλίσματος αυξάνει κατά τη ρύθμιση του pH εξαιτίας της κατακρήμνισης διάφορων πρωτεϊνών.

6. Το εκχύλισμα αφήνεται σε πάγο για 5 min. Το εκχύλισμα τοποθετείται σε σωλήνες φυγοκέντρησης ισοζυγίζεται και τοποθετείται στη φυγόκεντρο.

7. Απομάκρυνση των πρωτεϊνών που καταβυθίστηκαν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 4.225 rcf επί 30 min.

8. Διήθηση του υπερκείμενου υγρού με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί Buchner εν ψυχρώ για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Η συσκευή διήθησης αποτελείται από χωνί Buchner, κωνική φιάλη δύο λίτρων ή οποία πρέπει να βρίσκεται μέσα σε μία λεκάνη με πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της διήθησης, λαστιχάκι συνδεδεμένο με την αντλία κενού και χάρτινα φίλτρα διαμέτρου 18.5 cm. Η διαδικασία ξεκινά με την τοποθέτηση δύο χάρτινων φίλτρων στο χωνί Buchner και τη δημιουργία κενού με την λειτουργία της αντλίας κενού. Σταδιακά μικροί όγκοι εκχύνονται από τα δοχεία της φυγοκέντρου στο χωνί Buchner. Τα χάρτινα φίλτρα αλλάζουν μετά την απόχυση του περιεχομένου δύο δοχείων της φυγοκέντρου στο χωνί Buchner. Όταν ο όγκος του διαλύματος μέσα στην φιάλη γίνει περίπου 1.5 L αφαιρείται πρώτα το λάστιχο που συνδέει την κωνική φιάλη με την αντλία κενού ώστε να αποφευχθεί αναρρόφηση και ο όγκος του υγρού μετράται με ογκομετρικό κύλινδρο και φυλάσσεται σε δοχείο των 20 L εν ψυχρώ. Η διήθηση με τη χρήση της συσκευής Buchner συνεχίζεται για το συνολικό όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος.

9. Ρύθμιση του pH του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος σε 6.8 (ισοηλεκτρικό σημείο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου) με τη χρήση του κεκορεσμένου διαλύματος  $\text{KHCO}_3$ . ΔΕΙΓΜΑ Α

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

10. Απαιτούμενος όγκος διαλύματος θειικού αμμωνίου =  $0.837 \times$  όγκος εκχυλίσματος

11. Ρύθμιση του pH του διαλύματος του θειικού αμμωνίου σε 6.8 με την προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνής αμμωνίας ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). Ο έλεγχος του pH γίνεται με πεχαμετρικό χαρτί και η ρύθμιση στον απαγωγό.

12. Το διάλυμα του θειικού αμμωνίου προστίθεται στο πρωτεϊνικό διάλυμα αργά και με συνεχή ανάδευση. 4220 mL

13. Το μίγμα αφήνεται στον ψυκτικό θάλαμο για 24 hrs.\*

14. 20 λίτρα απιονισμένου ύδατος ψύχονται στο ψυκτικό θάλαμο για την παρασκευή του διαλύματος διαπίδυσης την επόμενη ημέρα.

\*Αντί για O/N μπορούμε να αφήσουμε το δείγμα στον ψυκτικό θάλαμο για 2 μέρες ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός.

### Ημέρα 2<sup>η</sup>

1.Κόβουμε τη μεμβράνη στο μήκος που θέλουμε.

2.Ζυγίζουμε 6.5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και 2.44 g EDTA για την προετοιμασία 650 ml διαλύματος.

3.Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετούνται στο παραπάνω διάλυμα και αφήνονται να βράσουν για 30 min.

4.Στην συνέχεια τα σακουλάκια ξεπλένονται πολύ καλά με απιονισμένο  $\text{H}_2\text{O}$ .

5.Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετούνται σε απιονισμένο  $\text{H}_2\text{O}$  και αφήνονται να βράσουν για 30 min.

6. Αφού ξεπλυθούν πολύ καλά φυλάσσονται σε διάλυμα (20 % v/v) αιθανόλης στους  $4^\circ\text{C}$ .

Μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο έχουν σχηματιστεί 2 φάσεις: υπερκείμενο-ίζημα.

1. Ο μεγαλύτερος όγκος του υπερκείμενου διαλύματος αποχύνεται με τη χρήση αντλίας.

2. Το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 5.110 rcf επί 40 min με τη χρήση της μεγάλης κεφαλής.

3. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα αποχύνεται και το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Προετοιμασία ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001 M pH 7.5 όγκου 2 λίτρων.

10 ml διαλύματος Tris 2 M αραιώνονται με απιονισμένο ύδωρ σε όγκο 400 ml (συγκέντρωση περίπου 50 mM). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στη τιμή 7.5 με τη χρήση διαλύματος 1 N HCl. Το διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται σε τελικό όγκο 20 Lt με τη χρησιμοποίηση του απιονισμένου ύδατος που έχει ψυχθεί.

5. Τα σακουλάκια διαπίδυσης πλένονται με απιονισμένο ύδωρ για την απομάκρυνση του αιθανολικού διαλύματος στο οποίο φυλάσσονται.

6. Το διαλυτοποιημένο ένζυμο τοποθετείται σε σακουλάκια διαπίδυσης τα οποία εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001 M, pH 7.5 στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα.

ΔΕΙΓΜΑ Β (πριν τη διαπίδυση).

### Ημέρα 3<sup>η</sup>

A. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

1. Συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος μετά τη διαπίδυση σε ογκομετρικό κύλινδρο.

2. Διαύγαση του πρωτεϊνικού διαλύματος με φυγοκέντρηση στις 34.540 rcf για 15 min (0 – 4 °C).

3. Ογκομέτρηση του υπερκείμενου υγρού. (ΔΕΙΓΜΑ Γ)

4. Προσθήκη πρόσφατου διαλύματος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος } 0.3 \text{ M } 2\text{-μερκαπτοαιθανόλης} = \text{πρωτεϊνικός όγκος} \times 3/27 = 13.1 \text{ ml}$$

$$118\text{mL} + 13.1 \text{ mL} = 131.1 \text{ mL}$$

5. Προσθήκη διαλύματος EDTA 0.1 M, pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος EDTA 0.1 M = πρωτεϊνικός όγκος μετά την προσθήκη του διαλύματος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης  $\times 5/1000 = 131.1 \text{ mL} \times 5/1000 = 0,656 \text{ mL}$  ή 656  $\mu\text{L}$

6. Προσθήκη διαλύματος 2 M Tris ώστε το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος να γίνει 8.8. Η προσθήκη γίνεται αργά και υπό ανάδευση και το pH μετράται με πεχάμετρο.
7. Επάωση του μίγματος στους 37 °C επί 1 hr με ταυτόχρονη ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα. (ήπια ανάδευση ανακίνηση και όχι με ράβδο)
8. Το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και το pH (περίπου 10-15 min) ρυθμίζεται σε τιμή 7.0 με τη χρήση διαλύματος CH<sub>3</sub>COOH 1 N.
9. Διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 34.540 rcf επί 10 min (25-30 °C).

#### B. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β

10. Το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα μετά τη φυγοκέντρηση ογκομετρείται. (ΔΕΙΓΜΑ Δ)
11. Προθήκη διαλύματος AMP 0.1 M, pH 7.0 στο υπερκείμενο σύμφωνα με τον τύπο:  
Όγκος AMP 0.1 M, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100 = 1.3 mL
12. Προσθήκη διαλύματος (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:  
Όγκος (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100 = 1.3 mL
13. Το διάλυμα τοποθετείται σε μικρά tubes φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα για να κρυσταλλωθεί. (οι κρύσταλλοι αρχίζουν να φαίνονται σε 1-2 h)

#### Ημέρα 4<sup>η</sup>

1. Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf σε θερμοκρασία 0 – 4 °C επί 10 min με τη χρήση της μικρής κεφαλής.
2. Η θερμοκρασία της φυγοκέντρου επαναφέρεται στους 25-30 °C
3. Το κρυσταλλικό ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 pH 6.8 σε θερμοκρασία 30 °C εντός του υδατόλουτρου.
4. Ακολουθεί διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf επί 10 min (25-30 °C) με τη χρήση της μικρής κεφαλής.
5. Το υπερκείμενο ενζυμικό υγρό ογκομετρείται



6. Προσθήκη διαλύματος AMP 0.1 M, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος AMP 0.1 M, pH 7.0} = \text{πρωτεϊνικός όγκος} \times 1/100 = 1.3\text{mL}$$

7. Προσθήκη διαλύματος  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ , pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος } (\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg, pH 7.0} = \text{πρωτεϊνικός όγκος} \times 1/100 = 1.3\text{mL}$$

8. Το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε μικρά tubes φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 hrs.

#### (1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση) (ΔΕΙΓΜΑ Ε)

Η παραπάνω διαδικασία (1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση) επαναλαμβάνεται ακριβώς με ίδιο τρόπο ύστερα από 3-4 ώρες και έτσι λαμβάνει χώρα η 2<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση και το μίγμα αφήνεται για μία νύκτα στον ψυκτικό θάλαμο.

#### Ημέρα 5<sup>η</sup>

1. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης που περιγράφηκε την 4η ημέρα (1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση) και έτσι λαμβάνει χώρα η 3<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση.
2. Επανάληψη της προηγούμενης διαδικασίας (1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση) για δύο ακόμα φορές χωρίς όμως την προσθήκη AMP και  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ .
3. Στο τελικό ενζυμικό διάλυμα προσδιορίζεται φωτομετρικά η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης β ως ακολούθως: 10 μL ενζυμικού δείγματος 2500 μL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 και φωτομέτρηση σε μήκη κύματος 280nm και 260 nm. Η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίζεται από τη σχέση:

$$(\text{OD } 280/1.32) \times (2510/10) = [\text{GPb}], \text{ mg/MI}$$

Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ( $\epsilon$ ) για την rmgPb ισούται με 1.32.

$$C_{\text{GPb}} = 144 \text{ mg/ml ή } 1,04\text{g.}$$

5. Το ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης (100%) και φυλάσσεται στους  $-20^\circ\text{C}$ .

