

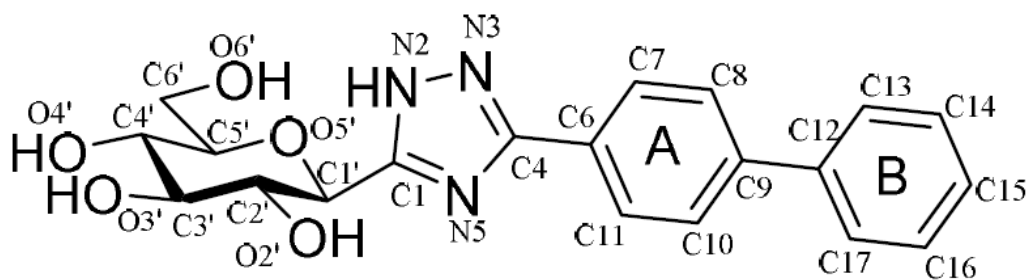
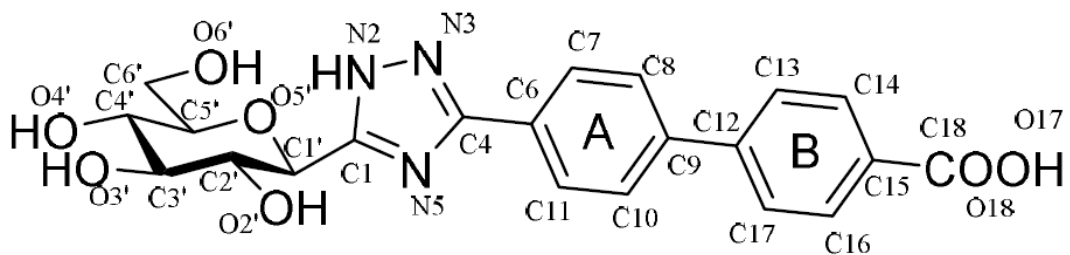
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΤΗ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ
ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ



ΣΤΑΜΑΤΗ ΕΥΓΕΝΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2018

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΤΗ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ
ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

**BINDING STUDIES OF GLUCOSE ANALOGES ON GLYCOGEN
PHOSPHORYLASE WITH KINETICS AND CRYSTALLOGRAPHICS
METHODS**

**ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΤΗ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ
ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

ΟΝΟΜΑ: ΣΤΑΜΑΤΗ ΕΥΓΕΝΙΑ

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
1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I.....	10
1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II.....	10
1.2 Ομοιόσταση της γλυκώζης.....	11
1.2.1 Ινσουλίνη – Ρόλος και μεταβολικές επιδράσεις.....	11
1.2.2 Γλυκαγόνη.....	12
1.2.3 Γλυκογόνο-Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	13
1.2.3.1 Σύνθεση του γλυκογόνου.....	13
1.3 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	15
1.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	16
1.4.1 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης.....	17
1.4.2 Κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	18
1.4.2.1 Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14.....	19
1.4.2.2 Καταλυτικό κέντρο.....	19
1.4.2.3 Αλλοστερικό κέντρο.....	19
1.4.2.4 Αποθηκευτικό κέντρο.....	20
1.4.2.5 Νουκλεοζιτικό κέντρο.....	20
1.4.2.6 Νέο αλλοστερικό κέντρο.....	20
1.4.2.7 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης.....	21
1.4.3 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων...21	
1.5 Κρυσταλλογραφία.....	23
1.5.1 Κρύσταλλος.....	23
1.5.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων.....	24
1.5.3 Η θεωρία της περίθλασης των ακτίνων Χ.....	25
1.5.4 Ο Νόμος του Bragg.....	26
1.5.5 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου.....	27
1.5.6 Διάγραμμα Ramachandran.....	28
1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων.....	29
1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα και κινητικές μελέτες.....	30
1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων	31
2. Υλικά και μέθοδοι.....	34

2.1 Αντιδραστήρια.....	34
2.2 Οργανολογία.....	35
2.3 Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	36
2.4 Στήλες υγρής χρωματογραφίας.....	36
2.5 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	36
2.6 Υγρή χρωματογραφία - Σύστημα FPLC.....	37
2.6.1 Χρωματογραφία συγγένειας.....	38
2.6.2 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	39
2.7 Πρωτεάση TEV.....	40
2.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	40
2.8.1 Χρώση πηκτώματος.....	43
2.9 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford.....	43
2.10 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGPb).....	44
2.11 Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης (hIGP).....	51
2.12 Φωσφορυλίωση της GP.....	53
2.13 Κινητικές μελέτες έναντι της GP.....	54
2.13.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου.....	55
2.13.2 Ενζυμικό διάλυμα.....	55
2.13.3 Υποστρώματα.....	56
2.13.4 Ανάλυση κινητικών δεδομένων.....	59
2.14 Κρυσταλλογραφικές μελέτες.....	60
2.14.1 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb.....	60
2.14.2 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	62
2.14.3 Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου.....	63
3. Αποτελέσματα.....	64
3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών.....	64
3.1.1 Καθαρισμός και απομόνωση της rmGPb.....	64
3.1.2 Καθαρισμός και απομόνωση της hIGPb.....	64
3.2 Κινητικές μελέτες.....	68
3.2.1 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα KS461 έναντι της hIGPa.....	68
3.2.2 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα KS510 έναντι της hIGPa.....	68
3.3 Δομικά αποτελέσματα.....	69
Συζήτηση.....	74
Βιβλιογραφία.....	74

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το Φεβρουάριο του έως τον Οκτώβριο του 2017, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Δημήτρη Λεωνίδα. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Βιοχημείας Δρ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του καθώς και για την δυνατότητα που μου έδωσε να βελτιώσω και να επεκτείνω το επιστημονικό μου υπόβαθρο. Ήταν δίπλα μου σε κάθε λογής πρόβλημα επιστημονικό και μη. 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.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια και τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος. Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα τους υποψήφιους διδάκτορες Γεώργιο Στραβοδήμο και Ευθύμιο Κυριάκη για την απεριόριστη στήριξη και βοήθεια που μου παρείχαν, αλλά και για την υπομονή και τη διάθεση τους, καθώς ήταν πάντοτε πρόθυμοι να με καθοδηγήσουν. Επίσης δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Θεοδώρα Σολοβού και Όλγα Παπαϊωάννου για κάθε λογής βοήθεια, καθώς και τους προπτυχιακούς φοιτητές (Αναστασία, Θωμά, Βασιλική, Συμεών, Αγγελική), με τους οποίους συνεργάστηκα και δέχτηκα την πολύτιμη βοήθειά τους.

Τέλος, σε αυτό το σημείο θέλω να πω το πιο μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την υποστήριξη, τη βοήθεια, την ηθική στήριξη και την πολύτιμη συμβολή τους όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς τη βοήθειά τους κάποια πράγματα θα φάνταζαν σενάρια επιστημονικής φαντασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης είναι μια νοσολογική οντότητα η οποία χαρακτηρίζεται ως μία σύγχρονη επιδημία, αποτελώντας μείζονα απειλή για τη δημόσια υγεία σε παγκόσμια κλίμακα. Πρόκειται για μεταβολική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία) λόγω διαταραχής στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η υπεργλυκαιμία αποτελεί απόρροια ελαττωματικής έκκρισης της ινσουλίνης από το πάγκρεας ή/και ανεπαρκούς ευαισθησίας των κυττάρων-στόχων στην ινσουλίνη. Η θεραπεία κατά του διαβήτη αποσκοπεί στη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Για το σκοπό αυτό, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για την εύρεση μορίων που εκλεκτικά θα τα ενεργοποιούν ή θα τα αναστέλλουν, και θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικοί παράγοντες. Ένας από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων είναι το ένζυμο ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση της *φωσφορυλάσης του γλυκογόνου* από κονίκλους (rmGP) και ανθρώπινης ηπατικής (hlGPb) από μετασχηματισμένα βακτήρια με αυτοματοποιημένο σύστημα *υγρής χρωματογραφίας*. Στη συνέχεια μελετήθηκε η σύνδεση δύο αναλόγων γλυκόζης (**KS461** και **KS510**) στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου με κινητικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στο χαρακτηρισμό της ανασταλτικής ισχύος των αναστολέων, στην ταυτοποίηση της πρόσδεσης των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο, καθώς και στην ανάδειξη των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου.

Abstract

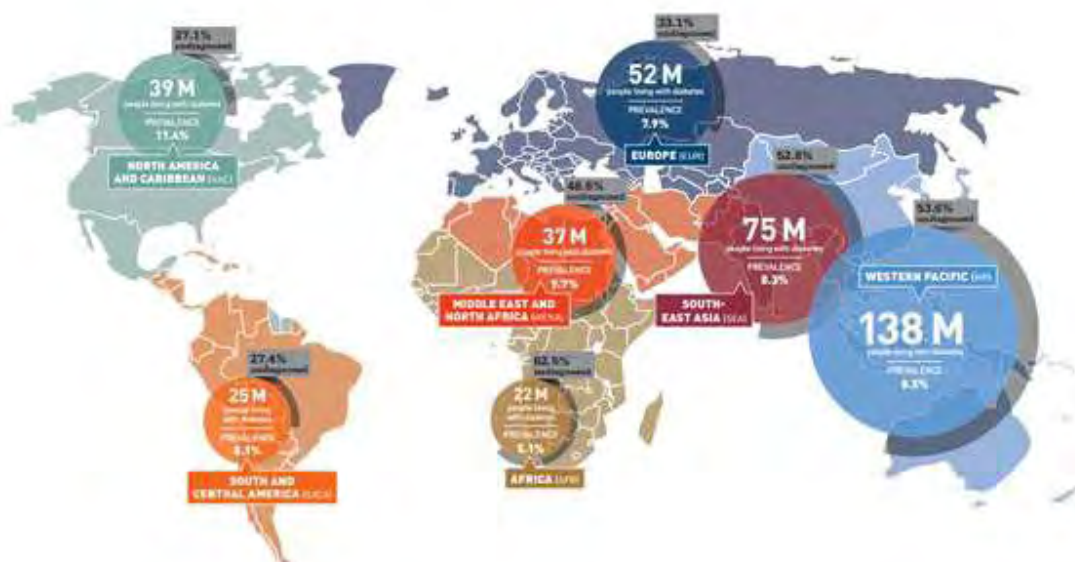
Diabetes mellitus is a disease entity characterized as a modern epidemic, which constitutes a major threat for public health on a global scale. It is a metabolic disorder characterized by high blood glucose levels (hyperglycemia) due to a disturbance in glucose metabolism. Hyperglycemia is a consequence of defective secretion of insulin from the pancreas and/or of insufficient sensitivity to insulin target cells. Treatment against diabetes aims to maintain the levels of plasma glucose to normal levels. For this purpose, enzymes and receptors involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets to discover molecules which will selectively modulate their activity, and will have the potential to be new hypoglycemic agents. One of the most important molecular targets for the design of new hypoglycemic drugs is the hepatic glycogen phosphorylase.

In this study we isolated and purified GPb from rabbit muscle (rmGPb), and human liver GPb (hlGPb) from recombinant bacteria using the an automated liquid chromatography system. The binding of two glucose derivatives (**KS461** and **KS510**) at GP was studied with kinetic and crystallographic studies. Structural analysis revealed that these inhibitors bind on the catalytic site of the enzyme.

1. Εισαγωγή

1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία χρόνια νόσος που αφορά μια μεταβολική ανωμαλία, η οποία χαρακτηρίζεται από διαταραχές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών. Αυτές οι διαταραχές οφείλονται στην ελαττωματική έκκριση ή/και δράση της ινσουλίνης. Σύμφωνα με την Διεθνή Ομοσπονδία για το Διαβήτη (International Diabetes Federation, IDF) έχουν γίνει προβλέψεις για τον αριθμό των ασθενών τα επόμενα χρόνια [2]. Το 2013 έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη 382 εκατομμύρια άνθρωποι και ο αριθμός αυτός αναμένεται να ανέλθει στα 592 εκατομμύρια έως το 2035. Αποθαρρυντικό είναι το γεγονός πως ο αριθμός των ατόμων που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των ατόμων που προβλεπόταν να πάσχει [1].



Εικόνα 1.1: Ο αριθμός των ατόμων με Σακχαρώδη Διαβήτη από τη Διεθνή Ομοσπονδία για το Διαβήτη [IDF Diabetes Atlas Sixth Edition Update, 2014].

Αυτή η χρόνια διαταραχή, που παρατηρείται στην ασθένεια και προκαλεί δυσλειτουργία και απώλεια των β-κυττάρων του παγκρέατος από τα οποία παράγεται η ορμόνη ινσουλίνη, προκαλεί την εμφάνιση ποικίλων συμπτωμάτων όπως είναι η οσμοτική διούρηση και η πολυδιψία, που προκαλούνται από τη γλυκοζουρία. Οι επιπλοκές που εμφανίζονται διακρίνονται σε μικροαγγειακές επιπλοκές (νεφροπάθεια, νευροπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια) και σε μακροαγγειακές ασθένειες (αθηροσκλήρωση) [5].

Ο σακχαρώδης διαβήτης διακρίνεται σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (ΣΔ1), σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (ΣΔ2) και το διαβήτη της κήσης. Οι δύο πρώτοι τύποι περιλαμβάνουν την πλειοψηφία των ασθενών. [3]

1.1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου I

Στον ΣΔ1 παρατηρείται αυτοάνοση καταστροφή των παγκρεατικών κυττάρων, που οδηγεί σε ελάττωση και τελικά παύση της έκκρισης ινσουλίνης και για αυτό το λόγο οι ασθενείς εμφανίζουν πλήρη εξάρτηση από ινσουλίνη. Εμφανίζεται κυρίως στην παιδική και την εφηβική ηλικία, όπου παρατηρείται οξεία καταστροφή β κυττάρων παγκρέατος, αλλά και στους ενήλικες, όπου ο ρυθμός καταστροφής των β κυττάρων είναι πιο αργός. Η καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος οφείλεται στην παρουσία ορισμένων αυτο-αντισωμάτων που στρέφονται εναντίον των β-κυττάρων και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σύνθεση της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα μια επακόλουθη εξάρτηση των νοσούντων επί εξωγενούς χορήγησης ινσουλίνης προς επιβίωση. Οι ασθενείς εμφανίζουν αυξημένη συγκέντρωση του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία), η οποία μακροπρόθεσμα μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση κετοξέωσης, όπου γίνεται η ενεργοποίηση της ορμονο-ευαίσθητης λιπάσης που προκαλεί διάσπαση των τριακυλογλυκερόλων και απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων, που μετατρέπονται στο ήπαρ σε κετονοσώματα και απελευθερώνονται στη κυκλοφορία [4].