## 2.11 Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης (hIGP)

Το γονίδιο της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PYGL) βρίσκεται κλωνοποιημένο σε φορέα έκφρασης pET-M11, σε κύτταρα *E. coli* BL-21 GOLD (DE3). Ο φορέας αυτός προσδίδει στην πρωτεΐνη μια αλληλουχία 6 ιστιδινών στο αμινοτελικό της άκρο, η οποία λειτουργεί ως ετικέτα συγγένειας κατά την διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης. Όλες οι διαδικασίες χειρισμού των βακτηριακών κυττάρων έγιναν σε αποστειρωμένες συνθήκες και τα βακτηριακά υπολείμματα επώαστηκαν παρουσία απολυμαντικού πριν απομακρυνθούν από το εργαστήριο. Αρχικά, μικρή ποσότητα κυττάρων που περιέχουν το πλασμίδιο αναπτύχθηκαν σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο LB-Broth των 10 mL, στο οποίο προστέθηκαν 20 µg/mL καναμυκίνη, 600 mg/L χλωριούχο μαγγάνιο ( $MnCl_2$ ) και 10 mg/L πυριδοξίνη. Το υγρό θρεπτικό μέσο LB-Broth (Lysogeny broth) παρασκευάστηκε κατά Miller και περιείχε 10 g NaCl, 10 g τρυπτόνη και 5 g εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) για την παρασκευή 1 L θρεπτικού μέσου, καθώς ρυθμίστηκε και το pH τοθ θρεπτικού μέσου στο 7 με λίγες σταγόνες NaOH. Οι υγρές βακτηριακές καλλιέργειες των 10 mL αναπτύχθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήριο στους 37 °C, 210 rpm για 12-16 ώρες. Στη συνέχεια τα 10 mL της υγρής καλλιέργειας μεταφερθήκαν σε αποστειρωμένη φλάσκα με υγρό θρεπτικό μέσο LB-Broth, όγκου 1 L (αναλογία 1:100). Το θρεπτικό υλικό στο οποίο έγινε η ανακαλλιέργεια περιείχε επίσης 20 µg/mL καναμυκίνη, 600 mg/L  $MnCl_2$  και 100 mg/L πυριδοξίνη. Από το παραπάνω θρεπτικό-μίγμα, πριν την προσθήκη των κυττάρων, απομακρύνουμε 1 mL σε κυψελίδα, ως τυφλό μάρτυρα, για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων μέσω φασματοφωτομετρίας ( $\lambda=600$  nm). Η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων έγινε σε ανακινούμενο επωαστήριο σε θερμοκρασία 37 °C, 210 rpm, έως ότου η οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 600 nm φτάσει σε τιμή 0.6-0.7. Στη συνέχεια οι φλάσκες με τις υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε πάγο έως ότου η θερμοκρασία τους φτάσει στους 18 °C. Ακολούθως, προστέθηκε ο παράγοντας επαγωγής της υπερέκφρασης, IPTG, σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM στην υγρή καλλιέργεια. Η υπερέκφραση έγινε σε ψυχώμενο ανακινούμενο επωαστήριο στους 18 °C, 210 rpm για 16 ώρες. Μετά το πέρας της υπερέκφρασης οι υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε πάγο, ώστε να σταματήσει η υπερέκφραση και τα κύτταρα συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση σε μεγάλα δοχεία φυγοκέντρησης (250 mL) σε 5000 rpm, για 30 min, σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και συλλέχτηκε το ίζημα. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης που περιείχε 20 mM  $\beta$ -GP, 0.5M NaCl, 20mM Imidazole και 1 mM PMSF. Το PMSF προστέθηκε τελευταίο λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του. Έπειτα, τα διαλυτοποιημένα κύτταρα έμειναν για 20 min σε πάγο παρουσία βενζονάσης (νουκλεάση). Ακολούθησε λύση των κυττάρων εφαρμόζοντας υπερήχους σε πάγο: 30 sec εφαρμογή υπερήχων/30 sec παύση για 5 κύκλους. Τέλος

έγινε φυγοκέντρηση για 1h, 4 °C, σε 20.000 g. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης φιλτράραμε το υπερκείμενο από αποστειρωμένο φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μm και αφήσαμε το κυτταρόλυμα στον πάγο. Η απομόνωση της hIGP έγινε σε 3 βήματα με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος ÄKTA-FPLC. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήσαμε κατά τον καθαρισμό με το σύστημα ÄKTA-FPLC ήταν φιλτραρισμένα με φίλτρο πόρων διαμέτρου 0.45 μm και απαερωμένα σε υδατόλουτρο υπερήχων.

#### Πρώτο βήμα: IMAC με ακινητοποιημένα Ni<sup>2+</sup> σε σφαιρίδια σεφαρόζης (His-Trap, GE Healthcare)

Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM β-GP, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole pH 7.0 (διάλυμα A) με ροή 0.3 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με ροή 0.3 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 10 mL (flow through). Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα A με ροή 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL (Wash). Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με ροή 0.5 mL/min με διάλυμα που περιείχε 20 mM β-GP, 0.5 M NaCl, 0.5 M Imidazole pH 7.0 (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και συγκεντρώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη. Ακολούθησε προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Έπειτα το πρωτεϊνικό διάλυμα υπέστη διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM DTT (διάλυμα A της Resource Q), υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 4 °C για 16 ώρες, για να απομακρυνθεί το NaCl.

#### Δεύτερο βήμα: Στήλη ιοντοανταλλαγής Resource Q (GE, HealthCare)

Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος. Στο pH 8 η hIGPb έχει αρνητικό φορτίο και έτσι μπορεί να προσδεθεί σε στήλη που είναι θετικά φορτισμένη, όπως η στήλη Resource Q. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM DTT (διάλυμα A) με ροή 0.5 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με ροή 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (flow through). Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα A και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (wash). Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM DTT (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 mL. Πιο συγκεκριμένα η έκλουση έγινε για 40 min, από 0-40 % του διαλύματος B, δηλαδή σε κάθε κλάσμα (1 mL) το NaCl αυξανόταν ανά 20 mM. Μετά το πέρας της έκλουσης με διαβάθμιση συγκέντρωσης έγινε εφαρμογή 100 % του διαλύματος B ώστε να απομακρυνθούν οι ισχυρά προσδεμένες πρωτεΐνες στη στήλη. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και συγκεντρώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη. Ακολούθησε προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών και προστέθηκε πρωτεάση TEV σε αναλογία 1 mg TEV για 40 mg ολικής πρωτεΐνης.

### Τρίτο βήμα: IMAC με ακινητοποιημένα Ni<sup>2+</sup> σε σφαιρίδια σεφαρόζης (His-Trap, GE Healthcare)

Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, 20 mM imidazole (διάλυμα A) με ροή 0.5 mL/min. Η εφαρμογή του δείγματος έγινε με ροή 0.3 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL, στα οποία αναμενόταν να βρίσκεται η τμημένη πρωτεΐνη (flow through). Η πλύση της στήλης έγινε με ροή 0.5 mL/min με το διάλυμα A και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (wash). Η έκλουση της άτμητης πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με ροή 0.5 mL/min με διάλυμα που περιέχει 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και η πρωτεΐνη όπως αναμενόταν βρισκόταν στο Flow Through, καθώς δεν διαθέτει την His-Tag που της επιτρέπει να δεθεί στη στήλη, καθώς αυτή η ετικέτα απομακρύνθηκε με τη δράση της πρωτεάσης TEV.

Έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και αυτά που περιείχαν τη hIGPb σε υψηλή καθαρότητα συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 30000 Daltons. Κάναμε διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στα 4000g, ώστε πάνω από το φίλτρο να μείνουν περίπου 100 μL πρωτεΐνης. Τέλος, προσδιορίσαμε την ολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Bradford.

#### **2.12 Φωσφορυλίωση της GP**

Η φωσφορυλίωση της GP γίνεται, από την PhK και συγκεκριμένα από την γ-καταλυτική της υπομονάδα στη Ser14 της GP.

Η φωσφορυλίωση της hIGPb που απομονώθηκε έγινε παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος 1X Hepes, 1 mM ATP, 16 ng/mL PhK. Βρέθηκε ότι ο ελάχιστος δυνατός όγκος φωσφορυλίωσης είναι 120 μL, ώστε στο διάλυμα φωσφορυλίωσης οι συγκεντρώσεις να είναι 1X Hepes, 1 mM ATP, 16 ng/mL PhK. Η PhK που βρισκόταν σε stock 0,9 mg/ml, αραιώθηκε ώστε στο διάλυμα φωσφορυλίωσης να βρίσκεται σε συγκέντρωση 16 ng/ml. Το διάλυμα αραιώσεως κινάσης περιέχει 1X Hepes και 5 mg/mL BSA. Η ATP προστέθηκε τελευταία ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση η οποία έλαβε χώρα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C για 1h:30min στο σκοτάδι και έπειτα ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με τη προσθήκη του πρωτεϊνικού μίγματος σε πάγο.

Όγκος φωσφορυλίωσης 120  $\mu$ L:

0,2 mg/ml hIGPb

1X HEPES

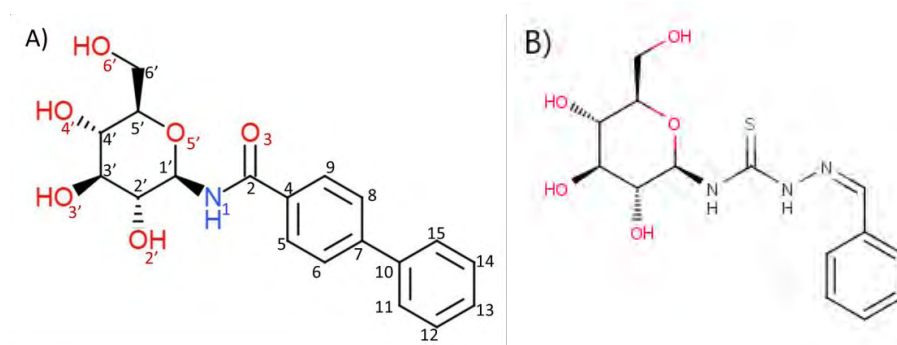
1 mM ATP

16 ng/ml Phk

### 2.13 Κινητικές μελέτες έναντι της GP

Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση είναι αμφίδρομη. Στις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήσαμε *in vitro* έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μελετήσαμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, προς τη σύνθεση του γλυκογόνου, δηλαδή την ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο ώστε να προκύψει γλυκογόνο με ένα περισσότερο κατάλοιπο γλυκόζης με παράλληλη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών από την G1P. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά ώστε να ποσοτικοποιηθούν.

Οι αναστολείς που μελετήσαμε έχουν σχεδιαστεί με βάση την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου, ώστε να μιμούνται τις αλληλεπιδράσεις της γλυκόζης με την κλειστή θέση του βρόχου 280s. Οι κινητικές μελέτες έγιναν στην gmGPb και την hIGPa, οπότε όπως περιγράφηκε έπρεπε αρχικά να γίνει φωσφορυλίωση της hIGPb, ώστε να μεταβεί από την ανενεργή κατάσταση b στην δραστική a [35]. Οι δύο ενώσεις που μελετήθηκαν, 6077 και 5903 παρουσιάζονται στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21: Οι χημικές δομές των αναστολέων A) 6077 και B) 5903.

#### 2.13.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου

Η αρχή της μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων βασίζεται στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του φωσφόρου, με τη δημιουργία χρωμοφόρου συμπλόκου ένωσης. Το ανόργανο φωσφορικό σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία  $Zn^{2+}$  σε pH 5, το οποίο απορροφά ισχυρά την υπεριώδη ακτινοβολία.

Μετά από αναγωγή με το ασκορβικό οξύ, παράγεται ένα χρωμοφόρο σύμπλοκο το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 850 nm. Απουσία ορθοφωσφορικών ιόντων το χρωμοφόρο σύμπλοκο δεν παράγεται.

Το σύμπλοκο φωσφομολυβδενικού μειώνεται από το ασκορβικό οξύ σε pH 5 παρουσία  $Zn^{2+}$ . Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό αντιδράσεων απελευθέρωσης ορθοφωσφορικών ιόντων, όπως για τον προσδιορισμό της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Γίνεται παρασκευή των διαλυμάτων:

- Μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100 mM οξικού ψευδαργύρου. Το pH του μίγματος ρυθμίστηκε στο 5.0 με πυκνό HCl και φυλάξαμε το διάλυμα σε αδιαφανές μπουκάλι και μακριά από ηλιακή ακτινοβολία σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH έγινε με πυκνό NaOH και φυλάξαμε το διάλυμα σε αδιαφανές μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα ασκορβικού οξέος παρασκευάζεται φρέσκο κάθε φορά.

Αφού ετοιμάστηκαν τα δύο διαλύματα και έγινε η ρύθμιση του pH, αναμίξαμε το διάλυμα οξικού ψευδαργύρου/μολυβδαινικού αμμωνίου με το διάλυμα ασκορβικού οξέος σε αναλογία 4:1 σε ένα αδιαφανές σκούρο δοχείο. Αφήσαμε το μίγμα για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση. Στη συνέχεια προσθέσαμε στα δείγματα κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος και αφήσαμε να γίνει επώαση σε θερμοκρασία 30° C για άλλα 15 min σε υδατόλουτρο. Ο ανόργανος φώσφορος που υπάρχει σχηματίζει σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου ( $Zn^{2+}$ ) το οποίο ανάγεται από το ασκορβικό οξύ και παράγεται ένα χρωμοφόρο που έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. Για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε την ποσότητα των ορθοφωσφορικών ανιόντων σε ένα δείγμα, πρέπει να παρασκευάσουμε ένα δείγμα αναφοράς ορθοφωσφορικών ανιόντων, στο οποίο θα μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση, ώστε να το χρησιμοποιήσουμε ως πρότυπο για τον υπολογισμό της ποσότητας στο άγνωστο δείγμα [36].