1.1.2 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου II

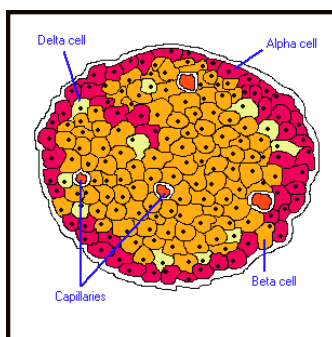
Ο ΣΔ2 οφείλεται σε ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης (αντίσταση στην ινσουλίνη) και εμφανίζεται συνήθως κατά την ενήλικη ζωή. Τα β κύτταρα του παγκρέατος για να αντιμετωπίσουν αυτή την ευαισθησία των ιστών, εκκρίνουν υψηλή συγκέντρωση ινσουλίνης (υπερινσουλιναιμία). Σε βάθος χρόνου τα παγκρεατικά κύτταρα χάνουν την ικανότητα που έχουν να εκκρίνουν την απαραίτητη ποσότητα ινσουλίνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση υπεργλυκαιμίας και κατά συνέπεια και την εμφάνιση της νόσου[5]. Η εμφάνιση του ΣΔ2 γίνεται συνήθως σε μεσήλικες και υπερήλικες, ενώ σπάνια σε άτομα μικρής ηλικίας. Αποτελεί την πιο διαδεδομένο τύπο ΣΔ, καθώς αντιπροσωπεύει το 90% των περιπτώσεων με διαβήτη σε παγκόσμιο επίπεδο[6]. Όπως και στον ΣΔ1, αυτοί οι ασθενείς βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης μακροαγγειακών και μικροαγγειακών επιπλοκών. Η αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία είναι συνήθως παρούσα πριν την έναρξη του κλινικού διαβήτη, καθορίζεται από έναν αριθμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της γενετικής, της ηλικίας, της παχυσαρκίας και, αργότερα της ίδιας της υπεργλυκαιμίας. Η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να βελτιωθεί με μείωση του βάρους ή/και φαρμακολογική θεραπεία της υπεργλυκαιμίας, αλλά σπάνια αποκαθίσταται στο φυσιολογικό [7].

1.2 Ομοιόσταση Γλυκόζης

Η «κίνηση» της γλυκόζης στον οργανισμό και η ταυτόχρονη διατήρηση της συγκέντρωσής της στο αίμα σε δεδομένα επιθυμητά επίπεδα (ομοιόσταση της γλυκόζης) είναι μια περίπλοκη διαδικασία που ελέγχεται από το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης –ινσουλίνης [8].

1.2.1 Ινσουλίνη - Ρόλος και Μεταβολικές Επιδράσεις

Η ινσουλίνη είναι μία πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, Α και Β αντιστοίχως, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς [9]. Συντίθεται στα β-κύτταρα του παγκρέατος των νησιδίων του Langerhans. Η ινσουλίνη συντίθεται πρώτα ως ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο την προϊνσουλίνη, η οποία μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου σχηματίζονται ανώριμα κοκκία β παγκρεατικών κυττάρων, στα οποία και αποθηκεύεται. Έπειτα, υφίσταται ωρίμανση σε ενεργό ινσουλίνη μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης από τις ενδοπεπτιδάσες, οι οποίες προκαλούν απομάκρυνση του πεπτιδίου C, αφήνοντας 2 πεπτιδικές αλυσίδες, Α και Β, συνδεδεμένες με 2 δισουλφιδικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της ώριμης ινσουλίνης [10].



Εικόνα 1.2: . Νησίδια του Langerhans

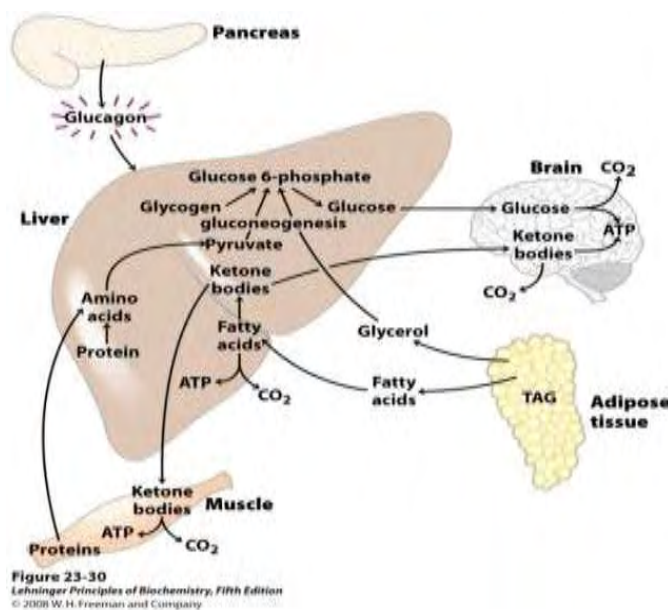
Η ινσουλίνη ευνοεί αναβολικές διεργασίες οι οποίες λειτουργούν στην κατεύθυνση της πρόσληψης της γλυκόζης και της αποθήκευσης ενέργειας, πρωτεϊνών και λίπους.

Κατά τη διάρκεια της νηστείας η ινσουλίνη του πλάσματος είναι χαμηλή και αυξάνεται κατά τη μεταγευματική κατάσταση. Μετά από την κατανάλωση ενός γεύματος η γλυκόζη, τα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα εισέρχονται στο ήπαρ. Η ινσουλίνη απελευθερώνεται από το πάγκρεας σε αναμονή και ως απόκριση της υψηλής συγκέντρωσης της γλυκόζης που κυκλοφορεί στο αίμα και σε μικρότερο βαθμό από άλλες ουσίες (πρωτεΐνες και λίπη). Η ινσουλίνη διεγείρει τη σύνθεση γλυκογόνου τόσο στο ήπαρ όσο και στους μύς. Ωστόσο, η απελευθέρωσή της στην

κυκλοφορία του αίματος έχει ως αποτέλεσμα κατά κύριο λόγο, την αύξηση της μεταφοράς γλυκόζης σε γλυκοζοεξαρτώμενους ιστούς όπως ο εγκέφαλος, στο μεταβολισμό, στο μυϊκό ιστό, στο λιπώδη ιστό και στον ηπατικό ιστό. Σε απάντηση στην ινσουλίνη, οι GLUT4 υποδοχείς που βρίσκονται σε κύτταρα ευαίσθητα σε αυτή, κινούνται στη μεμβράνη των κυττάρων για να διευκολύνουν την πρόσληψη της γλυκόζης έτσι ώστε να παρατηρείται ελάττωση παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ και να βοηθούν στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στο αίμα. Εν συντομία η γλυκόζη δε μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα χωρίς την παρουσία της ορμόνης ινσουλίνης. Αν δεν υπάρχει η ινσουλίνη, τα κύτταρα δε λαμβάνουν γλυκόζη και άρα ενέργεια, παρά το γεγονός ότι αυτή μπορεί να βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο αίμα [11].

1.2.2 Γλυκαγόνη

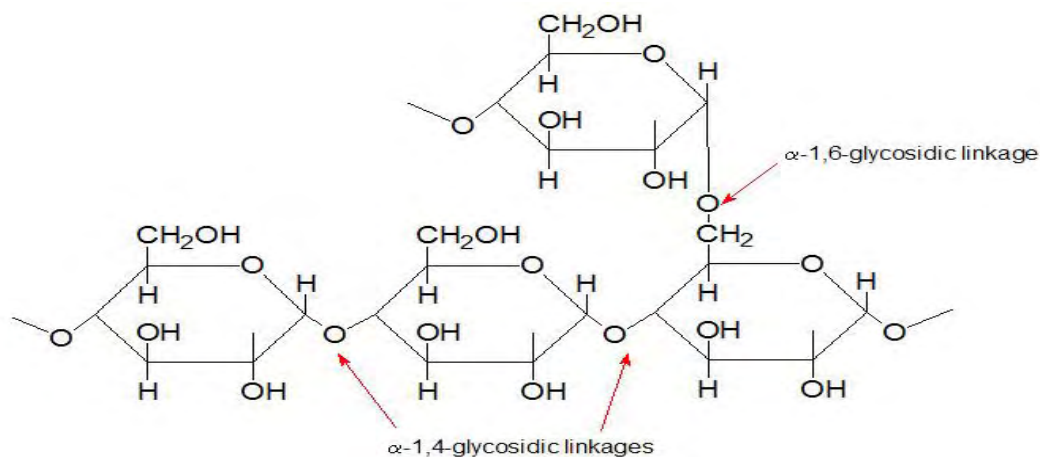
Είναι μια πεπτιδική, μη στεροειδής, ορμόνη που συντίθεται κι εκκρίνεται από τα α κύτταρα των νησιδίων του Langerhans του παγκρέατος. Παρουσιάζει αντίστροφη δράση από την ινσουλίνη στους περιφερικούς ιστούς, κυρίως στο ήπαρ, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Η γλυκαγόνη συντίθεται αρχικά ως προορμόνη και παράγεται από τη διάσπαση της προγλυκαγόνης από την προορμόνη κονβερτάση 2 (PC2) στα α-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος. Χαμηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα προκαλούν την έκκριση της γλυκαγόνης και τη μείωση της ινσουλίνης. Έτσι, η γλυκαγόνη και η ινσουλίνη αποτελούν μέρος ενός συστήματος ανατροφοδότησης που διατηρεί τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα σε ισορροπία για τον οργανισμό [11], [12].



Εικόνα 1.3: Η ρύθμιση της γλυκαγόνης στο μεταβολισμό, σε κατάσταση νηστείας [13]

1.2.3 Γλυκογόνο-Μεταβολισμός Γλυκογόνου

Το γλυκογόνο ανήκει στην οικογένεια των υδατανθράκων και είναι ένα μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης. Τα κατάλοιπα της γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς α 1,4, ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α 1,6. Η παραγωγή του γίνεται στο πάγκρεας και συγκεκριμένα από τα κύτταρα τύπου Α των νησιδίων του Langerhans και βρίσκεται στο κυτοσόλιο με τη μορφή κοκκίων [14].



Εικόνα 1.4: Η δομή του γλυκογόνου [14].

Αποτελεί μία άμεσα κινητοποιούμενη πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης, ωστόσο δεν είναι τόσο πλούσιο σε ενέργεια όσο είναι τα λιπαρά οξέα, καθώς δεν είναι τόσο ανηγμένο. Ο ρόλος του είναι η άμεση απόδοση ενέργειας, όταν είναι απαραίτητη, με αποικοδόμηση του και στη συνέχεια απελευθέρωση γλυκόζης. Επομένως είναι ιδιαίτερα σημαντικό μόριο για τη συντήρηση και ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, μέσα από τις διαδικασίες της σύνθεσης και της αποικοδόμησής του στο ήπαρ. Το γλυκογόνο αποθηκεύεται είτε στους σκελετικούς μύες, είτε στο ήπαρ και παρόλο που η συγκέντρωσή του στο ήπαρ είναι αρκετά υψηλότερη, περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους μύες. Το γεγονός αυτό συμβαίνει καθώς οι σκελετικοί μύες έχουν πολύ μεγαλύτερη μάζα.

Η σύνθεση του γλυκογόνου απαιτεί την είσοδο στο εσωτερικό των κυττάρων μορίων γλυκόζης, η οποία επιτυγχάνεται μέσω των μεταφορέων γλυκόζης (GLUT). Η πορεία που ακολουθείται χρειάζεται μία ενεργή μορφή γλυκόζης, την ουρινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη). Η σύνθεσής της ξεκινά με την μετατροπή του εισερχόμενου στα κύτταρα γλυκογόνου σε 6-φωσφορική γλυκόζη από το ένζυμο της εξοκινάσης, και στη συνέχεια σε 1-φωσφορική γλυκόζη, που μαζί με τη τριφωσφορική ουριδίνη (UTP) αποτελούν το υπόστρωμα για την παραγωγή

UDP-γλυκόζης μέσω μια αντίδρασης που καταλύεται από την πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης. Η κύρια αντίδραση της σύνθεσης του γλυκογόνου είναι η εξής:



Η παραπάνω αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο της συνθάσης του γλυκογόνου, όμως απαιτεί έναν εκκινητή, τη γλυκογονίνη. Η γλυκογονίνη αυτό-γλυκοζιλώνεται για να σχηματίσει μια πρόδρομη αλυσίδα ολιγοσακχαριτών και στη συνέχεια, μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου, αλληλεπιδρά με τη συνθάση του γλυκογόνου, η οποία επεκτείνει το μόριο του γλυκογόνου δημιουργώντας γλυκοζιτικούς δεσμούς α 1,4. Για το σχηματισμό των διακλαδώσεων στο μόριο του γλυκογόνου δρα ένα διαφορετικό ένζυμο μεγάλης ακρίβειας, το ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου. Ο σχηματισμός των διακλαδώσεων είναι πολύ σημαντικός καθώς αυξάνεται η διαλυτότητα και ο ρυθμός σύνθεσης και αποικοδόμησής του [15].

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ολοκληρώνεται με 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 για περαιτέρω μεταβολισμό [14].

Τα ένζυμα που καταλύουν τα παραπάνω βήματα είναι τα εξής [14]:

1. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η αντίδραση που καταλύει το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ονομάζεται φωσφορόλυση. Πιο συγκεκριμένα προκαλεί τη διάσπαση του γλυκογόνου (με n κατάλοιπα) με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi) σε 1-φωσφορική γλυκόζη και γλυκογόνο (με $n-1$ κατάλοιπα). Αυτή η αντίδραση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Η φωσφορυλάση δεν μπορεί να διασπάσει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6 με αποτέλεσμα να σταματά τη δράση της όταν φτάσει σε απόσταση 4 καταλοίπων από το σημείο της διακλάδωσης. Επίσης αυτό το ένζυμο έχει ένα μεγάλο ενεργειακό πλεονέκτημα, το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι το απελευθερούμενο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο [14].

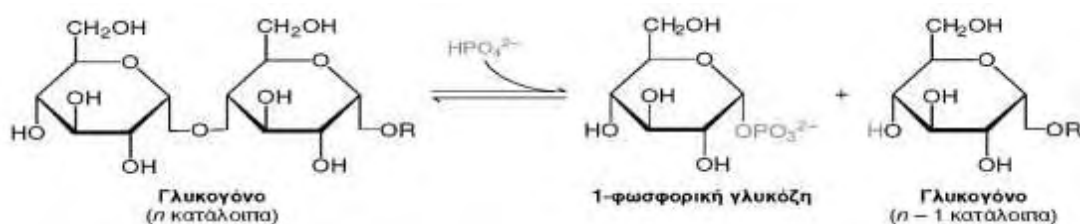
2. Ένζυμα αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου

Όπως προαναφέρθηκε, η φωσφορυλάση δεν μπορεί να διασπάσει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6 του γλυκογόνου με αποτέλεσμα να σταματά η διάσπαση. Έτσι, αναλαμβάνουν δράση δύο άλλα ένζυμα, για να καταστήσουν και το υπόλοιπο μόριο του γλυκογόνου προσβάσιμο στη φωσφορυλάση. Αρχικά μια μεταφοράση μετακινεί μία ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μία άλλη, αφήνοντας εκτεθειμένο ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης το

οποίο συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6. Στη συνέχεια η γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6 υδρολύει το γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6 με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενός μορίου γλυκόζης. Με αυτόν τον τρόπο το γλυκογόνο μετατρέπεται σε γραμμικό μόριο και να υποστεί φωσφορόλυση [14].

3. Φωσφογλυκομουτάση

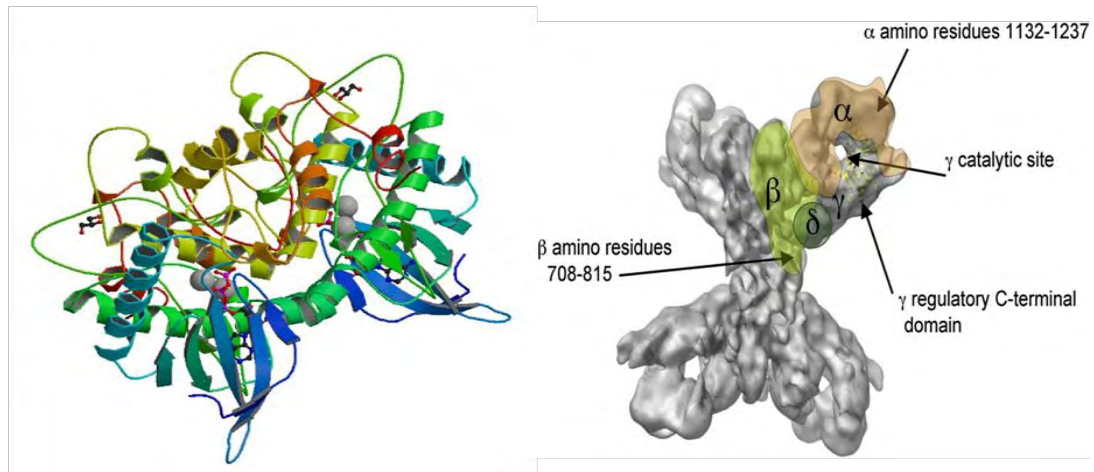
Το ένζυμο της φωσφομουτάσης καταλύει την μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη, με την ύπαρξη ενός ενδιάμεσου σταδίου, όπου έχουμε την παραγωγή 1,6 διφωσφορικής γλυκόζης. Το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου περιέχει μία φωσφορυλιωμένη σερίνη. Η φωσφορική ομάδα του καταλοίπου μεταφέρεται στην υδροξυλική ομάδα του C6 της 1-φωσφορικής γλυκόζης για το σχηματισμό 1,6 διφωσφορικής γλυκόζης (ενδιάμεσο στάδιο). Στη συνέχεια η φωσφορική ομάδα του C1 της 1,6 διφωσφορικής γλυκόζης μεταφέρεται στο κατάλοιπο σερίνης του καταλυτικού κέντρου της φωσφογλυκομουτάσης, με αποτέλεσμα την δημιουργία 6-φωσφορικής γλυκόζης και την αναγέννηση του ενζύμου [14].



Εικόνα 1.5 : Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου [14].

1.3 Κινάση της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου

Το ένζυμο της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) ανήκει στην οικογένεια κινάσες πρωτεϊνών, έχει δομή (αβγδ)₄ και είναι από τα μεγαλύτερα μόρια κινάσων που υπάρχουν [56]. Η ενεργοποίησή της πραγματοποιείται μέσα από ένα σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο ξεκινά με την ενεργοποίηση του ενζύμου της αδενυλικής κυκλάσης από την επινεφρίνη. Στην συνέχεια η αδενυλική κυκλάση μετατρέπει το ATP σε κυκλικό AMP, το οποίο ενεργοποιεί αλλοστερικά την cAMP-πρωτεϊνική κινάση, που με τη σειρά της καταλύει τη φωσφορυλιωτική ενεργοποίηση της PhK. Η δράση της PhK έχει ως στόχο την ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP), καταλύοντας την μετατροπή της από τη μορφή GPb (ανενεργός) σε GPa (ενεργός) με φωσφορυλίωση του καταλοίπου Ser14 [14].



Εικόνα 1.6: **A)** 3D δομή της *PhK-g-trnc* (PDB ID: 2PHK) **B)** Σχηματική απεικόνιση του ολοενζύμου της *PhK* όπου φαίνονται οι τοποθεσίες των τεσσάρων υπομονάδων του ενζύμου από μελέτες κryo-ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας της *PhK*.

1.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP)

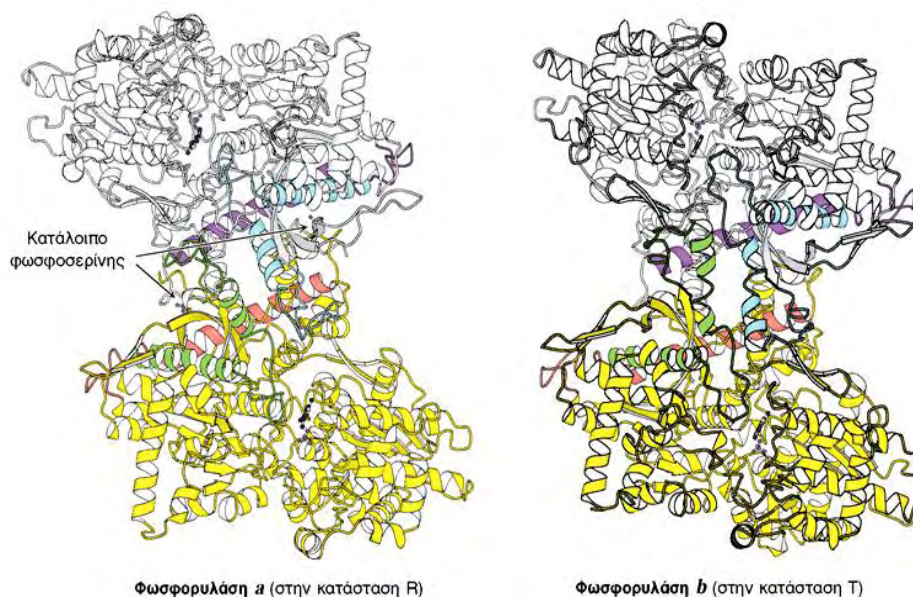
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο, ενώ αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσής του απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη. Δομικά, η GP είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο πανομοιότυπες υπομονάδες των 97 kDa (842 αμινοξέα). Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, τις αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου. Επίσης κάθε καταλυτικό κέντρο, σε κάθε υπομονάδα, περιέχει μια ομάδα φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), συνδεδεμένη με τη λυσίνη (Lys) 680 του ενζύμου [14].

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών παρέχει ενέργεια στους μύς, η ηπατική φωσφορυλάση παράγει γλυκόζη για χρήση από άλλους ιστούς, ενώ η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας [19].

Τόσο στους μύες όσο και στο ήπαρ, η GP υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές T και R: την αποφωσφορυλιωμένη χαμηλής δραστηριότητας και χαμηλής συγγένειας για το υπόστρωμα μορφή GPb και την φωσφορυλιωμένη στη Ser14 υψηλής δραστηριότητας και υψηλής συγγένειας για το υπόστρωμα, μορφή GPa. Και στις δύο μορφές, αλλοστερικοί τροποποιητές μπορούν να προωθήσουν την ισορροπία μεταξύ μιας λιγότερο ενεργούς κατάστασης T και μιας πιο ενεργούς κατάστασης R [19], [17].

Φυσιολογικά η δραστηριότητα της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο PhK, μια πολύ μεγάλη πρωτεΐνη στους σκελετικούς μύς. Η κινάση μετά από

έναν ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a. Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G,(PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b [57].



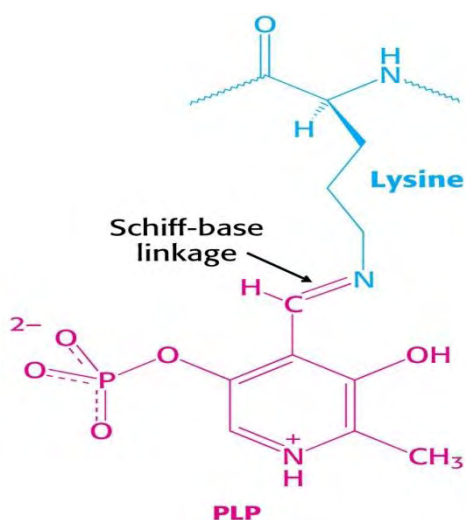
Εικόνα 1.7: Δομή της φωσφορυλάσης *a* και της φωσφορυλάσης *b*. Η φωσφορυλάση *a* φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 14 κάθε υπομονάδας. Η τροποποίηση αυτή ευνοεί τη δομή της πλέον ενεργού κατάστασης R. Η μία υπομονάδα δείχνεται με λευκό, ενώ οι έλικες και οι θηλιές, που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση, με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα δείχνεται με κίτρινο και οι ρυθμιστικές δομές με πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν φωσφορυλιώνεται και υπάρχει κυρίως στην κατάσταση T_a [14].

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορύλωσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μια βαθιά σχισμή που σχηματίζεται με κατάλοιπα ανάμεσα στην καρβοξυ-τελική και την αμινο-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα, γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν, πλησιάζουν έτσι ώστε να επιτευχθεί η φωσφορύλωση του γλυκογόνου, και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας μόρια ύδατος, με τη βοήθεια της PLP [20].

1.4.1 Ρόλος 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. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η διάσπαση χρειάζεται τον αποκλεισμό του ύδατος από το ενεργό κέντρο [14]. Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-

φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β , δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν. Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης (Lys680) του ενζύμου. Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό ιόν δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α -1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείονται μόρια ύδατος από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης [14].



Εικόνα 1.8: Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP(κόκκινο) σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (μπλε) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης [14].

1.4.2 Κέντρα Σύνδεσης της GP

Υπάρχουν επτά κέντρα σύνδεσης στο ένζυμο της GP [21]:

1. Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
2. Καταλυτικό κέντρο (C)
3. Αλλοστερικό κέντρο (N)
4. Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
5. Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)

6. Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων)
7. Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

1.4.2.1 Κέντρο Φωσφορυλίωσης Ser14

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

1.4.2.2 Καταλυτικό Κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (G1P, Pi) και αναλόγων τους (UDP-Glc). Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται ο συμπαραάγοντας PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενός στενού καναλιού, αλλά περιορίζεται κυρίως από τον βρόχο 280s. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση T σε R, ο βρόχος 280s εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από την βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 συμβάλλει στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας [22], [17].

1.4.2.3 Αλλοστερικό Κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις δυο διαμορφώσεις, T και R, της GPa και της GPb [58]. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από τρία υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

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

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν, είτε αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων [23].

1.4.2.4 Αποθηκευτικό Κέντρο

Το αποθηκευτικό κέντρο ή κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε ένα αβαθές αυλάκι που σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας [24]. Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης [19].

1.4.2.5 Νουκλεοζιτικό Κέντρο

Το νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) είναι ένα υδρόφοβο κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Στην T διαμόρφωση του ενζύμου, το κέντρο αναστολής εμποδίζει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχτεί πως οι πουρίνες (όπως η αδεΐνη και η καφεΐνη), τα νουκλεοσίδια (όπως η αδενοσίνη και η ινωσησίνη), τα νουκλεοτίδια (όπως το AMP, το IMP και το ATP), το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένες ετεροκυκλικές ενώσεις (όπως η ριβοφλαβίνη) προσδένονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GP_a και GP_b, όχι όμως και της ηπατικής GP_a, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα [22], [18].