### 2.13.2 Ενζυμικό διάλυμα

Το ενζυμικό διάλυμα που παρασκευάσαμε είχε συγκέντρωση 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για την rmGPb και 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  για την hIGPa σε όγκο 240  $\mu\text{L}$  ώστε στον όγκο της αντίδρασης, που ήταν 180  $\mu\text{L}$ , να είχαμε 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  rmGPb και 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hIGPa. Στο ενζυμικό διάλυμα προσθέσαμε GP, γλυκογόνο και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 σε αναλογίες:

<b>rmGPb</b>	
<b>Αρχικές συγκεντρώσεις</b>	<b>Τελικές συγκεντρώσεις</b>
Glycogen 10% (w/v), 24 $\mu$ L	Glycogen 1% (w/v)
Ρυθμιστικό διάλυμα 50/50/1 12 $\mu$ L	Ρυθμιστικό διάλυμα 2.5/2.5/0.05
rmGPb 5 $\mu$ g/ml, 8.6 $\mu$ L	rmGPb 3 $\mu$ g/mL,
dH <sub>2</sub> O 195.4 $\mu$ L	
<b>Υτελ= 240 <math>\mu</math>L</b>	

<b>hIGPa</b>	
<b>Αρχικές συγκεντρώσεις</b>	<b>Τελικές συγκεντρώσεις</b>
Glycogen 10% (w/v), 24 $\mu$ L	Glycogen 1% (w/v)
hIGPa 5 $\mu$ g/mL	hIGPa 1 $\mu$ g/mL
TEA buffer	
dH <sub>2</sub> O	
<b>Υτελ= 240 <math>\mu</math>L</b>	

Αφήσαμε το ενζυμικό διάλυμα σε θερμοκρασία 30 °C σε υδατόλουτρο για 15 min ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του ενζύμου με το γλυκογόνο

### 2.13.3 Υποστρώματα

Το υπόστρωμα στις παρούσες κινητικές μελέτες ήταν η  $\alpha$ -D-1-φωσφορική γλυκόζη, καθώς μελετήσαμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης που καταλύει η φωσφορυλάση, δηλαδή της προσθήκη της G1P στο μακρομόριο του γλυκογόνου.

Παρασκευάζουμε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 1 (Assay Buffer 1) που περιέχει 400 mM KCl, 200 mM ιμιδαζόλιο, 4 mM DTT, 4 mM EDTA. Από αυτό με αραιώση παρασκευάζουμε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 2 (Assay Buffer 2) 270 mM KCl, 135 mM ιμιδαζόλιο, 2.7 mM DTT, 2.7 mM EDTA. Σε αυτό βρίσκονται οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος που μελετάμε. Αρχικά, παρασκευάσαμε ένα πυκνό υδατικό διάλυμα G1P με συγκέντρωση 400 mM στο οποίο ρυθμίσαμε το pH στο 6.8 και το αποθηκεύσαμε σε θερμοκρασία -20 °C, αφού πρώτα το διαμοιράσαμε σε κλάσματα των 500  $\mu$ L. Από τα 400 mM παρασκευάσαμε G1P με συγκέντρωση 90 mM ως εξής:

<b>Αρχικές συγκεντρώσεις</b>	<b>Τελικές συγκεντρώσεις</b>
G1P 400 mM 788 $\mu$ L	G1P 90 mM
dH <sub>2</sub> O 350 $\mu$ L	Assay Buffer 2
Assay Buffer 1 2362 $\mu$ L	
<b>Υτελ= 3500 <math>\mu</math>L</b>	

Οι υπόλοιπες αραιώσεις G1P που χρησιμοποιήσαμε παρασκευάστηκαν με αραιώση από την G1P 90 mM χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2.

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	[G1P] mM στα 180 $\mu$ L της αντίδρασης
G1P 90 mM 100 $\mu$ L Assay buffer 2100 $\mu$ L	G1P 45 mM Vτελ= 200 $\mu$ L	10
G1P 90 mM 1200 $\mu$ L Assay buffer 2800 $\mu$ L	G1P 27 mM Vτελ= 500 $\mu$ L	6
G1P 90 mM 800 $\mu$ L Assay buffer 3200 $\mu$ L	G1P 18 mM Vτελ= 4000 $\mu$ L	4
G1P 27 mM 600 $\mu$ L Assay buffer 3400 $\mu$ L	G1P 13.5 mM Vτελ= 4000 $\mu$ L	3
G1P 90 mM 400 $\mu$ L Assay buffer 3600 $\mu$ L	G1P 9 mM Vτελ= 4000 $\mu$ L	2
G1P 9 mM 200 $\mu$ L Assay buffer 3800 $\mu$ L	G1P 4.5 mM Vτελ= 4000 $\mu$ L	1

Βάλαμε τα υποστρώματα για επώαση για 30 min στους 30°C όταν έχουν περάσει 12 min από την στιγμή που τοποθετήσαμε για επώαση στους 30°C το ενζυμικό διάλυμα.

#### Προσδιορισμός της $K_m$

Για τον προσδιορισμό της  $K_m$  λάβαμε 36  $\mu$ L από το ενζυμικό διάλυμα και τα προσθέσαμε στα 144  $\mu$ L του πρώτου διαλύματος υποστρώματος. Εκείνη τη χρονική στιγμή, όπου  $t=0$ , ξεκίνησε η ενζυμική αντίδραση η οποία εξελίχθηκε σε όγκο αντίδρασης ίσο με 180  $\mu$ L. Οι συγκεντρώσεις της G1P ήταν 2, 3, 4, 6, 10 mM για την  $rmGPb$ , ενώ για την  $hlGPa$  ήταν 1, 2, 3, 4, 6 mM. Στη συνέχεια του πειράματος, για την  $rmGPb$ , πήραμε 40  $\mu$ L από το μίγμα της αντίδρασης ανά 1, 2, 3, 4 min, και τα αποθέσαμε σε 10  $\mu$ L SDS 1 %. Κατόπιν κάναμε έντονη ανάδευση ώστε να σταματήσει πλήρως η αντίδραση. Για την  $hlGPa$  πήραμε 40  $\mu$ L από το μίγμα της αντίδρασης ανά 5, 10, 15, 20 min και τα αποθέσαμε σε 10  $\mu$ L SDS 1 % για να σταματήσει πλήρως η αντίδραση. Αφού τελειώσαμε με όλες τις συγκεντρώσεις της G1P, τοποθετήσαμε τα δείγματα σε θερμοκρασία 4 °C.

#### Προσδιορισμός της $K_{mapp}$

Για τον προσδιορισμό των  $K_{mapp}$  το παραπάνω πείραμα έγινε παρουσία μιας σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα κάθε φορά.



### Προσδιορισμός της $K_i$

Ο προσδιορισμός της  $K_i$  έγινε με τουλάχιστον 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα.

- Για τον αναστολέα 6077 έναντι της hIGPa μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 30  $\mu$ M.
- Για τον αναστολέα 5903 έναντι της rmGPb μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 30  $\mu$ M και επίσης έναντι της hIGPa μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 25  $\mu$ M.

### Υποστρώματα rmGPb

Για την  $K_m$

<b>G1P (από stock mM)</b>	40 $\mu$ L (9mM)	40 $\mu$ L (13.5mM)	40 $\mu$ L (18mM)	40 $\mu$ L (27 mM)	40 $\mu$ L (45mM)
<b>dH<sub>2</sub>O <math>\mu</math>L</b>	93.2 $\mu$ L	93.2 $\mu$ L	93.2 $\mu$ L	93.2 $\mu$ L	93.2 $\mu$ L
<b>100% DMSO</b>	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L
<b>AMP</b>	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L
<b>Ντελ</b>	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L

Για την  $K_{mapp}$

<b>G1P (από stock mM)</b>	40 $\mu$ L (9mM)	40 $\mu$ L (13.5mM)	40 $\mu$ L (18mM)	40 $\mu$ L (27 mM)	40 $\mu$ L (45mM)
<b>dH<sub>2</sub>O <math>\mu</math>L</b>	93.2 $\mu$ L	93.2 $\mu$ L	93.2 $\mu$ L	93.2 $\mu$ L	93.2 $\mu$ L
<b>Inhibitor (100% DMSO)</b>	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L
<b>AMP</b>	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L
<b>Ντελ</b>	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L

## Υποστρώματα hIGPa

Για την  $K_m$

<b>G1P (από stock mM)</b>	40 $\mu$ L (4.5mM)	40 $\mu$ L (9mM)	40 $\mu$ L (13.5mM)	40 $\mu$ L (18 mM)	40 $\mu$ L (27mM)
<b>dH<sub>2</sub>O <math>\mu</math>L</b>	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L
<b>100% DMSO</b>	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L
<b>Ντελ</b>	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L

Για την  $K_{mapp}$

<b>G1P (από stock mM)</b>	40 $\mu$ L (4.5mM)	40 $\mu$ L (9mM)	40 $\mu$ L (13.5mM)	40 $\mu$ L (18 mM)	40 $\mu$ L (27mM)
<b>dH<sub>2</sub>O <math>\mu</math>L</b>	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L	100.4 $\mu$ L
<b>Inhibitor (100% DMSO)</b>	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L	3.6 $\mu$ L
<b>Ντελ</b>	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L

Η hIGPa είναι ενεργή και παρουσία υποστρώματος βρίσκεται στην R-στερεοδιαμόρφωση με αποτέλεσμα να μη χρειάζεται κάποιον αλλοστερικό ενεργοποιητή (AMP) για να ενεργοποιηθεί, όπως συμβαίνει με την rmGPb (αλλοστερική μετάπτωση από την T στην R). Άρα τα διαλύματα υποστρωμάτων για την rmGPb και hIGPa είναι :

Στη συνέχεια, παρασκευάσαμε διαλύματα τα οποία είχαν ρόλο “τυφλού μάρτυρα” και περιείχαν μόνο την ένωση ή το μίγμα για το οποίο θέλαμε να μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση. Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάστηκαν εις διπλούν τα οποία περιείχαν όλα 10  $\mu$ L SDS 1 % (w/v).

<b>Τυφλό H<sub>2</sub>O</b>	10 $\mu$ L SDS 1 % (w/v)+ 40 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O
<b>Τυφλό ενζυμικού διαλύματος</b>	10 $\mu$ L SDS 1 % (w/v)+ 32 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O + 8 $\mu$ L ενζυμικού διαλύματος
<b>Τυφλό G1P</b>	10 $\mu$ L SDS 1 % (w/v)+ 31.1 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O + 8.9 $\mu$ L από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση G1P
<b>Τυφλό φωσφορικών</b>	10 $\mu$ L SDS 1 % (w/v)+ 30 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O + 10 $\mu$ L Pi 1 mM

Επομένως σε 40  $\mu$ L των τυφλών είχαμε 5  $\mu$ g/mL rmGPa ή 1  $\mu$ g/mL hIGPa , 10 mM G1P για την rmGPb και 6 mM G1P για την hIGPa και 0.25 mM Pi. Από την απορρόφηση που πήραμε για τα 10 mM G1P, κάναμε αναγωγή για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις.

Μετά το πέρας της διαδικασίας παρασκευάσαμε το διάλυμα φωτομέτρησης, όπως περιγράφηκε.. Μετά τα 15 min επώασης του μίγματος του διαλύματος φωτομέτρησης, προσθέσαμε σε κάθε δείγμα, αλλά και στα τυφλά, 700 μL διαλύματος φωτομέτρησης στη gmGPb και 500 μL διαλύματος φωτομέτρησης στη hIGPa. Στη συνέχεια κάναμε ανάδευση και τα τοποθετήσαμε στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C για 15 min, ώστε να δημιουργηθεί το χρωμοφόρο σύμπλοκο. Τέλος μετρήσαμε τις απορροφήσεις σε μήκος κύματος 850 nm αφού πρώτα μηδενίσαμε με το τυφλό του dH<sub>2</sub>O. Παρ' ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη είναι ασταθής σε όξινο pH, στο pH 5.0 είναι αρκετά σταθερή. Οπότε, αυτή η φασματοφωτομετρική μέθοδος είναι κατάλληλη για τη μέτρηση του φωσφόρου που παράγεται κατά την αντίδραση της GP που μελετήσαμε.