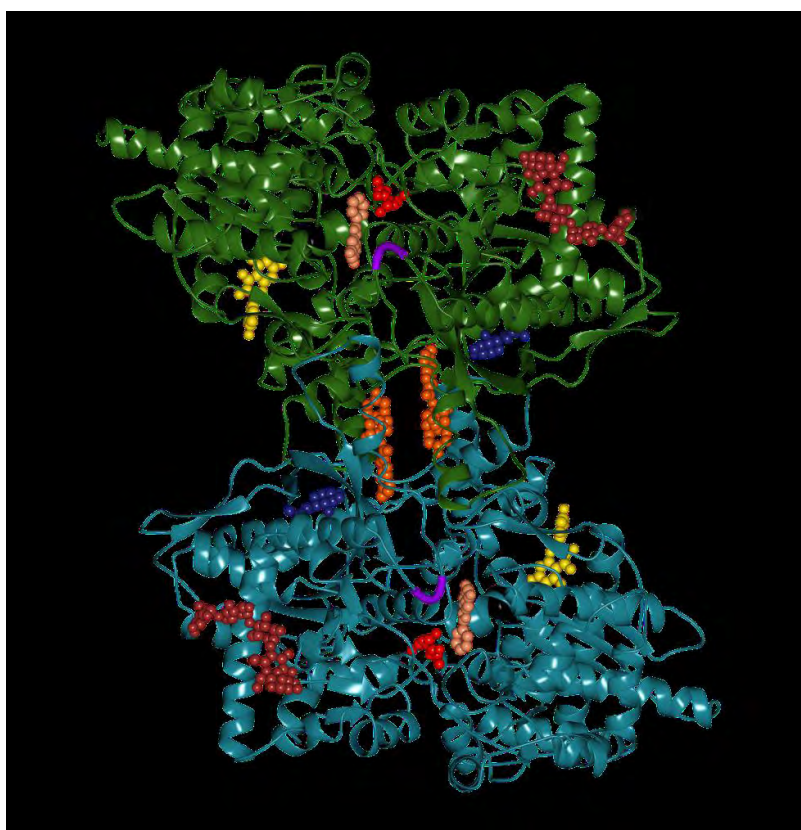
Στην T διαμόρφωση της GP, η Phe285 του βρόχου 280s εντοπίζεται κοντά στην Tyr613 και μαζί, αυτά τα δυο υδρόφοβα κατάλοιπα, συνεργατικά, συγκροτούν το κέντρο αναστολής. Η κατάληψη αυτού του κέντρου από ένα μόριο έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου καθώς επίσης και τη φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP [22].

1.4.2.6 Νέο Αλλοστερικό Κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GP_b και απέχει 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολέας. Ο ισχυρότερος φυσικός αναστολέας του νέου αλλοστερικού κέντρου είναι το ινδόλιο. Οι αναστολείς που συνδέονται σε αυτό το κέντρο σταθεροποιούν την κατάσταση T (ανενεργός) και εμφανίζουν συνέργεια με άλλους αναστολείς, όπως η γλυκόζη [17], [25].

1.4.2.7 Κέντρο Πρόσδεσης Κερσετίνης

Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης ανακαλύφθηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας (Kantsadi A.L. et al., 2014), και βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Lys544, Arg551, Lys665 και Tyr548 της C-περιοχής και από τα κατάλοιπα Glu120 και Glu123 της N-περιοχής. Αυτή η ανακάλυψη έδειξε πως το μόριο της κερσετίνης δεσμεύεται σε διαφορετική θέση από το AMP, σταθεροποιώντας την Τα διαμόρφωση της GPb. Επίσης βρέθηκε ότι μπορεί να αναστείλει τη γλυκογονόλυση στα ηπατοκύτταρα [26].



Εικόνα 1.9: Η κρυσταλλική δομή της GPb με τα έξι κέντρα πρόσδεσης: καταλυτικό κέντρο (G6P), κέντρο αναστολής (3EBO), κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου (1P29), νέο αλλοστερικό κέντρο (1H5U), κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης (4MRA), αλλοστερικό κέντρο (1GPY), βρόχος 280S και η Ser14.

1.4.3 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 [19]. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή αποτελεί ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό κατέχοντας σημαντικό ρόλο τόσο στην αποθήκευση όσο και στην

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

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 [27]. 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 [28].

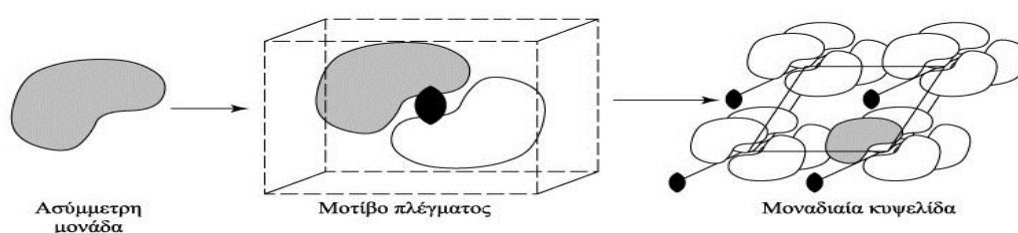
Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP) που μελετήθηκε με ακτίνες 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 [29].

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 [30].

1.5 Κρυσταλλογραφία

1.5.1 Κρύσταλλος

Ως κρύσταλλοι ορίζονται τα στερεά σώματα που αποτελούνται από ακριβείς επαναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου. Ένας κρύσταλλος δημιουργείται από πολλά δισεκατομμύρια μικρές πανομοιότυπες μονάδες που καλούνται στοιχειώδεις κυψελίδες, οι οποίες πακετάρονται η μία δίπλα στην άλλη στις τρεις διαστάσεις. Η συστοιχία των σημείων στις γωνίες ή στις κορυφές των μοναδιαίων κυψελίδων ονομάζεται πλέγμα. Η στοιχειώδης κυψελίδα μπορεί να περιέχει ένα ή και περισσότερα μόρια πρωτεΐνης. Αν και ο αριθμός μορίων ανά κυψελίδα είναι σταθερός για όλες τις κυψελίδες ενός κρυστάλλου, μπορεί να είναι διαφορετικός για διαφορετικές κρυσταλλικές μορφές της ίδιας πρωτεΐνης. Είναι ιδιαίτερη δύσκολη η παραγωγή ενός καλά οργανωμένου κρυστάλλου εξαιτίας του σχηματισμού μεγάλων κενών ανάμεσα στα μόρια της πρωτεΐνης, καθώς τα πρωτεϊνικά μόρια είναι μεγάλα, σφαιρικά ή ελλειψοειδή, με ανώμαλες επιφάνειες. Αυτά τα κανάλια, που μπορεί να καταλαμβάνουν ακόμα και το μισό όγκο του κρυστάλλου, είναι γεμάτα με μόρια του διαλύτη. Τα μόρια έρχονται σε επαφή μεταξύ τους σε λίγες και μικρές περιοχές, όπου πολλές από τις αλληλεπιδράσεις τους είναι έμμεσες και δημιουργούνται μέσω ενός ή και περισσότερων στρωμάτων μορίων του διαλύτη [34]. Σε ένα κρύσταλλο, η μοριακή οντότητα που αντιστοιχεί στο επίπεδο χωρίς καμία συμμετρία, καλείται ασύμμετρη μονάδα. Όλες οι μοριακές ιδιότητες ενός κρυστάλλου μπορούν να αποδοθούν σε εκείνες της ασύμμετρης μονάδας. Εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων μπορεί να βεβαιωθεί ότι όλα τα μόρια ή οι ομάδες μορίων που αποτελούν την ασύμμετρη μονάδα σε ένα κρύσταλλο, κατάλληλο για μελέτη με περίθλαση ακτίνων-Χ, έχουν ουσιαστικά την ίδια στερεοδιάταξη. Επομένως, για να επιλυθεί η δομή ενός κρυστάλλου, χρειάζεται να επιλυθεί η δομή μόνο της ασύμμετρης μονάδας [30,31].



Εικόνα 1.10: Τα στοιχεία ενός κρυστάλλου. Η ασύμμετρη μονάδα είναι εκείνο το μέρος του κρυστάλλου που δεν εμφανίζει καμία συμμετρία. Ένας τελεστής συμμετρίας παράγει το μοτίβο του δικτυωτού πλέγματος. Η επανάληψη αυτού του μοτίβου από τη μετατόπιση παράγει τις κορυφές της μοναδιαίας κυψελίδας, η οποία είναι η βασική μονάδα επανάληψης του πλέγματος του κρυστάλλου [32].

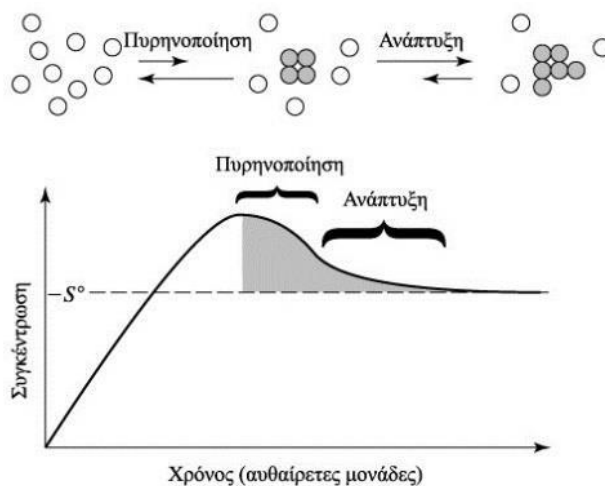
1.5.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων

Η κρυσταλλογραφική μελέτη ξεκινά με τη διαδικασία της κρυστάλλωσης. Η κρυστάλλωση απαιτεί συγκεκριμένες συνθήκες, καθώς είναι εξαιρετικά ευαίσθητη τόσο στο pH, τη θερμοκρασία, τους διαλύτες και τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας. Είναι μια σχετικά αργή διαδικασία, που απαιτεί αρκετές μέρες και στηρίζεται στην αρχή της βαθμιαίας αύξησης της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας σε κατάλληλο διαλύτη μέχρι ένα σημείο πέραν του κορεσμού. Η συγκέντρωση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους, όπως βραδείας εξάτμισης, βραδείας ψύξης ή διάχυσης. Οι πυρήνες κρυστάλλωσης που θα προκύψουν, ανάλογα με τη συγκέντρωση και τη θερμοκρασία του διαλύματος, θα πρέπει να έχουν ορισμένο μέγεθος για να προχωρήσει η διαδικασία της κρυστάλλωσης.

Ένας κρύσταλλος είναι ένα στερεό, αλλά τα μακρομόρια υπάρχουν συνήθως σε μορφή υδατικών διαλυμάτων. Κρύσταλλοι σχηματίζονται από τη διαδικασία ψύξης στα διαλύματα, τήγματα και ατμούς. Κατά τη μεταβολή της θερμοκρασίας, πίεσης ή την εξάτμιση του διαλύτη, η απόσταση των ατόμων ελαττώνεται και σχηματίζεται πλέγμα όπου τα άτομα καταλαμβάνουν συγκεκριμένες θέσεις, χαρακτηριστικό της κρυσταλλικής κατάστασης. Η κρυστάλλωση από ένα διάλυμα επιτυγχάνεται κατά την εξάτμιση του διαλύτη, μείωση της πίεσης και πτώση της θερμοκρασίας του διαλύματος. Εάν η ταχύτητα της εξάτμισης είναι αργή, τότε σχηματίζονται μεγάλοι κρύσταλλοι ενώ μικροί κρύσταλλοι δημιουργούνται με ταχεία εξάτμιση. Παράδειγμα: καταβύθιση άλατος [32]. Κατά τη διαδικασία της πήξης δημιουργούνται κόκκοι κρυστάλλων και περιλαμβάνουν τα εξής στάδια:

- Πυρηνοποίηση: Υβρίδια – Πυρήνες. Η κρυστάλλωση ξεκινά από ένα πυρήνα ή ένα κέντρο κρυστάλλωσης.
- Ανάπτυξη: Κρύσταλλοι

Η πυρηνοποίηση είναι το στάδιο δημιουργίας υβριδίων, όταν η θερμοκρασία είναι λίγο χαμηλότερη του σημείου πήξης, που καταλαμβάνουν μικρό όγκο μέσα στο περιβάλλον υγρό. Καθώς η θερμοκρασία μειώνεται τα υβρίδια αυξάνονται σε αριθμό και μέγεθος. Η ανάπτυξή τους συνεχίζεται μέχρι τα όριά τους να συγκρουστούν και να καταλάβουν όλο τον όγκο του τήγματος, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό τους κρυστάλλους. Όσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα ψύξης τόσο και ο δημιουργούμενος κόκκος είναι λεπτόκοκκος. Αντιθέτως χονδρόκοκκοι κρύσταλλοι σχηματίζονται σε βραδεία ψύξη. Οι λεπτόκοκκοι κρύσταλλοι παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη μηχανική αντοχή από χονδρόκοκκους [32].



Εικόνα 1.11: Μηχανισμός της κρυστάλλωσης. Το αρχικό βήμα είναι ο σχηματισμός πυρήνων ενός ελάχιστου κρυσταλλικού πλέγματος. Αυτό είναι ένα μικρής πιθανότητα βήμα που εμφανίζεται σε ένα υπέρκορο διάλυμα. Ο κρύσταλλος αναπτύσσεται με την προσθήκη μορίων στην επιφάνεια του πυρήνα. Αυτό συμβαίνει σε συγκεντρώσεις κοντά στην διαλυτότητα S_0 του μορίου [32].

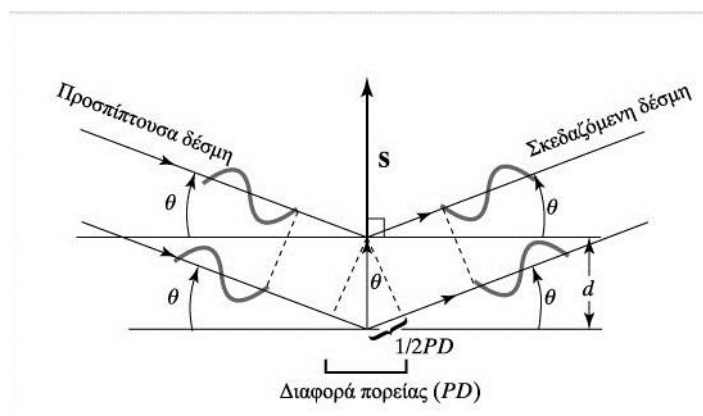
1.5.3 Η θεωρία της περίθλασης των ακτίνων Χ

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 8000 eV, 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 [32].