#### 2.13.4 Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων και η παραγωγή των απαιτητών διαγραμμάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα GraFit [37]. Προκειμένου να υπολογιστούν οι κινητικές παράμετροι ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$ ) έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήσαμε. Η ειδική δραστηριότητα ορίζεται ως τα μολ υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε mg πρωτεΐνης, δηλαδή μολ/min/mg.

Για να υπολογίσουμε την ειδική δραστηριότητα από τα αποτελέσματα του κινητικού πειράματος, έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε τα μολ φωσφορικών που παρήχθησαν από την αντίδραση. Για το λόγο αυτό είχαμε παρασκευάσει ένα πρότυπο διάλυμα φωσφορικών το οποίο είχε συγκέντρωση 0.25 mM. Τα 0.25 mM φωσφορικών αντιστοιχούσαν σε 0.01 μολ φωσφορικών, διότι:

$$0.25 \text{ mM} = 0.25 \text{ mmol/Lt} = 0.25 \text{ μmol/mL}$$

Άρα στα 1000 μL περιέχονταν 0.25 μολ φωσφορικών. Επομένως, στα 40 μL που ήταν ο όγκος του τυφλού των φωσφορικών που φωτομετρήσαμε είχαμε 0.01 μολ φωσφορικών. Αν υποθέσουμε ότι το τυφλό των φωσφορικών είχε απορρόφηση A, τότε αυτή η απορρόφηση δηλώνει την παρουσία 0.01 μολ φωσφορικών. Με αυτό τον τρόπο υπολογίσαμε την ποσότητα των φωσφορικών σε μολ για κάθε δείγμα. Ας υποθέσουμε ότι μία μέτρηση έδωσε απορρόφηση B. Για να υπολογίσουμε μόνο τα μολ φωσφορικών που υπήρχαν μέσα στο δείγμα έπρεπε να αφαιρέσουμε τις απορροφήσεις που προήλθαν από το ενζυμικό διάλυμα και την G1P. Έτσι, η απορρόφηση των φωσφορικών ισούταν με

$$(B - Abs_{\text{τυφλού ενζυμικού διαλύματος}} - Abs_{\text{τυφλού G1P}}) = Abs_{\text{φωσφορικών του δείγματος}} = C$$

Εφόσον γνωρίζουμε ότι τα 0.01 μmol έδωσαν απορρόφηση A, τότε τα μmol των φωσφορικών στο δείγμα ισούταν με:

$$\frac{c \times 0.01}{A} \text{ ή } \frac{B}{A * 100} = \text{μmol φωσφορικών στο άγνωστο δείγμα}$$

Έπειτα, υπολογίσαμε την ειδική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας μη γραμμική εξίσωση λαμβάνοντας υπόψη το ανώτατο όριο υδρόλυσης και ένα συντελεστή f.

Όπου,

$$\text{limit} = 0.78 \cdot [G1P] \cdot \text{assay volume}$$

0.78 είναι το % (78%) ποσοστό της G1P που έχει καταναλωθεί για παραγωγή ορθοφωσφορικών ιόντων όταν η αντίδραση φτάσει σε ισορροπία. [G1P] η συγκέντρωση της G1P στην αντίδραση Assay volume: Ο όγκος που λάβαμε για να σταματήσουμε την αντίδραση (40 μL). Και,

$$f = \frac{\text{limit}}{\text{assay volume} \times c}$$

Όπου C, η συγκέντρωση του ενζύμου στον όγκο της αντίδρασης που ισούταν με  $3 \times 10^{-3}$  mg/mL για τη rmGPb και με  $1 \times 10^{-3}$  mg/mL για τη hGPb.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ , mM) και των φαινομενικών σταθερών Michaelis-Menten ( $K_{mapp}$ , mM) παρουσία αναστολέων, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Michaelis-Menten:

$$v = V_{max}[S] / K_M + [S]$$

: ταχύτητα

$V_{max}$ : μέγιστη ταχύτητα

[S]: συγκέντρωση υποστρώματος

$K_M$ : σταθερά Michaelis-Menten.

Τέλος, έγινε η καμπύλη (non linear fit)  $V=f([S])$ , η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού. Η  $K_m$  και οι  $K_{m(app)}$ , υπολογίστηκαν από το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου Lineweaver-Burk. Για τον υπολογισμό της  $K_i$ , αφού υπολογίστηκαν πρώτα οι  $K_{mapp}$  παρουσία του αναστολέα, κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα που στον γγ' άξονα τοποθετήθηκαν οι τιμές των  $K_{mapp}$  και στον χχ' οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν. Τέλος, χρησιμοποιώντας γραμμική εξίσωση (linear fit)

υπολογίστηκε η  $K_i$  στο σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα  $x'$ , το σημείο αυτό ισούται με το  $-K_i$ . Η γραμμική αυτή εξίσωση ήταν του τύπου:

$$y = ax + b$$

όπου,  $a$  είναι η κλίσης της ευθείας (gradient ή slope)

$b$  είναι η τεταγμένη επί της αρχής (intercept)

## 2.14 Κρυσταλλογραφικές Μελέτες

### 2.14.1 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι της  $rmGPb$  (T-διαμόρφωση) θα πρέπει στο διάλυμα του ενζύμου να μην υπάρχει AMP, διότι όπως αναφέραμε, η AMP μετατοπίζει την ισορροπία προς την ενεργό R στερεοδιαμόρφωση. Για το λόγο αυτό ακολουθήθηκε διαδικασία για την απομάκρυνση του από την πρωτεΐνη.

Το διάλυμα του ενζύμου υπέστη διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος BES, pH 6.7 που αποτελούταν από 10 mM BES (1 mM EDTA, 0.02 (w/v) %  $NaN_3$ , 2 mM DTT) και στο οποίο είχε προστεθεί ενεργός ζωάνθρακας. Η διαπίδυση έγινε αρχικά για περίπου 1 h σε θερμοκρασία δωματίου, για να αποφευχθεί η κρυστάλλωση του ενζύμου και ακολούθως για 16 h σε θερμοκρασία 4 °C. Ο ενεργός ζωάνθρακας προστέθηκε σε αναλογία: 1 mg ανά μισό mg πρωτεΐνης. Πριν την προσθήκη έγινε πλύση της ποσότητας του ενεργού ζωάνθρακα με το ρυθμιστικό διάλυμα BES και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση και αποχύσαμε το υπερκείμενο. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε εκ νέου σε ρυθμιστικό διάλυμα BES και προστέθηκε στο διάλυμα της διαπίδυσης. Η διαδικασία αυτή γίνεται ώστε ο ενεργός ζωάνθρακας κατά την προσθήκη του στη διαπίδυση να έχει ίδιο pH με το ρυθμιστικό διάλυμα.

Μετά το πέρας των 16 h της διαπίδυσης πραγματοποιήθηκε κατεργασία με προσθήκη ενεργού ζωάνθρακα απευθείας στο ενζυμικό διάλυμα, στην ίδια αναλογία, για την απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων. Και σε αυτή την περίπτωση έγιναν πρώτα δυο πλύσεις του ζωάνθρακα με το ρυθμιστικό διάλυμα BES και έπειτα προστέθηκε στο πρωτεϊνικό διάλυμα και ακλούθησε ήπια ανάδευση για 15 min. Στη συνέχεια, έγινε φυγοκέντρηση, φυλάξαμε το υπερκείμενο και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Είχε προηγηθεί φιλτράρισμα από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0.45  $\mu m$  ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ενεργού ζωάνθρακα. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων ( $A_{260}/A_{280}$ ) πρέπει να είναι  $< 0.53$ . Εάν ο λόγος ήταν υψηλότερος, γινόταν επανάληψη της διαδικασίας της προσθήκης ενεργού ζωάνθρακα στο πρωτεϊνικό διάλυμα.

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Έτσι δίνεται ο χρόνος στην πρωτεΐνη να οργανωθεί σε κρυστάλλους και όχι σε άμορφο ίζημα. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T- διαμόρφωση) έγινε σύμφωνα με την μέθοδο batch. Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι.

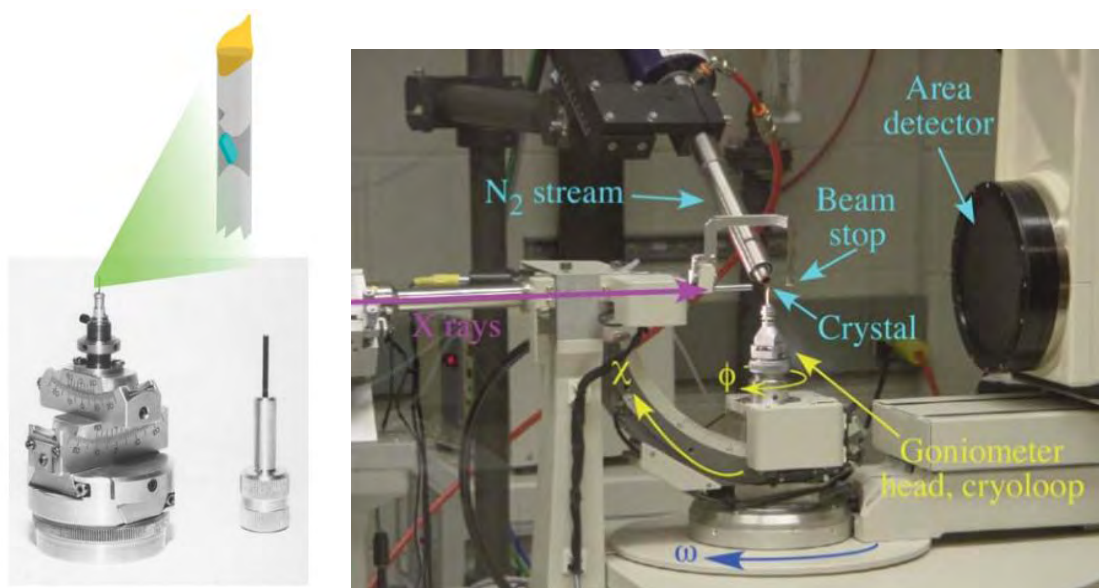
Οι κρύσταλλοι της φυσικής T διαμόρφωσης της GPb αναπτύσσονται από μίγμα 20-30 mg/ml καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 10 mM BES/HCl (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v)  $\text{NaN}_3$  στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραιώσης [Oikonomakos *et al.*, 1985]. Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 h στους  $16^\circ\text{C}$ , ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αναστολέας πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της συγκρυστάλλωσης είτε με τη μέθοδο του εμποτισμού προσχηματισμένων κρυστάλλων του ενζύμου με διάλυμα αναστολέα, όπου η ουσία διαχέεται εντός των καναλιών του κρυστάλλου και συνδέεται στην πρωτεΐνη, στο κέντρο σύνδεσης για το οποίο παρουσιάζει συγγένεια. Στην περίπτωση όπου το σύμπλοκο σχηματίζεται με τη μέθοδο του εμποτισμού ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες θα γίνει η συλλογή δεδομένων (κρυογενείς συνθήκες ή σε θερμοκρασία δωματίου) ακολουθείται διαφορετική διαδικασία. Οι κρύσταλλοι αρχικά μεταφέρονται σε διάλυμα BES (10mM BES, 1mM EDTA 2%  $\text{NaN}_3$ , 2 mM DTT pH 6.7) εντός τριβλίου Petri. Στη συνέχεια, επιλέγονται μεμονωμένοι κρύσταλλοι οι οποίοι δεν φέρουν ορατές προσμίξεις ή άλλες εναποθέσεις μικροκρυστάλλων στην επιφάνειά τους οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή δεδομένων.

Στην περίπτωση συλλογής σε θερμοκρασία δωματίου οι κρύσταλλοι μεταφέρονται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur μέσα σε μικρούς τριχοειδείς σωλήνες και το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο τον περιβάλλει απομακρύνεται με χρήση μικρών λωρίδων απορροφητικού χαρτιού για να αντικατασταθεί από το διάλυμα του αναστολέα που θα μελετηθεί. Οι σωλήνες αυτοί είχαν μήκος περίπου 3 cm, εσωτερική διάμετρο 2-3 mm, με τα άκρα τους καλά κλειστά με parafilm. Στη συνέχεια το διάλυμα απομακρύνεται από το σωλήνα και στα δύο του άκρα τοποθετείται μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος BES (για την αποφυγή αφυδάτωσης του κρυστάλλου). Τέλος ο τριχοειδής σωλήνας σφραγίζεται και στα δύο του άκρα με τη χρήση μικρής ποσότητας κεριού και τοποθετείται στο γωνιόμετρο για την έκθεση του στη δέσμη ακτίνων X.

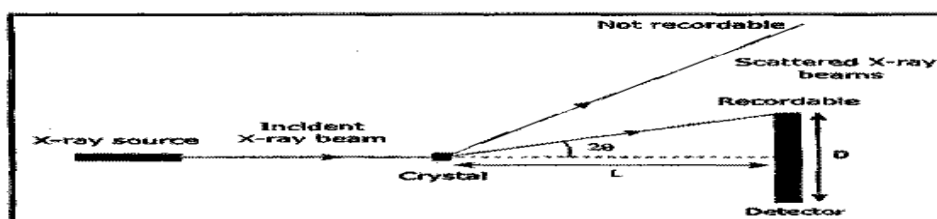
## 2.14.2 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του τρόπου πρόσδεσης των υπό μελέτη αναστολέων στη GP. Ο κρύσταλλος της gmGPb (T-στερεοδιαμόρφωση) τοποθετήθηκε σε τριχοειδή σωλήνα και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε γωνιόμετρο και όλο το σύστημα στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη κατάλληλη υποδοχή ανάμεσα στον ανιχνευτή και την πηγή της ακτινοβολίας. Ο κρύσταλλος ευθυγραμμίστηκε ως προς την διεύθυνση της δέσμης της ακτινοβολίας με ρυθμίσεις του γωνιόμετρου. Η έκθεση του μονοκρυστάλλου της πρωτεΐνης σε ακτίνες-X, έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων των ατόμων, που αποτελούν την πρωτεΐνη, με την ακτινοβολία X και την απελευθέρωση δευτερογενούς ακτινοβολίας. Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας μετρήθηκε με ειδικούς ανιχνευτές και διεξήχθη συλλογή περιθλασιγραμμάτων. Αυτά τα περιθλασιγράμματα αποτέλεσαν τα πειραματικά δεδομένα τα οποία στη συνέχεια επεξεργάστηκαν για τη μέτρηση της έντασης των αμαυρώσεων οι οποίες σταθμίστηκαν και συγχωνεύτηκαν με κατάλληλα λογισμικά ώστε να υπολογιστεί η ηλεκτρονική πυκνότητα της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου.



Εικόνα 22 : Αριστερά: πλήρης κεφαλή γωνιομέτρου, με υποδοχή τριχοειδούς σωλήνα στην κορυφή. Δεξιά: Στην εικόνα φαίνεται ένα περιθλασίμετρο 4 κύκλων. Οι ακτίνες X προέρχονται από τα δεξιά από μία περιστρεφόμενη άνοδο (δε διακρίνεται) και κατευθύνονται για να χτυπήσουν τον κρύσταλλο. Ένας CCD ανιχνευτής ανιχνεύει τις ανακλάσεις. Ο κρύσταλλος διατηρείται παγωμένος από ένα ρεύμα ψυχρού αέριου αζώτου. Η μικρή θολερότητα ακριβώς δεξιά της κεφαλής του γωνιομέτρου είναι η συμπύκνωση της υγρασίας του αέρα καθώς ψύχεται από το ρεύμα αζώτου. Η περιστροφή του κρυστάλλου γύρω από τους άξονες  $\phi$  και  $\chi$  κατευθύνει πολλές ανακλάσεις προς τον ανιχνευτή. Στη διάταξη που παρουσιάζεται, οι άξονες  $\phi$ ,  $2\theta$  και  $\omega$  συμπίπτουν [38]

Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού καταχωρούνται όλα τα χαρακτηριστικά του πειράματος: μήκος κύματος ακτινοβολίας ( $\lambda$ ), απόσταση ανιχνευτή-κρυστάλλου ( $d$ ), χρόνος έκθεσης ( $t$ ), γωνία περιστροφής και αριθμός εικόνων. Ο καθορισμός της απόστασης κρυστάλλου-ανιχνευτή γίνεται σύμφωνα με το νόμο του Bragg και δεδομένων της διαμέτρου του ανιχνευτή, του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της επιθυμητής μέγιστης ευκρίνειας. Στην Εικόνα 23 παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της διάταξης του πειράματος περίθλασης ακτινών-X



Εικόνα 23: Η πηγή ακτινών-X εκπέμπει ακτινοβολία η οποία και προσπίπτει στον κρύσταλλο. Σύμφωνα με το νόμο του Bragg, η ακτινοβολία περιθλάται υπό γωνία  $2\theta$  και μετράται από ανιχνευτή που βρίσκεται σε απόσταση  $L$  από το κρύσταλλο. Σύμφωνα με τη διάταξη γίνεται καταγραφή μόνο των ανακλάσεων που πληρούν τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του τριγώνου: κρύσταλλος-κέντρο ανιχνευτή-άκρο ανιχνευτή. Από το νόμο του Bragg καθορίζεται η γωνία  $\theta$  ( $2\theta$  αποτελεί η γωνία μεταξύ του επιπέδου διάδοσης της ακτίνας και της ανακλώμενης ακτίνας), από τη διάταξη η απόσταση  $L$ , έτσι ώστε να έχουμε την επιθυμητή ευκρίνεια [38].

### 2.14.3 Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου

Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο τη δομή της  $T$  διαμόρφωσης της φωσφορυλάσης  $b$  του γλυκογόνου (Leonidas et al, unpublished) με τη βοήθεια του προγράμματος REFMAC [37, 40] που εμπεριέχεται στη συλλογή προγραμμάτων CCP4 [41]. Έγιναν πολλαπλοί κύκλοι διόρθωσης του μοντέλου με το πρόγραμμα Coot [42, 43] και βελτιστοποίησης με το REFMAC [39,40]. Μόρια ύδατος προστέθηκαν στο μοντέλο εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπιζονταν στον ηλεκτρονικό χάρτη  $2F_{obs}-F_{calc}$ . Τα μόρια των αναστολέων συμπεριλήφθηκαν επίσης στα τελικά στάδια της διαδικασίας της βελτιστοποίησης (refinement) και τα αρχικά τους μοντέλα προήλθαν με τη βοήθεια του προγράμματος ChemDraw. Τέλος, η βελτιστοποίηση των ιστροπικών παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων βελτίωσε αισθητά το τελικό μοντέλο.

Ο υπολογισμός των διαφορικών χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας  $F_{obs}-F_{calc}$  και  $2F_{obs}-F_{calc}$ , στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης αποκάλυψαν επιπρόσθετη ηλεκτρονική πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Ακολούθησε διαδοχική βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στους νέους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πακέτο προγραμμάτων CCP4 [41]. Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία



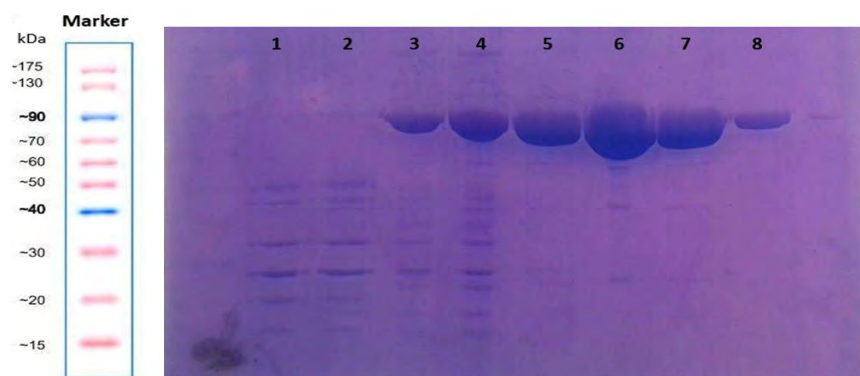
στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $F_{obs}-F_{calc}$  και  $2F_{obs}-F_{calc}$ . Η δομή του συμπλόκου GPb-αναστολέων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των εν δυνάμει δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων Van der Waals που μπορεί να σχηματίζει ο αναστολέας με τα αμινοξέα που απαρτίζουν καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CONTACT του CCP4 με όριο απόστασης 3.35 Å για τους δεσμούς υδρογόνου και 4.0 Å για τις αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Τέλος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα γραφικών CCP4 Molecular Graphics (mg) για την απεικόνιση των τρισδιάστατων μακρομοριακών μορίων [44].

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών

##### 3.1.1 Καθαρισμός και απομόνωση της gmGPb

Η απομόνωση της gmGPb έγινε από συνολικά 3 κόνικλους. Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10 % υπό αποδιατακτικές συνθήκες, στην οποία αναλύθηκαν ως προς την καθαρότητα και την ποσότητα, δείγματα από τα διάφορα στάδια της μεθόδου.

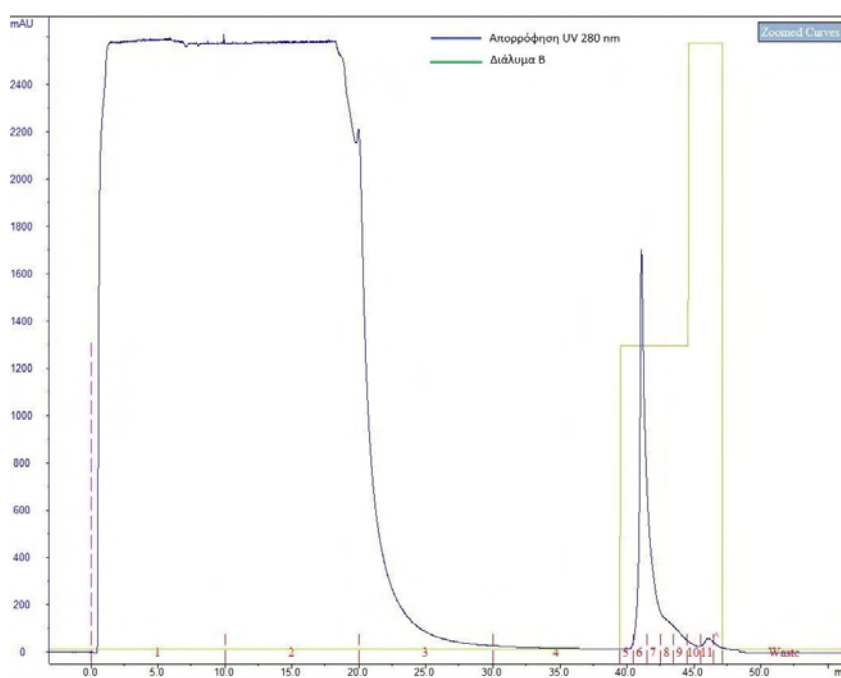


**Εικόνα 3.1:** 10% SDS-PAGE, από την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κόνικλων (97 kDa). Αρχικά, παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Έπειτα, διαδρομή 1: στο τέλος της διαδικασίας παραλαβής του μυϊκού εκχυλίσματος, αφού διηθηθεί μέσω υαλοβάμβακα, διαδρομή 2: πριν την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο και συγκεκριμένα στην καταβύθιση των πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον πριν την ρύθμιση του pH, διαδρομή 3 ( $3^H$  ΗΜΕΡΑ) μετά από διαύγαση και ογκομέτρηση για προσθήκη EDTA και β-μερκαπτοαιθανόλης, Διαδρομή 4: στάδιο κρυστάλλωσης και ανακρυστάλλωσης της GPb, ογκομέτρηση πριν την προσθήκη AMP, διαδρομή 5: πρώτη κρυστάλλωση, διαδρομή 6: δεύτερη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 7: τρίτη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 8: τέταρτη ανακρυστάλλωση.