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 λ) προσπίπτει στα ανακλώντα υπό γωνία θ . Η ανάκλαση από τα επίπεδα σκεδαρίζει το κύμα υπό την ίδια γωνία [32].



Εικόνα 1.12: Ενισχυτική και αναιρετική συμβολή σκεδαζόμενων κυμάτων. (α) Δύο σημεία σκέδασης που συναντούν την επιφάνεια ενός προσπίπτοντος μετώπου κύματος λειτουργούν ως σημεία διάδοσης. (β) Τα πλάτη E των προκυπτόντων κυμάτων από τα σημεία σκέδασης αθροίζονται για να διαμορφώσουν ένα νέο κύμα με πλάτος διπλάσιο του αρχικού κατά μήκος των διανυσμάτων $2E$ του (α). (γ) Τα κύματα που είναι 180° εκτός φάσης αλληλοεκμηδενίζονται, δίνοντας συνολικά πλάτος κατά μήκος των διανυσμάτων 0 των (α) [32].

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-X .

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

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 στόχο 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 (θ) 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 [32].

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):

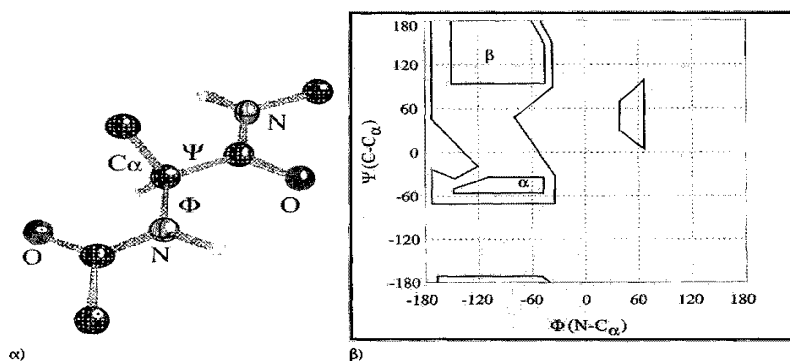
$$R = \frac{\sum |F(S)_{obs}| - |F(S)_{calc}|}{\sum |F(S)_{obs}|}$$

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) [32].

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 ϕ και ψ 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 [32].



Εικόνα 1.13: α) Ορισμός των φ (Cα-N) και ψ (Cα-C) δίεδρων γωνιών και β) το διάγραμμα Ramachandran για κατάλυτα εκτός γλυκίνης (περιοχή χωρίς γράμμα) ενώ η περιοχή α: δεξιόστροφη α-έλικα και η περιοχή β: αντιπαράλληλη-παράλληλη πτυχωτή επιφάνεια [33].

1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Στην κατάλυση μίας ενζυμικής αντίδρασης συμμετέχει μόνο μία περιοχή του ενζύμου που ονομάζεται ενεργό κέντρο. Το υπόστρωμα δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο και σχηματίζεται το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Συνεπώς η δραστηριότητα του ενζύμου εντοπίζεται στο ενεργό κέντρο του. Μετά τη δέσμευση του υποστρώματος στο ένζυμο, ακολουθεί χημική μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν το οποίο απελευθερώνεται από το ενεργό κέντρο. Η σύνδεση των υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου έχει ως αποτέλεσμα την προσέγγισή τους και τον κατάλληλο προσανατολισμό τους ώστε να διευκολυνθεί η αντίδραση. Όμως ο ρόλος του ενεργού κέντρου δεν περιορίζεται μόνο στην προσέγγιση και προσανατολισμό των αντιδρώντων - υποστρωμάτων. Ταυτόχρονα παρέχει το χημικό περιβάλλον το οποίο καταλύει την αντίδραση [35].

Ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης είναι ο ρυθμός με τον οποίο μειώνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος ή αυξάνεται η συγκέντρωση του προϊόντος (μεταβολή συγκέντρωσης στη μονάδα του χρόνου). Σύμφωνα με το μοντέλο των Michaelis-Menten το ένζυμο (E) αντιδρά με το υπόστρωμα (S) και σχηματίζουν το ενδιάμεσο σύμπλοκο ES. Το ES είτε θα ξαναδώσει E και S είτε θα σχηματίσει το ένζυμο και το προϊόν (P).



Όπου k_1 , k_2 , k_3 , οι σταθερές των αντίστοιχων αντιδράσεων [36].

Η γραφική παράσταση της εξίσωσης Michaelis-Menten είναι μία υπερβολή. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος (S) η αρχική ταχύτητα (V_0) αυξάνεται γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Σε υψηλές συγκεντρώσεις S όλα τα μόρια του ενζύμου είναι με τη μορφή συμπλόκου (κορεσμός) και η ταχύτητα τείνει στη μέγιστη τιμή (V_{max}). Η μαθηματική σχέση που εξηγεί την κινητική των ενζύμων είναι η εξής:

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

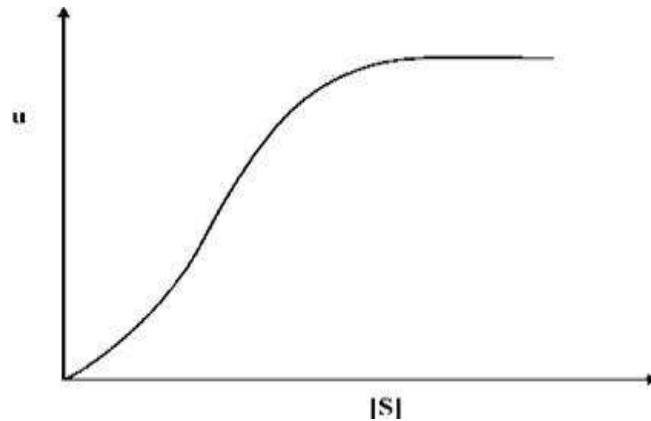
Η K_m ονομάζεται **σταθερά Michaelis-Menten** και ισούται με:

$$K_m = \frac{k_3 + k_2}{k_1}$$

Η K_m αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά για κάθε ένζυμο. Είναι μέτρο της σταθερότητας του συμπλόκου ES και εκφράζει τον βαθμό συγγένειας ενζύμου – υποστρώματος. Χαμηλές τιμές K_m φανερώνουν μεγάλη συγγένεια, ενώ υψηλές τιμές K_m μικρή συγγένεια ενζύμου – υποστρώματος. Μετράται με μονάδες συγκέντρωσης (mol/L). Η τιμή της ισούται αριθμητικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος για την οποία έχουμε το μισό της μέγιστης ταχύτητας ($K_m = V_{max}/2$) [14].

1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα και κινητικές μελέτες

Τα αλλοστερικά ένζυμα αποτελούνται από δύο ή περισσότερες πεπτιδικές αλυσίδες με ένα ή περισσότερα ενεργά κέντρα ή καθεμία. Έχουν δύο θέσεις δέσμευσης, το ενεργό κέντρο που δεσμεύεται το υπόστρωμα και μία περιοχή στην οποία δεσμεύεται το μόριο ρυθμιστής. Ο ρυθμιστής μπορεί να επηρεάζει θετικά ή αρνητικά την ενζυμική αντίδραση (αλλοστερικός αναστολέας ή αλλοστερικός ενεργοποιητής). Όταν το μόριο ρυθμιστής συνδεθεί στο ένζυμο επάγει αλλαγές στη διαμόρφωσή του και στο ενεργό κέντρο με αποτέλεσμα να ρυθμίζεται (ευνοείται ή αναστέλλεται) η δέσμευση του υποστρώματος. Η κινητική των αλλοστερικών ενζύμων δεν ακολουθεί το μοντέλο Michaelis-Menten. Εμφανίζουν σιγμοειδής γραφικές παραστάσεις της ταχύτητας της αντίδρασης [V_0], σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος [S] [14].



Εικόνα 1.14: Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου: Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν σιγμοειδή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος [14].

1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Η ενζυμική ενεργότητα επηρεάζεται από την ύπαρξη αναστολέων. Οι αναστολείς ενζύμων (I) είναι συνδέτες που ενώνονται ειδικά με ένα ένζυμο με ένα τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνουν την ικανότητα του να συνδέει το υπόστρωμα και να το μετατρέπει σε προϊόν, παρεμποδίζουν στην ουσία την ενζυμική αντίδραση. 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 και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Ένας *αντιστρεπτός αναστολέας* μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα (π.χ. με διαπίδυση) και όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά την δραστηριότητά του. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς (I) δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο (E), έτσι, ώστε να αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας. Όλα τα είδη αντιστρεπτών αναστολέων χαρακτηρίζονται από την σταθερά διαστάσεως του αναστολέα K_i , η οποία αφορά τη διάσταση του συμπλόκου EI και επηρεάζει την K_M ή την V_{max} του ενζύμου με τον όρο $1+[I]/K_i$.

Στη *συναγωνιστική αναστολή*, ο αναστολέας (I) δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και συναγωνίζεται με το υπόστρωμα (S) για δέσμευση στο ενεργό κέντρο. Ο αναστολέας αυτός καλείται *συναγωνιστικός*. Όταν υπάρχει *συναγωνιστικός αναστολέας*, η ταχύτητα της αντίδρασης μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή της V_{max} , διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Η σφραγίδα γνησιότητας της συναγωνιστικής αναστολής είναι ότι η δράση του αναστολέα μπορεί να υπερνικηθεί από αρκετά υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος. Εντούτοις, η φαινομενική τιμή της K_M

μεταβάλλεται. Η εξίσωση Michaelis - Menten στο σύστημα με συναγωνιστική αναστολή είναι της μορφής [37,35]:

$$V = \frac{V_{max} S}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) + S}$$

Στη μη-συναγωνιστική αναστολή, το υπόστρωμα μπορεί να προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα. Εντούτοις, το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Δεδομένου ότι ο αναστολέας συνδέεται σε διαφορετική περιοχή από αυτήν του υποστρώματος, η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος δεν ωφελεί. Στην ουσία ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου. Το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου. Η K_M δεν επηρεάζεται αλλά η V_{max} ελαττώνεται. Η μη-συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να υπερνικηθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος [14].

Η κινητική Michaelis-Menten, όπως έχει τροποποιηθεί και επεκταθεί για να περιλαμβάνει και αντιστρεπτές αντιδράσεις και αντιδράσεις δύο ή περισσοτέρων υποστρωμάτων, ισχύει για πάρα πολλές ενζυμικές αντιδράσεις. Για να υπολογιστούν πειραματικά οι K_m και V_{max} χρησιμοποιούνται οι καμπύλες διπλού αντιστρόφου $1/V_0$ ως προς $1/S$ των Lineweaver-Burk, που είναι γνωστή και σαν μέθοδος του διπλού αντιστρόφου [38]. Η εξίσωση των Michaelis-Menten γίνεται:

$$\frac{1}{V_{max}} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

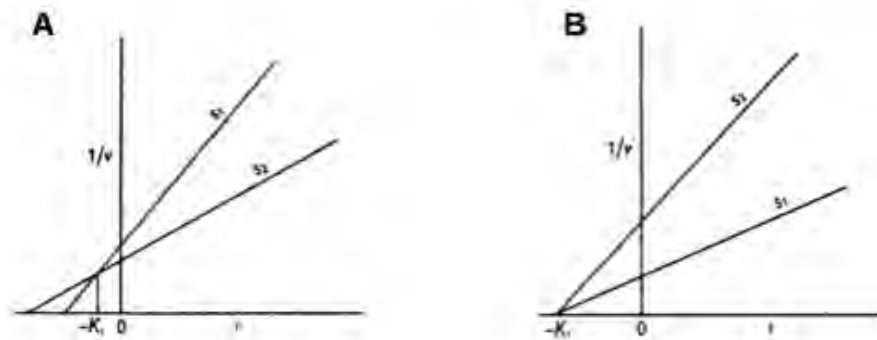
Η παραπάνω σχέση περιγράφει την ευθεία η οποία λαμβάνεται από τη γραφική παράσταση των *Lineweaver-Burk*, και η οποία προκύπτει εάν παραστήσουμε γραφικά τις τιμές $1/v$ στον άξονα των τεταγμένων και $1/[S]$ στον άξονα των τετημένων. Η κλίση της ευθείας ισούται με K_m/V_{max} , το σημείο στο οποίο η ευθεία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων ισούται με $1/V_{max}$ και το σημείο στο οποίο τέμνει τον άξονα των τετημένων ισούται με $-1/K_M$. Η μέγιστη ταχύτητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου και δεν αποτελεί σταθερά όπως η K_M [36].

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

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

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 x να προσδιορίζει την τιμή $-K_i$.



Εικόνα 1.15: Α. Προσδιορισμός K_i σε συναγωνιστική αναστολή, Β. Προσδιορισμός K_i σε μη συναγωνιστική αναστολή.

Κάθε γραμμή σύμφωνα με την σχέση (1) παίρνει τη μορφή:

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{VS} + \frac{1}{V} + \frac{Km}{VS} \frac{i}{Ki} \quad (2)$$

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:

$$\frac{Km}{S_1} + 1 + \frac{Km}{S_1} \frac{i}{Ki} = \frac{Km}{S_2} + 1 + \frac{Km}{S_2} \frac{i}{Ki} \quad \text{ή} \quad \frac{1}{S_1} \left(1 + \frac{i}{Ki}\right) = \frac{1}{S_2} \left(1 + \frac{i}{Ki}\right)$$

Τα παραπάνω μπορούν να ισχύουν μόνο αν $[S_1] = [S_2]$ ή $[i] = -K_i$

Στην περίπτωση της μη-συναγωνιστικής αναστολής, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της Εικόνας, 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:

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

2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αντιδραστήρια

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Acetic acid (CH ₃ 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
BES	Sigma
Bis acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay 5x	Biorad
Bromophenole blue	Research Organics
Calcium Chloride Dehydrate (CaCl ₂)	Sigma
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycerol	Appllichem
Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Appllichem
Imidazole 99%	Sigma
Imidazole BioUltra	Sigma
Inosine Monophosphate (IMP)	Sigma
KHCO ₃	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
LB-Agar	Serva
Magnesium acetate tetrahydrate (CH ₃ COOH) ₂ Mg	Appllichem
Magnesium Chloride anhydrous (MgCl ₂)	Alfa Aesar
Manganese (II) Chloride (MnCl ₂)	Sigma
Methanol	Scharleu

Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Scharleu
NaH ₂ PO ₄	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
α-D-glucose-1-Phosphate	Sigma
β-GP	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Πυκνό διάλυμα αμμωνίας	Fluka
Na ₂ HPO ₄	Merck

2.2 Οργανολογία

ΟΡΓΑΝΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
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 μM	Sartorius Stedim
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.2 μM	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 30000 cut-off	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 10000 cut-off	Sartorius Stedim
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Σύστημα απεικόνισης	Protein Simple

2.3 Βακτηριακά Στελέχη και Πλασμίδια

ΚΥΤΤΑΡΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
E. coli BL-21 Gold (DE3)	Agilent Technologies

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
pETM-11_hIGp	Eurofin

2.4 Στήλες Υγρής Χρωματογραφίας

ΣΤΗΛΗ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
His-Trap (Ni ²⁺ Sepharose) υψηλής απόδοσης (HP)	GE Healthcare

ΣΤΗΛΗ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Resource Q	GE Healthcare

2.5 Μετασηματισμός Βακτηριακών Κυττάρων

Μετασηματισμός είναι η εισαγωγή μεμονωμένων πλασμιδιακών μορίων DNA σε κύτταρα. Υπάρχουν τέσσερα συστήματα μετασηματισμού των βακτηριακών κυττάρων, τα οποία περιλαμβάνουν i) τον χημικό μετασηματισμό, ii) τον ηλεκτρικό μετασηματισμό, iii) τον βιολιστικό μετασηματισμό και iv) τον μετασηματισμό μέσω υπερήχων.

Ο χημικός μετασηματισμός περιλαμβάνει τέσσερα στάδια:

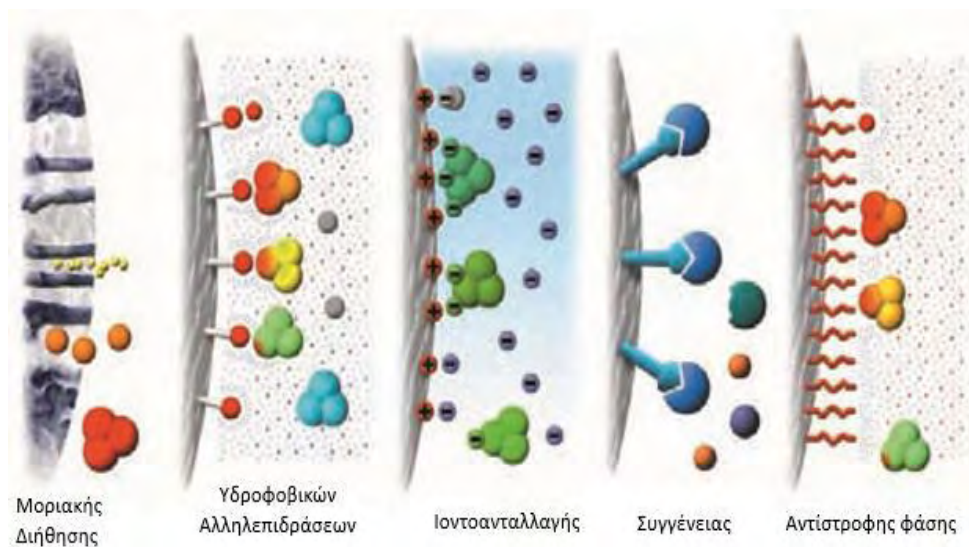
- Το εναιώρημα (100 μL) των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων τοποθετείται στον πάγο, για μερικά λεπτά, μέχρι να ξεπαγώσει. Αμέσως μόλις ξεπαγώσει, προστίθενται σε αυτό 1-50 ng πλασμιδιακού φορέα που φέρει το επιθυμητό γονίδιο. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και στη συνέχεια επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Τα βακτήρια υποβάλλονται σε σύντομο θερμικό σοκ, στους 42 °C, για 45 δευτερόλεπτα. Η αλλαγή στη θερμοκρασία αυξάνει τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέποντας στο μόριο του DNA να εισέλθει εντός του κυττάρου. Το δείγμα τοποθετείται άμεσα στον πάγο και επώαζεται για 2 λεπτά.
- Έπειτα προστίθενται 0,9 mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth, το οποίο είναι προθερμασμένο στους 37 °C και ακολουθεί επώαση των

μετασηματισμένων κυττάρων στους 37 °C για 1 ώρα, υπό ανάδευση (210 rpm).

- Τέλος, 50 και 150 μL των κυττάρων επιστρώνονται σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο LB Άγαρ, στο οποίο έχει προστεθεί αντιβιοτικό Καναμικίνη (τελικής συγκέντρωσης 20 $\mu\text{g/mL}$). Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C, για 16 ώρες [39].

2.6 Υγρή Χρωματογραφία-Συστημα FPLC

Η πρώτη χρήση της μεθόδου της χρωματογραφίας έγινε το 1903 από τον Mikhail Tswett και πλέον χρησιμοποιείται ευρέως τόσο για τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος όσο και για την ταυτοποίηση των εν λόγω συστατικών. Το σύστημα ταχείας υγρής χρωματογραφίας (FPLC) διαθέτει ποικίλες μεθόδους όπως τη χρωματογραφία συγγένειας, ιοντοανταλλαγής, μοριακής διήθησης, υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και αντίστροφης φάσης [40].



Εικόνα 2.1: Τα κυριότερα είδη της ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών [41].

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού χημικών ουσιών, η οποία στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινούμενης και μια στατικής φάσης. Ανάλογα με τη φύση της κινούμενης και της στατικής φάσης, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως αέριος ή υγρή. Ανάλογα με την τεχνική συγκράτησης της στατικής φάσης, έχουμε χρωματογραφία στήλης, λεπτής στιβάδας και χαρτοχρωματογραφία. Στον καθαρισμό πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η χρωματογραφία στήλης, όπου το πληρωτικό υλικό της στήλης αποτελεί τη στατική φάση και είναι συνήθως

κάποιο πολυμερές όπως η αγαρόζη. Οι στήλες του συστήματος μπορεί να είναι φτιαγμένες από γυαλί ή πλαστικό, ενώ η κινητή φάση είναι υγρή. Ο χρωματογραφικός καθαρισμός των πρωτεϊνών της παρούσας διατριβής πραγματοποιείται σε ψυκτικό θάλαμο σε θερμοκρασία 4 °C, με σύστημα καθαρισμού πρωτεϊνών Äkta purifier UPC-900. Το σύστημα περιλαμβάνει ρυθμιστή της ταχύτητας ροής των διαλυμάτων και του δείγματος στη στήλη, συσκευή συλλογής κλασμάτων, στην οποία καθορίζεται και ο όγκος αυτών, φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα των κλασμάτων σε πρωτεΐνη, με ταυτόχρονη μέτρηση και καταγραφή της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Πριν ξεκινήσει η διαδικασία του καθαρισμού, θα πρέπει όλα τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν να έχουν φιλτραριστεί και απαερωθεί [43].

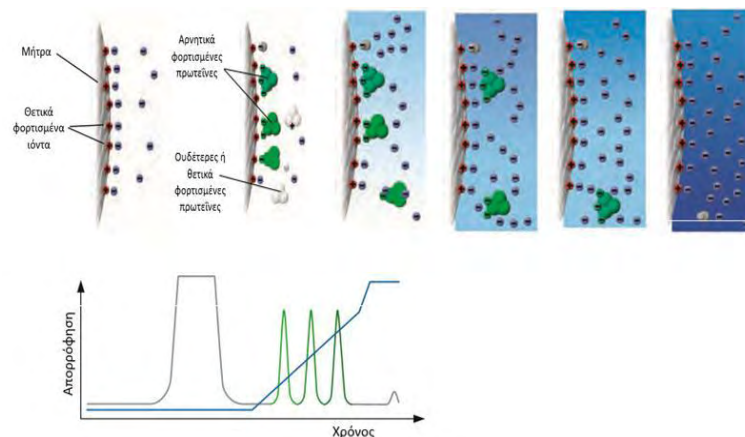
2.6.1 Χρωματογραφία Συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας είναι μία μέθοδος που εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια αρκετών πρωτεϊνών για ειδικές χημικές ομάδες. Η στήλη παρασκευάζεται από υλικό που φέρει αυτή τη χημική ομάδα και εξισορροπείται με το διάλυμα πρόσδεσης, δηλαδή με το διάλυμα όπου θέλουμε να γίνει η πρόσδεση της πρωτεΐνης. Το πρωτεϊνικό μίγμα διηθείται μέσω της στήλης και οι πρωτεΐνες που έχουν υψηλή συγγένεια με την χημική ομάδα προσδένονται σταθερά σε αυτή, σε αντίθεση με άλλα βιομόρια που συνυπάρχουν στο μίγμα. Στη συνέχεια εκλούεται με τη μεταβολή του pH ή της αλατότητας του περιβάλλοντος της στήλης ή με ανταγωνισμό με περίσσεια της ανταγωνιστικής χημικής ομάδας στη διαλυτή της μορφή και η πρωτεΐνη στόχος συλλέγεται σε καθαρή, συμπυκνωμένη μορφή. Τέλος το υλικό της στήλης επανα-εξισορροπείται με το διάλυμα πρόσδεσης για εκ νέου χρήση της στήλης.

Μια κατηγορία της χρωματογραφίας συγγένειας αποτελεί η χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση ακινητοποιημένων μετάλλων σε σφαιρίδια αγαρόζης ή σεφαρόζης (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC). Τα δισθενή κατιόντα μετάλλων που ακινητοποιούνται, για τον καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που διαθέτουν ετικέτα ιστιδινών (His-Tag), είναι τα εξής: Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} ή Fe^{2+} . Τα Ni^{2+} είναι αυτά που χρησιμοποιούνται ευρύτερα. Συνήθως οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες διαθέτουν τουλάχιστον 6 ιστιδίνες, οι οποίες βρίσκονται είτε στο N-τελικό είτε στο C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και προσφέρουν μια υψηλή συγγένεια ως προς τα Ni^{2+} . Η έκλουση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών από την ρητίνη γίνεται με τη χρήση προσδετών που έχουν επίσης συγγένεια για το ακινητοποιημένο μέταλλο. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι το ιμιδαζόλιο το οποίο είναι όμοιο με τον δακτύλιο της ιστιδίνης [41].

2.6.2 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν και βάσει των φορτίων τους με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Ion Exchange Chromatography, IEC). Αν το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης σε pH 8 είναι αρνητικό, αυτή συνήθως θα δεσμευθεί σε στήλη από κόκκους που περιέχουν θετικά φορτισμένα ιόντα, ενώ μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη δε θα δεσμευθεί στη στήλη αυτή. Σε ένα τυπικό πείραμα χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτισμένων μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν και των αντίθετα φορτισμένων σφαιριδίων του υλικού της ρητίνης. Σε pH πάνω από το pI αυξάνεται το καθαρό αρνητικό φορτίο και η πρωτεΐνη μπορεί να προσδεθεί σε υλικό που είναι θετικά φορτισμένο (ανιοανταλλάκτες) ενώ σε pH κάτω από το pI αυξάνεται το καθαρό θετικό φορτίο με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να προσδέεται σε αρνητικά φορτισμένα σφαιρίδια (κατιοανταλλάκτες). Αρχικά, γίνεται εξισορρόπηση της στατικής φάσης στις επιθυμητές συνθήκες. Όταν επιτευχθεί ισορροπία, όλες οι φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης δεσμεύονται με ανταλλάξιμα αντίθετα φορτισμένα ιόντα. Στη συνέχεια γίνεται η εισαγωγή του δείγματος, όπου γίνεται η δέσμευση πρωτεϊνών-στόχων και η απομάκρυνση των υπόλοιπων μη συνδεδεμένων μορίων, έπειτα από πλύση. Μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη που είναι δεσμευμένη σε μια τέτοια στήλη μπορεί μετέπειτα να εκλουστεί με αύξηση της συγκέντρωσης άλατος. Τα ιόντα συναγωνίζονται με τα θετικά φορτία της πρωτεΐνης για τη δέσμευση στη στήλη. Τέλος η αναγέννηση της στήλης γίνεται με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος υψηλής ιοντικής ισχύος, ούτως ώστε να απομακρυνθεί οτιδήποτε έχει δεσμευτεί στη στήλη. Η στήλη επανα-εξισορροπείται στο αρχικό διάλυμα για να χρησιμοποιηθεί ξανά [42].



Εικόνα 2.2: Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Παράδειγμα απομόνωσης και καθαρισμού αρνητικά φορτισμένης πρωτεΐνης. Παρατηρούμε ότι οι λιγότερο ισχυρά προσδεδμενες πρωτεΐνες απομακρύνονται πρώτες στα κλάσματα της έκλουσης [42].

Μία από τις χρησιμοποιούμενες στήλες για την χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι η 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) [42].

2.7 Πρωτεάση TEV

Για την απομάκρυνση ετικετών συγγένειας με ιστιδίνες χρησιμοποιείται κυρίως η πρωτεάση TEV. Έχει μοριακό βάρος 49 kDa και η δράση της οφείλεται στην C-τελική της περιοχή με μοριακό βάρος 27 kDa. Η αμινοξική αλληλουχία που αναγνωρίζεται είναι η Glu-Xaa-Xaa-Tyr-Xaa-Gln↓Ser/Gly, όπου Xaa δηλώνει την παρουσία οποιουδήποτε αμινοξέος [44].