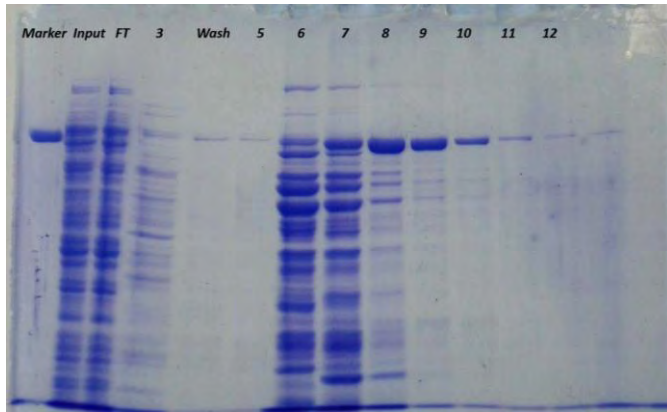
Παρατηρούμε πως ο εμπλουτισμός και η καθαρότητα της πρωτεΐνης αυξάνονται σημαντικά κατά τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων, κατά τα οποία κρυσταλλώνεται η gmGPb, ενώ πρωτεΐνες που δεν κρυσταλλώνονται, στις συγκεκριμένες συνθήκες, απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. Τέλος, στη διαδρομή 8, φαίνεται πως η καθαρότητα της φωσφορυλάσης είναι περισσότερη από 95 %, κάτι το οποίο επιτρέπει τη συνέχεια των περαιτέρω διαδικασιών ώστε να επιτευχθεί η κρυστάλλωση του ένζυμου. Η συνολική απόδοση της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού ήταν: **1,04 g gmGPb ανά 2.3kg σκελετικών μυών κονίκλων.**

### 3.1.2. Καθαρισμός και απομόνωση της hIGPb

Το πρώτο στάδιο της απομόνωσης και του καθαρισμού της hIGPb βασίζεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη εξαιτίας της ετικέτας των ιστιδινών που διαθέτει, εμφανίζει συγγένεια με τα  $Ni^{2+}$  τα οποία βρίσκονται ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια σεφαρόζης στη στήλη. Η λύση των κυττάρων και η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με το διάλυμα A που περιείχε 20 mM β-GP, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole pH 7.0. Η χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, 20 mM δεν είναι αρκετή ώστε το ιμιδαζόλιο να αποτρέψει την αποσύνδεση της πρωτεΐνης, άλλα απέτρεπε, σε ένα βαθμό, την μη ειδική σύνδεση άλλων πρωτεϊνών. Το διάλυμα B περιείχε 20 mM β-GP, 0.5 M NaCl, 0.5 M Imidazole pH 7.0. Η αυξημένη συγκέντρωση του ιμιδαζολίου απομάκρυνε τις προσδεδεμένες πρωτεΐνες από τη στήλη. Στην Εικόνα 3.2, παρουσιάζεται το χρωματογράφημα.

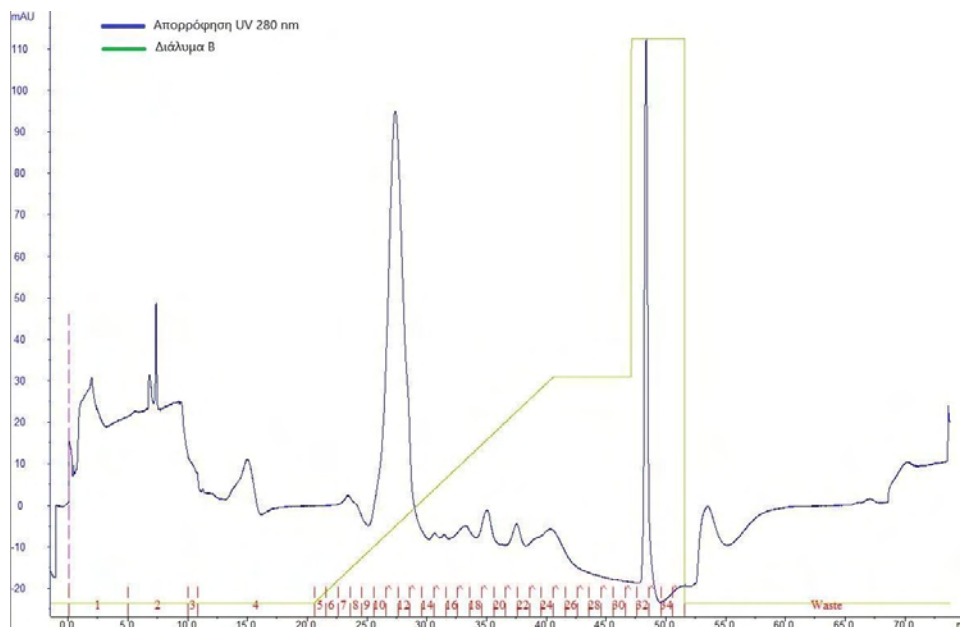


Εικόνα 3.2 : Πρώτο βήμα καθαρισμού της hIGPb (His-Trap). Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα.

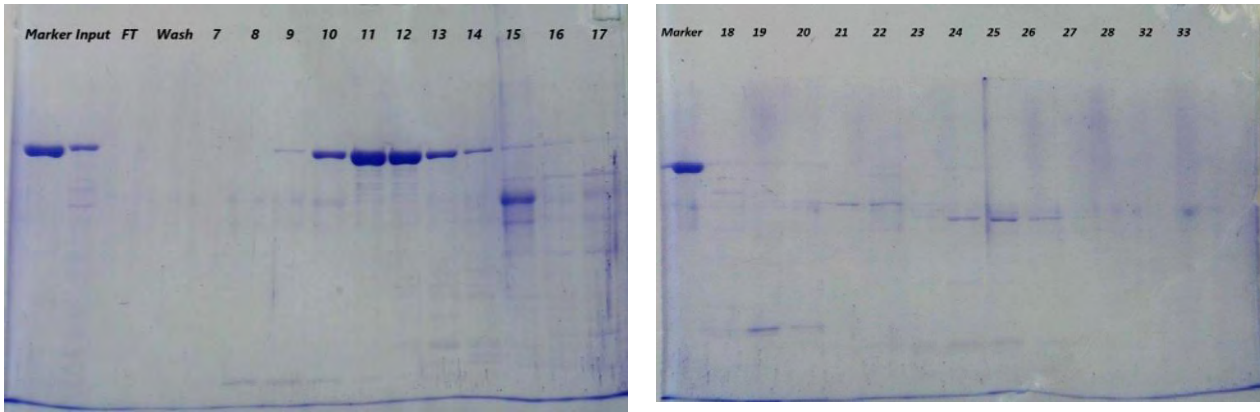


Εικόνα 3.3: Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυση. Διαδρομή 1: χρησιμοποιείται ως μάρτυρας η φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία έχει απομονωθεί από κονίκλους (rmGPb) και έχει μοριακό βάρος 97 KDa, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (input), διαδρομή 3: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (Flow Through), διαδρομή 4: κλάσμα 3, διαδρομή 5 πλύση της στήλης (Wash), διαδρομές 6-13 έκλυση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών (κλάσματα 5-12).

Το δεύτερο στάδιο απομόνωσης και καθαρισμού βασίζεται στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Η hIGPb προσδένεται στη στήλη Resource Q λόγω του αρνητικού φορτίου της σε pH 8.0. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα Tris-HCl 20 mM pH 8, DTT 1 mM (διάλυμα A). Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 1 mM DTT (διάλυμα B), διότι αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος. Στην Εικόνα 3.4, παρουσιάζεται το χρωματογράφημα.

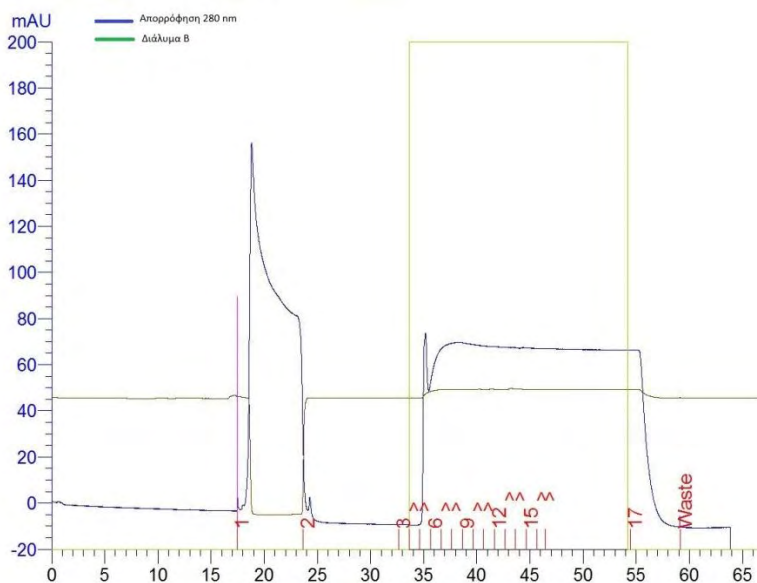


Εικόνα 3.4 : Δεύτερο βήμα καθαρισμού της hIGPb με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Resource Q). Η πρωτεΐνη εκλύεται με διαβάθμιση του διαλύματος B. Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα.

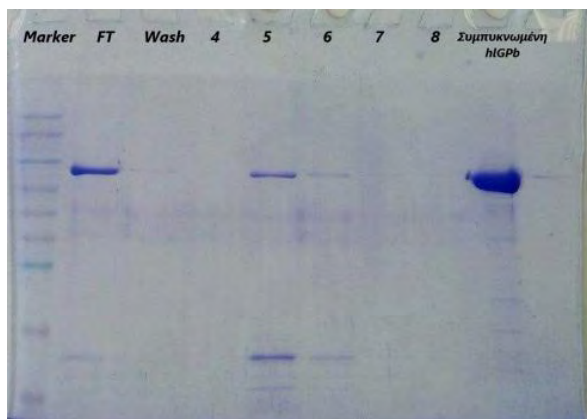


Εικόνα 3.5 : Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυση. Διαδρομή 1: χρησιμοποιείται ως μάρτυρας η φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία έχει απομονωθεί από κονίκλους (rmGPb) και έχει μοριακό βάρος 97 KDa, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (input), διαδρομή 3: πλύση της στήλης (Wash) , διαδρομές 5-15 (1<sup>ο</sup> τζελ) και 2-14 (2<sup>ο</sup> τζελ) έκλουση των προσδεμένων πρωτεϊνών στη στήλη αρχικά με διαβάθμιση συγκέντρωσης του διαλύματος Β 0-40 % και στη συνέχεια με συγκέντρωση διαλύματος Β 100% (κλάσματα 7-28 και 32-33).

Το τρίτο στάδιο της απομόνωσης και καθαρισμού της hIGPb πραγματοποιήθηκε μετά από πέψη με την πρωτεάση TEV. Βασίστηκε στο γεγονός ότι η άτμητη πρωτεΐνη εξακολουθούσε να εμφανίζει συγγένεια με τα Ni<sup>2+</sup> που βρίσκονται ακινητοποιημένα στη στήλη, ενώ η τμημένη πρωτεΐνη δε συνδέθηκε στη στήλη, ως αποτέλεσμα της πέψης με την πρωτεάση TEV. Επιπλέον, έγινε διαχωρισμός από την πρωτεάση TEV (27 KDa) η οποία διέθετε ετικέτα ιστιδινών και προσδέθηκε στη στήλη μαζί με την άτμητη hIGPb. Η εξισορόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα Α που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, 20 mM imidazole. Η έκλουση της άτμητης πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με διάλυμα Β που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole.



Εικόνα 3.6 : Τρίτο βήμα καθαρισμού της hIGP μετά την τμήση της ετικέτας συγγενείας από την πρωτεάση TEV (His-Trap): Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα.