2.8 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών

Ηλεκτροφόρηση καλείται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό φορτίο μπορεί να μετακινηθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης και τον συντελεστή τριβής. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή, διότι η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει το διαχωρισμό. Τα μικρά μόρια μετακινούνται εύκολα διαμέσου των πόρων της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε λεπτό στρώμα πολυακρυλαμιδίου. Σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μακρών αλυσίδων ακρυλαμιδίου που συνδέονται με εγκάρσιες γέφυρες μορίων δισ-ακρυλαμιδίου, δημιουργώντας πηκτώματα με μέγεθος πόρων που εξαρτώνται από την αναλογία των δύο μορίων αλλά και από την ολική συγκέντρωσή. Έτσι αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου, οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των πόρων και το αντίστροφο. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί τελικά, εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μίας ουσίας που παρέχει ελεύθερες ρίζες όπως το υπερθειικό αμμώνιο (APS), και ενός καταλύτη, όπως είναι η N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού και έτσι η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να γίνεται απουσία O₂, αφού αυτό μπορεί να δεσμεύει της ελεύθερες ρίζες και ως εκ τούτου να σταματήσει τη δημιουργία της πηκτής.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή μάζα τους. Στο μίγμα των πρωτεϊνών προστίθεται SDS (sodium dodecyl sulfate, δωδεκάκυκλο-θειικό νάτριο) το οποίο συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών και αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να αποδιατάσσονται, να διαχωρίζονται στις υπομονάδες τους και να δημιουργούνται σύμπλοκα πρωτεΐνης-SDS. Στα σύμπλοκα αυτά, ο λόγος της ποσότητας του ανιόντος SDS που συνδέεται ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης είναι σταθερός (ένα μόριο SDS /2 αμινοξέα). Έτσι το συνολικό αρνητικό φορτίο που αποκτάται είναι περίπου ανάλογο της μοριακής μάζας της πρωτεΐνης και πολύ μεγαλύτερο από ό,τι το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης. Η κινητικότητα των πρωτεϊνών στη πηκτή με κατεύθυνση την θετικά φορτισμένη άνοδο είναι ανάλογη με το μοριακό τους μέγεθος. Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται ταχύτερα στους πόρους της πηκτής από πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας. Η απόσταση που διανύεται είναι αντιστρόφως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους. Συνήθως γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών, πριν την ηλεκτροφόρηση, α) με τη χρήση αντιδραστηρίων που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως π.χ. 2-μερκαπτοαιθανόλη β) με θέρμανση στους 100°C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη και μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Η πιο δημοφιλής τεχνική SDS-PAGE είναι μια μη συνεχή ηλεκτροφόρηση πηκτής: η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοίβασης και την πηκτή διαχωρισμού οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιοντική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβασης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύσει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ζώνη και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός τους. Μετά την ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει ανίχνευση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με χρώση με Coomassie Blue. Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ γίνονται και αλληλεπιδράσεις χρωστικής-πρωτεϊνών μέσω δυνάμεων van der Waals. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται μέχρι 0,1 μg πρωτεΐνης ανά ζώνη.

Οι πηκτές επιστοίβασης (stacking gel 5 %) και διαχωρισμού (running gel 5 -15 % w/v) παρασκευάζονται συνήθως σε επίπεδη μορφή, πάχους 0,7-2 mm και ποικίλων διαστάσεων σύμφωνα με το πρωτόκολλο Laemmli. Για την παρασκευή τους χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες και ειδικές διαχωριστικές

ταινίες (spacers) σε κατάλληλη διάταξη. Στον Πίνακα 2.1 φαίνεται η σύσταση για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης σε διαφορετικές πυκνότητες.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ (% πυκνότητα)			
		10%	12%
	ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ (3mL)	ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (5mL)	
dH ₂ 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 2.1: Σύσταση για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης

Οι πηκτές επιστοίβασης και διαχωρισμού παρασκευάζονται συμφωνά με τον Πίνακα 2.1, όπου φαίνονται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων εξαρτώνται από τον αριθμό των πηκτών που θα φτιάξουμε και όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από το μοριακό βάρος των υπό διαχωρισμό πρωτεϊνών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πηκτή με συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 10 % (w/v).

Τα αντιδραστήρια APS και TEMED προστίθενται στο τέλος ακριβώς πριν να μεταφερθούν τα διαλύματα εντός των πλακών, ώστε να μην αρχίσει ο πολυμερισμός πολύ νωρίς. Η πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται πρώτη και μεταφέρεται στο χώρο μεταξύ των πλακών γεμίζοντας το 75 % του χώρου. Η πηκτή καλύπτεται με βουτανόλη για προστασία της πηκτής από το οξυγόνο. Η βουτανόλη αφαιρείται όταν ο πολυμερισμός έχει τελειώσει και οι δυο φάσεις έχουν διαχωριστεί. Στη συνέχεια παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβασης και διαβιβάζεται στο χώρο μεταξύ των πλακών σχηματίζοντας μια στοιβάδα πάνω από την πηκτή διαχωρισμού, μέχρι την επιφάνεια. Αμέσως τοποθετείται κατάλληλη πλαστική χτένα για το σχηματισμό καθορισμένου αριθμού φρεατίων. Οι πηκτές παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min περίπου μέχρι να πολυμεριστούν πλήρως.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση τα δείγματα αναμιγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος 5X (Sample loading buffer: 0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 10 % w/v SDS, 0,25 % w/v Brilliant Blue, 0,5 M DTT, 50

% v/v γλυκερόλη) σε αναλογία δείγμα/sample loading buffer ίσο με 4/1. Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται γιατί αυξάνει το ειδικό βάρος του δείγματος ώστε να παραμείνει στο φρεάτιο και η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης χρωματίζει το δείγμα ώστε να διακρίνεται το μέτωπο του δείγματος στην πηκτή. Στη συνέχεια τα δείγματα θερμαίνονται για 10 min στους 95 °C. Πριν την ηλεκτροφόρηση αφαιρείται το χτενάκι και συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης (οι πλάκες με τις πηκτές τοποθετούνται κατακόρυφα). Στη συσκευή τοποθετείται στη συνέχεια ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (SDS Running Buffer: 25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη, 0,1 % w/v SDS pH 8,3) έτσι ώστε να διαβρέχονται οι ελεύθερες επιφάνειες της πηκτής μεταξύ των πλακών και να σχηματιστεί κλειστό κύκλωμα με την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα στα βοθρία, συνδέονται τα ηλεκτρόδια και εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 100 V. Αφού τα δείγματα εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται σε 150 V και τερματίζεται όταν το μέτωπο της χρωστικής διατρέξει όλο το μήκος της πηκτής [45].

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 η πηκτή (gel) τοποθετείται για 20 min υπό ανάδευση σε διάλυμα χρώσης (Staining solution: 0,1 % w/v Brilliant blue R-250, 50 % μεθανόλη, 5 % οξικό οξύ). Στη συνέχεια μεταφέρεται σε διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution: 10 % v/v οξικό οξύ) υπό ανάδευση, μέχρι να απομακρυνθεί η μη ειδικά συνδεδεμένη με την πηκτή χρωστική.

2.9 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών-Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μια χρωματομετρική μέθοδος που βασίζεται στη μεταβολή της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie, όταν η προηγούμενως ερυθρή μορφή του αντιδραστηρίου μετατρέπεται και σταθεροποιείται στην μπλε μορφή με την πρόσδεση της πρωτεΐνης. Κατά το σχηματισμό του συμπλόκου συμβαίνουν τα εξής: η ερυθρή μορφή της χρωστικής δίνει το ελεύθερο ηλεκτρόνιό της στις ιονίζουσες ομάδες της πρωτεΐνης, το οποίο προκαλεί μια διαταραχή στη μητρική κατάσταση της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να εκτίθενται οι υδροφοβικές ομάδες. Οι ομάδες αυτές προσδέονται μη-ομοιοπολικά στη μη-πολική περιοχή της χρωστικής μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals, τοποθετώντας τις αμινικές ομάδες τις πρωτεΐνης κοντά στα αρνητικά φορτία της χρωστικής. Η πρόσδεση ενισχύεται

από ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο μορίων. Η προσδεμένη μορφή της χρωστικής έχει μέγιστο οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm. Η κατιοντική (ελεύθερη) μορφή είναι πράσινη ή κόκκινη, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής σταθεροποιεί τη μπλε ανιοντική μορφή. Η αύξηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm είναι ανάλογη της ποσότητας της προσδεμένης χρωστικής και συνεπώς της ποσότητας (συγκέντρωσης) της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Η διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε είναι η εξής:

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 φωτομετρούνται 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 κονίκλων (rmGPb)

Η απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων 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.

ΥΛΙΚΑ:

- 3 αρσενικοί κόνικλοι ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus*
- Διάλυμα οξικού οξέος CH₃COOH 1N
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα KHCO₃, Διάλυμα 90 % w/v (NH₄)₂SO₄
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO₃ και 10mM EDTA στους 100°C, συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους και αποθήκευση σε 100% 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- HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα tris(hydroxymethyl)aminomethane 2.0 M
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg, 1.0 M pH 7.0
- Γλυκερόλη

ΟΡΓΑΝΑ

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

Πειραματική Διαδικασία:

Ημέρα 1^η

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 κονίκλους 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 ομογενοποιημένος ιστός εκχυλίζεται με απιονισμένο ύδωρ 3 φορές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία. Ο συνολικός χρόνος εκχύλισης δε πρέπει να ξεπεράσει τα 30 λεπτά. Η διαδικασία αυτή του ζυμώματος του ομογενοποιημένου ιστού για 10λεπτά, πραγματοποιείται για να βγει η GPb από τα ζωικά κύτταρα.

Εκχύλιση 1^η (10 λεπτά) 2300 mL

- i) Ομογενοποιημένος ιστός + ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί 8 λεπτά
- ii) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- iii) Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

Εκχύλιση 2^η (10 λεπτά) 2300 mL

- i) Ομογενοποιημένος ιστός από την 1^η εκχύλιση + ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί 8 λεπτά
- ii) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- iii) Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

Εκχύλιση 3^η (10 λεπτά) 1150 mL

- i) Ομογενοποιημένος ιστός από την 2^η εκχύλιση + μίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί
8 λεπτά
- ii) Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- iii) 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 CH₃COOH υπό ελαφρά ανάδευση (το εκχύλισμα δεν χρειάζεται να βρίσκεται σε πάγο κατά τη ρύθμιση του pH). Η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνει κατά τη ρύθμιση του pH εξαιτίας της κατακρήμνισης διάφορων πρωτεϊνών.

6. Το εκχύλισμα αφήνεται σε πάγο για 5 λεπτά και ύστερα 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 g επί 30 λεπτά.

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.

9. Ρύθμιση του pH σε 6.8 για το συνολικό όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος (ισσηλεκτρικό σημείο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου) με τη χρήση του κεκορεσμένου διαλύματος KHCO₃. (ΔΕΙΓΜΑ Α)

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

10. Απαιτούμενος όγκος διαλύματος θειικού αμμωνίου = 0.837 X όγκος εκχυλίσματος.

11. Ρύθμιση του pH του διαλύματος του θειικού αμμωνίου σε 6.8 με την προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνής αμμωνίας (NH₄OH). 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 υπό συνεχή ανάδευση. 4220 mL

13. Το μίγμα αφήνεται στον ψυκτικό θάλαμο για 24 ώρες. *

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^η

Προετοιμασία μεμβρανών διαπίδυσης

1. Ζυγίζουμε 6.5 g Na₂CO₃ και 2.44 g EDTA για την προετοιμασία 650 mL διαλύματος.

2. Οι μεμβράνες διαπίδυσης τοποθετούνται στο παραπάνω διάλυμα και αφήνονται να βράσουν για 30 λεπτά.

3. Στην συνέχεια ξεπλένονται πολύ καλά με απιονισμένο H₂O.

4. Τοποθετούνται σε απιονισμένο H₂O και αφήνονται να βράσουν για 30 λεπτά.

5. Αφού ξεπλυθούν πολύ καλά φυλάσσονται σε καθαρή αλκοόλη στους 4°C.

Μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο έχουν σχηματιστεί 2 φάσεις

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 g επί 40 λεπτά.

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 L με τη χρησιμοποίηση του απιονισμένου ύδατος που έχει ψυχθεί.

5. Οι μεμβράνες 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^η

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 g για 15 λεπτά (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:

Όγκος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης = πρωτεϊνικός όγκος X 3/27

118 mL + 13.1 mL = 131.1 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 X 5/1000 = 131.1 mL X 5/1000 = 0,656 mL ή 656 μL

6. Προσθήκη διαλύματος 2 M Tris ώστε το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος να γίνει 8.8. Η προσθήκη γίνεται αργά και υπό ανάδευση, ενώ το pH μετράται με πεχάμετρο.

7. Επάση του μίγματος στους 37 °C επί 1 ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα

8. Το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 10-15 λεπτά) και το pH ρυθμίζεται σε τιμή 7.0 με τη χρήση διαλύματος CH_3COOH 1 N

9. Διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 34.540 g επί 10 λεπτά (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 $\times 1/100 = 1.3$ mL

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

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

13. Το διάλυμα τοποθετείται σε σωλήνες φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα για να κρυσταλλωθεί

Ημέρα 4^η

1. Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 28.710 g σε θερμοκρασία 0 – 4 °C

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 στους 30 °C εντός του υδατόλουτρου.

4. Ακολουθεί διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28.710 g επί 10 λεπτά (25-30 °C).

5. Το υπερκείμενο ενζυμικό υγρό ογκομετρείται

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

Όγκος AMP 0.1 M, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100= 1.3mL

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

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

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

(1^η ανακρυστάλλωση) (ΔΕΙΓΜΑ Ε)

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

Ημέρα 5^η

1. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης που περιγράφηκε την 4η ημέρα (1^η ανακρυστάλλωση) και έτσι λαμβάνει χώρα η 3^η ανακρυστάλλωση.

2. Επανάληψη της προηγούμενης διαδικασίας (1^η 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 mL ενζυμικού δείγματος 2500 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm. Η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίζεται από τη σχέση:

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

Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης (ϵ) για την rmgPb ισούται με 1.32.