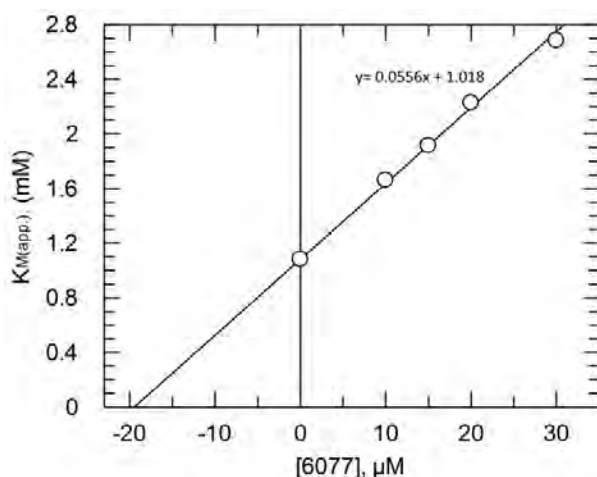
Εικόνα 3.7 : Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυση. Διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη της (Flow Through, κλάσμα 2), διαδρομή 3: πλύση της στήλης (Wash), διαδρομές 4-8 έκλυση των προδεδεμένων πρωτεϊνών. Στη διαδρομή 9 παρουσιάζεται η hIGPb μετά τη συμπύκνωση της.

- Η τελική απόδοση καθαρισμού της hIGPb ήταν 50μg ενζύμου ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας.

## 3.2. Κινητικές μελέτες

### 3.2.1. Προσδιορισμός της $K_i$ του αναστολέα 6077 έναντι της hIGPa

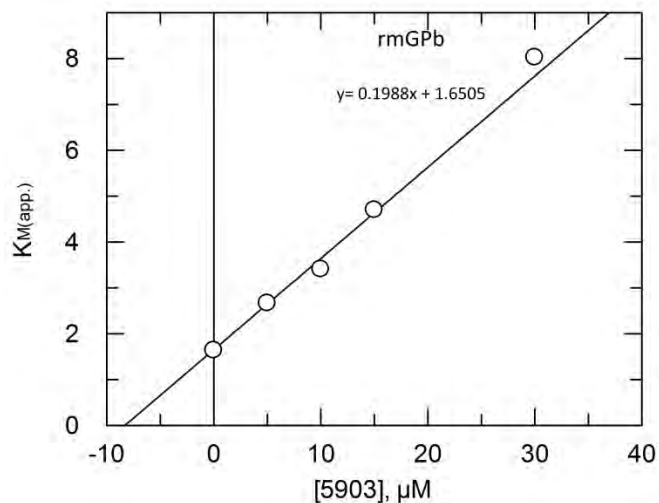
Η  $K_i$  για τον αναστολέα 6077 έναντι της hIGPa υπολογίστηκε σε  $19.46 \pm 0.29 \mu\text{M}$  όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.8.



Εικόνα 3.8 : Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της  $K_i$  για τον αναστολέα 6077 ως προς την hIGPa. Επίσης αναγράφεται και η εξίσωση της ευθείας.

### 3.2.2 Προσδιορισμός της $K_i$ του αναστολέα 5903 έναντι της rmGPb

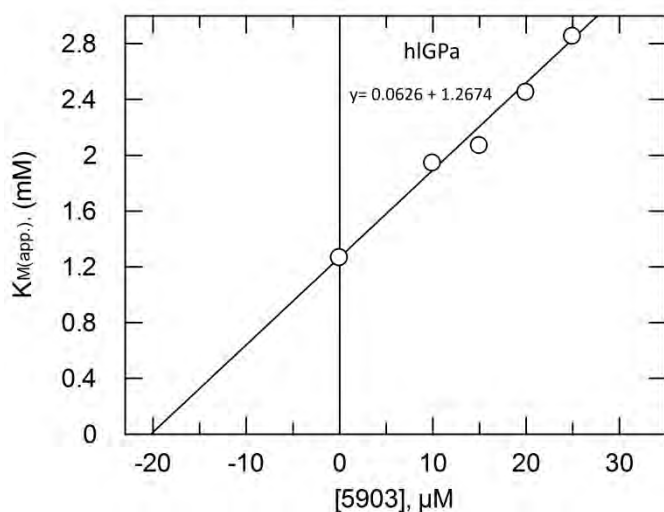
Η  $K_i$  για τον αναστολέα 5903 έναντι της rmGPb υπολογίστηκε σε  $8.3 \pm 0.57 \mu\text{M}$  όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.9.



Εικόνα 3.9 : Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της  $K_i$  για τον αναστολέα 5903 ως προς την rmGPb. Επίσης αναγράφεται και η εξίσωση της ευθείας.

### 3.2.3 Προσδιορισμός της $K_i$ του αναστολέα 5903 έναντι της hIGPa

Η  $K_i$  για τον αναστολέα 5903 έναντι της hIGPa υπολογίστηκε στα  $20.24 \pm 0.92 \mu\text{M}$  όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.10.



Εικόνα 3.10 : Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της  $K_i$  για τον αναστολέα 5903 ως προς την hIGPa. Επίσης αναγράφεται και η εξίσωση της ευθείας.

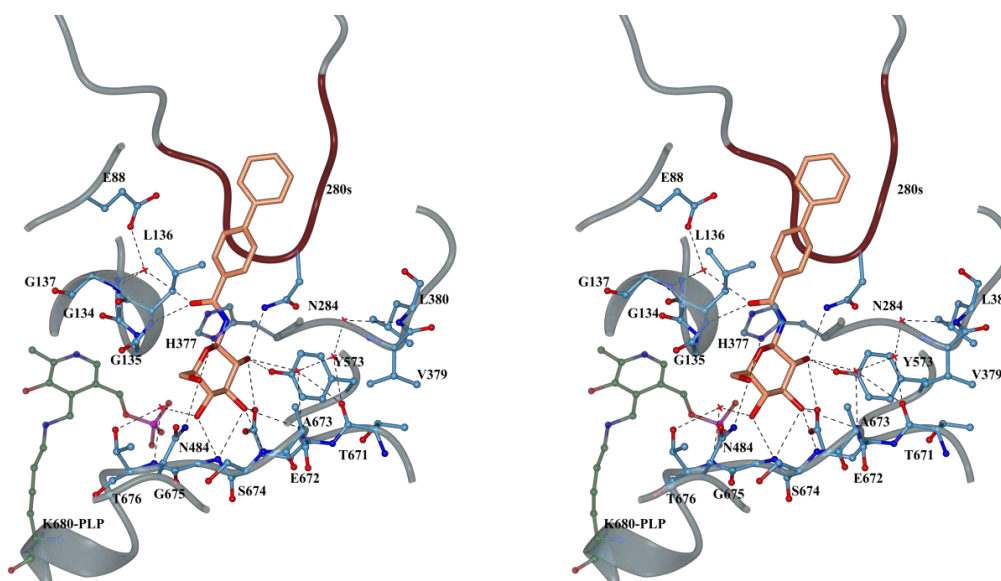
### 3.3. Δομικά αποτελέσματα

Στον Πίνακα 3.1 αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals που σχηματίζουν οι αναστολείς με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου στον κρύσταλλο της gmGPb. Στην Εικόνα 3.11 αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζουν οι αναστολείς κατά την πρόσδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο με τα μόρια ύδατος να δημιουργούν ένα έμμεσο δίκτυο σύνδεσης των μορίων των αναστολέων με γειτονικά αμινοξέα του κέντρου σχηματίζοντας γέφυρες ύδατος (water bridges).

Inhibitor atom	Protein Residues (atoms)	
	Hydrogens bonds (-3.35 Å)	Van der Waals interactions (-4.0 Å)
O2'	Glu672 (OE1) : 3.20 Tyr573 (OH) : 3.10 Asn284(ND2) : 3.30 Water-200 : 2.80	Asn284 (OD1, CG)
O3'	Ser674 (N) : 3.10 Glu672 (OE1) : 2.80 Ala673 (N) : 3.30 Gly675 (N) : 3.10	Gly675 (CA), Ala673 (C,N,CA,CB), Ser674 (CA,C), Glu672(CG,CD,C) Water-200
O4'	Gly675 (CA) : 3.20 Gly675(N) : 2.80 Water -106 : 2.70	Gly675 (C,O), Thr (N), Ser674 (CB,C), Asn484 (ND2)
O5'		His377 (ND1,CB), Leu136(CA,CB,N), Gly135(C)
O6'	Asn484 (ND2) : 2.70 His377 (ND1) : 2.60 His377 (CE1) : 3.30	Leu139(CD2), Val455 (CB,CG1,CG2), Asn484 (CG,OD1), His377(CG)
O2	Leu136 (N) : 3.00 Leu136 (CB) : 3.20 Water-287 : 3.20	Gly135 (N,C) Leu136 (CA) Asp283(OD2)
C1'		Leu136 (N)
C2'		Glu672 (OE1), His377 (O) Water-200
C3'		Glu672 (OE1), Gly675 (N) Water-106
C4'		Asn484 (ND2), Gly675 (N) Water-106
C5'		Gly135 (CA,C), Leu136 (N) Water-106

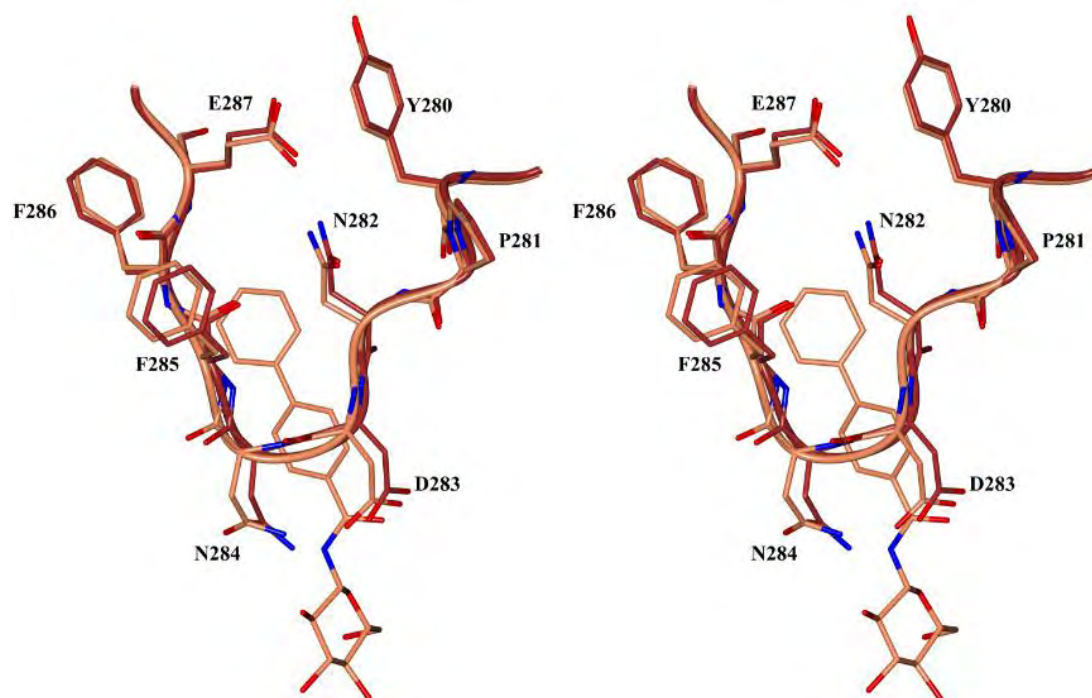
<b>C6'</b>		Gly135 (O,C), His377 (ND1,CE1) Leu136 (N,CA), Asn484 (ND2)
<b>N1</b>		Asn284 (ND2)
<b>C2</b>		Leu136 (C2,CB),Asn284 (ND2)
<b>C3</b>		Leu136 (CB), Asn284(OD1)
<b>C4</b>		Leu136 (CD1), Asn284 (OD1)
<b>C5</b>		Water-209
<b>C6</b>		His341 (CE1,NE2) Asn284 (N)
<b>C7</b>		Asn282 (O), Asn284 (N)
<b>C8</b>		Asn284 (N), Water-287
<b>C9</b>		His341 (CE1, NE2) Water-209
<b>C10</b>		His341 (NE2), Phe285 (N,O) Ala383 (O) , Water -209
<b>C11</b>		Phe285 (O,C), Phe286 (N,CA) Ala383 (O), Water- 209
<b>C12</b>		His341 (NE2), Phe285 (O), Phe286 (CA), Water- 169, Water- 231, Water -232
<b>C13</b>		His341 (NE2), Arg292 (NH2) Water- 231, Water- 232 Water-169, Water-202
<b>C14</b>		His341 (CE1,NE2)
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>98</b>

**Πίνακας 3.1** Συγκεντρωτικός πίνακας αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται στον κρύσταλλο της rmGPb μεταξύ του αναστολέα 6077 και των αμινοξέων της πρωτεΐνης

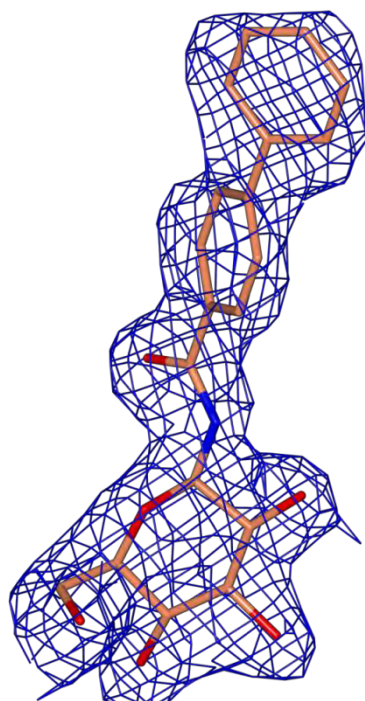


**Εικόνα 3.11** : Πρόσδεση του 6077 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται με διακεκομμένες γραμμές και τα μόρια ύδατος με κόκκινο χρώμα.

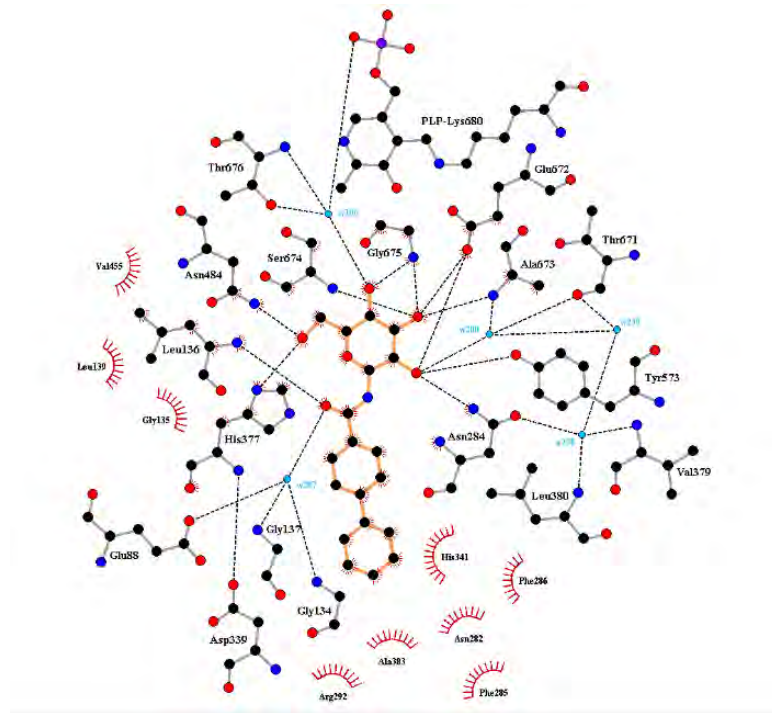




Εικόνα 3.12 : Υπέρθηση του αναστολέα 6077 με τα κατάλοιπα του βρόχου 280s. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η δομή χωρίς την παρουσία αναστολέα.



Εικόνα 3.13 : Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  για τον αναστολέα 6077 σε  $1\sigma$ .



Εικόνα 3.14 : Σχηματικό διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται από την πρόσδεση του αναστολέα 6077.

## Συζήτηση

Σε βιοχημικές και δομικές μελέτες έχει διερευνηθεί η δέσμευση μεγάλου αριθμού προσδετών στα κέντρα πρόσδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η πλειοψηφία τους αναφέρεται σε προσδέτες που δεσμεύονται στο καταλυτικό κέντρο και είναι παράγωγα γλυκόζης. Η α-D-γλυκόζη είναι ο φυσιολογικός αναστολέας της GP με σταθερά αναστολής ( $K_i$ ) 1.7 mM για την GPb και 4.9 mM για την GPa, αντίστοιχα. Η γλυκόζη σε ένα αυτορυθμιζόμενο σύστημα, αναστέλλει την αποικοδόμηση και επάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου αναστέλλοντας τη δράση της GP με αποτέλεσμα τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα να μειώνονται. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας η αναστολή του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου έχει μελετηθεί με περισσότερα από 200 ανάλογα γλυκόζης. Η αποτελεσματικότητα των αναλόγων γλυκόζης αποδίδεται στο σχηματισμό ενός εκτεταμένου δικτύου πολικών και μη-πολικών αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα που σχηματίζουν τη β-εσοχή στο καταλυτικό κέντρο, όπου μόνο οι β-υποκαταστάτες της γλυκόζης μπορούν να συνδεθούν.

Σε αυτή την εργασία έγιναν συγκριτικές μελέτες για την ανασταλτική επίδραση δύο αναλόγων γλυκόζης, του 6077 και του 5903, στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες του αναστολέα 6077 έναντι της hIGPa και του αναστολέα 5903 έναντι της rmGPb και της hIGPa. Οι τιμές των σταθερών αναστολής που υπολογίστηκαν για τον 5903 έναντι της rmGPb ήταν  $8.3 \pm 0.57 \mu\text{M}$  και έναντι της hIGPa ήταν  $20.24 \pm 0.92 \mu\text{M}$ . Η σταθερά αναστολής για τον 6077 έναντι της hIGPa ήταν  $19.46 \pm 0.29 \mu\text{M}$ . Ο αναστολέας 5903 εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για την rmGPb σε σχέση με την hIGPa, ενώ τόσο όσο ο 5903 όσο και ο 6077 έχουν την ίδια περίπου συγγένεια για την hIGPa.

Επίσης, έγιναν και δομικές μελέτες σε σύμπλοκο της rmGPb με τον 6077. Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται στον κρύσταλλο της rmGPb μεταξύ του αναστολέα 6077 και των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Η αλληλεπίδραση του αναστολέα με αμινοξέα του βρόχου 280s (Asn282, Asp283, Asn284, Phe285, Phe286) παρέχει τη δομική βάση της ισχυρής ανασταλτικής δράσης, καθώς σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου, παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος στην καταλυτική θέση, προωθώντας την T στεροδιαμόρφωση. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.12 η σύνδεση του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο δεν προκαλεί σημαντική αλλαγή στη δομική αρχιτεκτονική του βρόχου 280s. Συνεπώς τα αποτελέσματα των δομικών και των κινητικών μελετών αναδεικνύουν ότι ο αναστολέας 6077 μπορεί να αποτελέσει υποσχόμενο αναστολέα για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

## Παράρτημα

AMP	Adenosine Monophosphate
ATP	Adenosine Triphosphate
APS	Ammonium Persulfate
BSA	Bovine serum albumin
GLUT	Glucose transporters
GST	Glutathione S-transferase
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide
PhK	Phosphorylase kinase
PLP	Pyridoxal phosphate
GP	Glycogen Phosphorylase
hIGP	Human liver Glycogen Phosphorylase
rmGP	Rabbit muscle Glycogen Phosphorylase
UTP	Uridine-5'-triphosphate
UDP	Uridine diphosphate

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Hayes JM, Kantsadi AL, Leonidas DD. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochemistry Reviews* 2014;13:471-98
- [2] Uazman Alam, Omar Asghar, Shazil A. Malik Chapter 15-General aspects of diabetes melitus
- [3] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Feb;103(2):137-49.
- [4] American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33 Suppl 1:S62-9
- [5] DYANNE P. WESTERBERG, DO Diabetic Ketoacidosis: Evaluation and Treatment. , Cooper Medical School of Rowan University, Camden, New Jersey
- [6] Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006
- [7] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis
- [8] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.
- [9] Bollen M, Keppens S, Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 1998
- [10] Venien-Bryan C, Jonic S, Skamnaki V, Brown N, Bischler N, Oikonomakos NG, et al. The structure of phosphorylase kinase holoenzyme at 9.9 angstroms resolution and location of the catalytic subunit and the substrate glycogen phosphorylase. *Structure* 2009
- [11] Pinotsis N, Leonidas DD, Chrysinia ED, Oikonomakos NG, Mavridis IM. The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Protein Sci* 2003
- [12] Livanova NB, Chebotareva NA, Eronina TB, Kurganov BI. Pyridoxal 5'-phosphate as a catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase B. *Biochemistry (Mosc)* 2002

[13] Kantsadi AL, Bokor E, Kun S, Stravodimos GA, Chatzileontiadou DS, Leonidas DD, et al. Synthetic, enzyme kinetic, and protein crystallographic studies of C-beta-d-glucopyranosyl pyrroles and imidazoles reveal and explain low nanomolar inhibition of human liver glycogen phosphorylase. *Eur J Med Chem* 2016

[14] Loranne Agiu. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. Institutes of Cellular Medicine and Ageing and Health, Medical School, Newcastle University.

[15] Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*, 63, 258-261

[16] Oikonomakos, N.G. (2002), Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3

[17] Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.;

[18] Oikonomakos, N. G. (2008), New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983

[18] Oikonomakos, N. G.; Somsak, L. *Curr. Opin. Invest. Drugs* (2008), 9, 379.

[19] Blundell T. L., Jhoti H. & Abell C., (2002), High-throughput crystallography for lead discovery in drug design, *Nature Reviews, Drug Discovery*, Volume 1.

[20] Witters L. A. & Avruch J., 1978, Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase, *Biochemistry*, 17, 406-410

[21] Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. Principles of physical biochemistry. 2nd ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall; 2006.

[22] Michaelis L, Menten ML, Johnson KA, Goody RS. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* 2011

[23] Price NC, Stevens L. Fundamentals of enzymology : the cell and molecular biology of catalytic proteins. 3rd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 1999

[24] Lineweaver H. B, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *J.Amer.Chem.*1934

[25] Hayes JM, Leonidas DD. Computation as a tool for glycogen phosphorylase inhibitor design. *Mini Rev Med Chem* 2010

- [26] Witters L. A. & Avruch J., 1978, Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase, *Biochemistry*, 17, 406-410
- [27] Yoshida N, Sato M. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009
- [28] Ettre LS, Sakodynskii KI. Tswett, M.S. And the Discovery of Chromatography .1. Early Work (1899-1903). *Chromatographia* 1993;35:223-31.
- [29] John M. Clark, Jr and Robert L. Switzer. Πειραματική Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- [30] Sheehan D. (2009) *Chromatography in Physical Biochemistry: Principles and Applications*. Wiley-Blackwell: Chichester, UK, second edition, 11–51.
- [31] HealthCare G. *Affinity Chromatography - Principles and Methods*: GE HealthCare; 2007
- [32] HealthCare G. *Ion Exchange Chromatography. Principles and Methods*: GE HealthCare; 2010.
- [33] Waugh DS. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* 2011
- [34] Gel electrophoresis of proteins. Adapted from Chapter 7, *Gel Electrophoresis of Proteins*, by David E. Garfin, pages 197-268, in *Essential Cell Biology, Volume 1: Cell structure, A Practical Approach*, Edited by John Davey and Mike Lord, Oxford University Press, Oxford UK (2003).
- [35] Tsirkone VG, Tsoukala E, Lamprakis C, Manta S, Hayes JM, Skamnaki VT, et al. 1-(3Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. *Bioorg Med Chem* 2010
- [36] Saheki S, Takeda A, Shimazu T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal Biochem* 1985
- [37] Leatherbarrow RJ. *GraFit version 4.06*. Erithacus Software Ltd Staines 1998
- [38] Rhodes G. *Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models*. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2006

[39] Murshudov GN, Skubak P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011;67:355-67

[40] Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997;53:240-55.

[41] COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50:760-3.

[42] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:2126-32.

[43] Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:486-501.

[44] McNicholas S, Potterton E, Wilson KS, Noble ME. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011;67:386-94