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

4. Το ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης (100%) και φυλάσσεται στους -20°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 pETM-11. 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. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* στελέχους BL21 Gold (DE3) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ. Μετά το πέρας της επώασης 100μL της υγρής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB Agar, στα οποία έχει προστεθεί το αντιβιοτικό καναμικίνη σε τελική συγκέντρωση 20μg/mL, με γυάλινο διανομέα (πιπέτα pasteur). Τα τρυβλία επωάζονται για 14-16 ώρες σε θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 37°C. Το ισοηλεκτρικό σημείο και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης παρουσία των 6 ιστιδινών υπολογίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος ProtParam [46] σε 6.85 και 97.97 kDa, αντίστοιχα. Απουσία της ετικέτας συγγένειας οι ίδιες παράμετροι υπολογίστηκαν σε 6.71 και στα 97.2 kDa, αντιστοίχως (UniProtKB-ID P06737). Όλες η διαδικασίες χειρισμού βακτηριακών κυττάρων έγιναν σε αποστειρωμένες συνθήκες και τα βακτηριακά υπολείμματα επωάστηκαν παρουσία απολυμαντικού πριν απομακρυνθούν από το εργαστήριο. Από το τρυβλίο που επιστρώθηκε με κύτταρα που μετασχηματίστηκαν, έγινε επιλογή αποικιών και εμβολιασμός κάθε αποικίας σε 50mL LB Broth στο οποίο προστέθηκαν 20 μg/mL καναμικίνη, 600 mg/L χλωριούχο μαγγάνιο (MnCl₂) και 100 mg/L πυριδοξίνη. Οι υγρές βακτηριακές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε ανακινούμενο επωαστήριο στους 37°C, 210 rpm για 12-16 ώρες. Στη συνέχεια μέρος της υγρής καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένη φλάσκα με υγρό θρεπτικό μέσο LB-Broth Handmade, όγκου 1 L (αναλογία 1:100). Το θρεπτικό υλικό στο οποίο έγινε η ανακαλλιέργεια περιείχε επίσης 20 μg/mL καναμικίνη, 600 mg/L MnCl₂ και 100 mg/L πυριδοξίνη. Από το παραπάνω θρεπτικό μίγμα, πριν την προσθήκη των κυττάρων, απομακρύναμε 1 mL σε κυψελίδα, ως τυφλό μάρτυρα, για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυττάρων μέσω φωτομετρίας ($\lambda=600$ 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 περίπου τους 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 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 β -GP pH 7, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole και 0.5 mM PMSF. Το PMSF προστέθηκε τελευταίο λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του. Έπειτα, τα διαλυτοποιημένα κύτταρα έμειναν για 10 min σε πάγο παρουσία βενζονάσης (νουκλεάση). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους σε πάγο ως εξής: amplitude 70 %, 30 sec εφαρμογή υπερήχων /30 sec παύση για 5 κύκλους. Τέλος έγινε φυγοκέντρηση για 1h:30min, 4°C, σε 20.000 g. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης φιλτράραμε το υπερκείμενο από αποστειρωμένο φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.45 μ m 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 μ m και απαερωμένα σε υδατόλουτρο υπερήχων.

Πρώτο βήμα: IMAC με ακινητοποιημένα Ni^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης (His-Trap, GE Healthcare): Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM β -GP pH 7, 0.5 M NaCl, 20 mM Imidazole (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 έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με ροή 0.5 mL/min με διάλυμα που περιείχε 20 mM β -GP pH 7, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. 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. Μετά την προσθήκη της πρωτεάσης TEV το πρωτεϊνικό διάλυμα υπέστη διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8, 1mM DTT υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 4°C για 16 ώρες. Η διαπίδυση έγινε για να απομακρυνθεί το αλάτι, ώστε το δείγμα να μπορέσει να προσδεθεί στη δεύτερη στήλη, τη στήλη ιοντοανταλλαγής.

Δεύτερο βήμα: Στήλη ιοντοανταλλαγής Resource Q (GE, HealtCare): Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος. Στο pH 8 η hIGPa έχει αρνητικό φορτίο και ως εκ τούτου 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 έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος που περιείχε 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl, 1 mM DTT (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 mL. Πιο συγκεκριμένα η έκλυση 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 έκλυσης με διαβάθμιση

συγκέντρωσης έγινε εφαρμογή 100 % του διαλύματος B ώστε να απομακρυνθούν οι ισχυρά προσδεσμένες πρωτεΐνες στη στήλη. Τέλος, έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και αυτά που περιείχαν τη hIGP σε υψηλή καθαρότητα συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 30000 Daltons, με φυγοκέντρηση ώστε να γίνει στη συνέχεια φωσφορυλίωση από την γ καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης από μυϊκό ιστό κονίκλων (rmPhK- γ -trunc). 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^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης (His-Trap, GE Healthcare): Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl, 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 8, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole (διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και συγκεντρώθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη. Ακολούθησε προσδιορισμός της συμπυκνωμένης πρωτεΐνης, τη μέθοδο Bradford και έγινε προσθήκη ίσου όγκου γλυκερόλης (50 % τελική συγκέντρωση) και αποθήκευσης της σε θερμοκρασία -20°C .

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 (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 90 λεπτά στο σκοτάδι και έπειτα ο τερματισμός της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη του πρωτεϊνικού μίγματος σε πάγο.

Όγκος φωσφορυλίωσης 120 μ L:

0,2 mg/mL hIGPb

1X HEPES

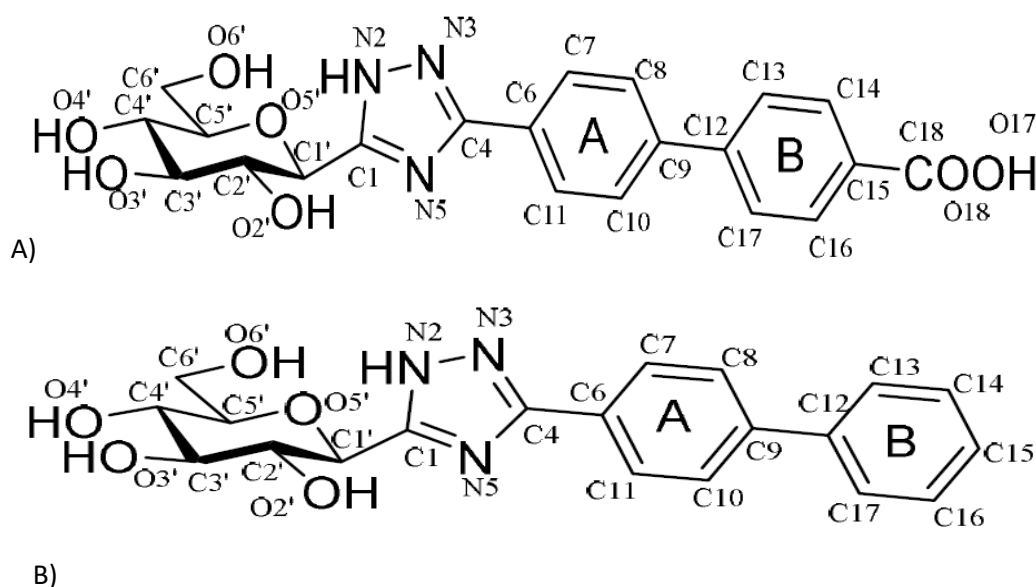
1 mM ATP

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* με τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου μελετήσαμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, προς τη σύνθεση του γλυκογόνου, την ενσωμάτωση, δηλαδή, της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο ώστε να προκύψει γλυκογόνο με ένα περισσότερο κατάλοιπο γλυκόζης με παράλληλη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων από τη G1P. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετρηθούν φωτομετρικά ώστε να ποσοτικοποιηθούν [47].

Οι αναστολείς που μελετήσαμε έχουν σχεδιαστεί ώστε να μιμούνται τις αλληλεπιδράσεις της γλυκόζης με την κλειστή θέση του βρόχου 280s. Οι κινητικές μελέτες έγιναν στην hIGPa, οπότε όπως περιγράφηκε έπρεπε αρχικά να γίνει φωσφορυλίωση της hIGPb, ώστε να μεταβεί από την ανενεργή κατάσταση β στην δραστική α.



Εικόνα 2.3: α) Χημική δομή του αναστολέα KS510, β) Δομή του αναστολέα KS461.

2.13.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου

Η αρχή της μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων βασίζεται στον φωτομετρικό προσδιορισμό φωσφορικών ιόντων, με τη δημιουργία χρωμοφόρου συμπλόκου ένωσης. Έγινε η παρασκευή δύο διαλυμάτων.

- Μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100 mM οξικού ψευδαργύρου. Το *pH* του μίγματος ρυθμίστηκε στο 5.0 με πυκνό HCl και το διάλυμα φυλάσσεται 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 [48].

2.13.2 Ενζυμικό διάλυμα

Το ενζυμικό διάλυμα που παρασκευάσαμε είχε συγκέντρωση 5 μg/mL για την hIGPa σε όγκο 240 μL ώστε στον όγκο της αντίδρασης (180 μL), να είχαμε 1 μg/mL hIGPa. Στο ενζυμικό διάλυμα προσθέσαμε GP, γλυκογόνο και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι αντίστοιχες αναλογίες.

hIGPa	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Glycogen 10%, 24 μL	Glycogen 1%
hIGPa 5 μg/mL	hIGPa 1 μg/mL
TEA buffer	
dH ₂ O	
Ντελ= 240 μL	

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, που χρησιμοποιήθηκε ήταν η α -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 συγκέντρωσης 400 mM στο οποίο ρυθμίσαμε το pH σε 6.8 και το αποθηκεύσαμε σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, αφού πρώτα το διαμοιράσαμε σε κλάσματα των 500 μL . Από τα 400 mM παρασκευάσαμε G1P με συγκέντρωση 90 mM ως εξής:

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

Προσδιορισμός της K_m

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

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 **KS461** έναντι της hIGPa μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M και 4 μ M.
- Για τον αναστολέα **KS510** έναντι της hIGPa μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 1 μ M, 3 μ M, 4 μ M και 6 μ M.

Υποστρώματα hIGPa

- Για την K_m

<i>G1P</i>	40 μ L (4.5mM)	40 μ L (9mM)	40 μ L (13.5mM)	40 μ L (18 mM)	40 μ L (27mM)
<i>dH2O</i> μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L
<i>DMSO</i>	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L
<i>AMP</i>	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L
<i>Ντελ</i>	40 μ L (4.5mM)	40 μ L (9mM)	40 μ L (13.5mM)	40 μ L (18 mM)	40 μ L (27mM)

- Για την K_{map}

<i>G1P</i>	40 μL (4.5mM)	40 μL (9mM)	40 μL (13.5mM)	40 μL (18 mM)	40 μL (27mM)
<i>dH₂O</i>	100.4 μL	100.4 μL	100.4 μL	100.4 μL	100.4 μL
<i>Αναστολέας (σε DMSO)</i>	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL
<i>AMP</i>	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL
<i>Ντελ</i>	40 μL (4.5mM)	40 μL (9mM)	40 μL (13.5mM)	40 μL (18 mM)	40 μL (27mM)

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.

<i>Τυφλό H₂O</i>	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 40 μL dH ₂ O
<i>Τυφλό ενζυμικού διαλύματος</i>	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 32 μL dH ₂ O + 8 μL ενζυμικού διαλύματος
<i>Τυφλό G1P</i>	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 31.1 μL dH ₂ O + 8.9 μL από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση G1P
<i>Τυφλό φωσφορικών</i>	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 30 μL dH ₂ O + 10 μL Pi 1 mM

Επομένως σε 40 μL των τυφλών είχαμε 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hIGPa, 6 mM G1P 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 από 15 min επώασης του μίγματος του διαλύματος φωτομέτρησης, προσθέσαμε σε κάθε δείγμα, 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 dH₂O. Παρ’ ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη είναι ασταθής σε όξινο pH, στο pH 5.0 είναι αρκετά σταθερή. Οπότε, αυτή η φωτομετρική 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 δραστικότητα του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήσαμε. Η ειδική δραστικότητα 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 δραστικότητα 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:

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

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

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

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

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

Έπειτα, υπολογίσαμε την ειδική δραστικότητα 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 3×10^{-3} mg/mL για τη rmGPb και με 1×10^{-3} mg/mL για τη hGPα.

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 xx' οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν. Τέλος, χρησιμοποιώντας γραμμική εξίσωση (linear fit) υπολογίστηκε η K_i στο σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα xx', το σημείο αυτό ισούται με το $-K_i$. Η γραμμική αυτή εξίσωση ήταν του τύπου:

$$y = ax + b$$

όπου, α 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 θα πρέπει στο διάλυμα του ενζύμου να μην υπάρχει AMP. Για τον λόγο αυτό ακολουθείται διαδικασία για την απομάκρυνση του.

Το διάλυμα του ενζύμου υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM BES (pH 6.7) για περίπου 16h. Στη συνέχεια πραγματοποιείται κατεργασία με ενεργό ζωάνθρακα ώστε να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, μετρείται η

οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος 260 και 280 nm. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων (A_{260}/A_{280}) πρέπει να είναι <0.53 .

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Έτσι δίδεται χρόνος στην πρωτεΐνη να οργανωθεί σε κρυστάλλους και όχι σε άμορφο ίζημα. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T state) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο batch [Oikonomakos et al., 1985]. Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων GPb (T state), η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου $P4_32_12$) εντός γυάλινων σωλήνων.

ΥΛΙΚΑ:

Ρυθμιστικό διάλυμα BES, σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθανίου(10mM BES, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT pH 6.7)

Διάλυμα DTT 200mM, pH 6.7

Διάλυμα σπερμίνης 200mM, pH 6.7

Διάλυμα IMP 100mM, pH 6.7

Πυρήνες κρυστάλλωσης

Εναιώρημα rmGPb περιεκτικότητας 20-30 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα BES.

Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3 mm, μήκους 3 cm

ΟΡΓΑΝΑ:

Φασματοφωτόμετρο UV

ΠΟΡΕΙΑ:

Για την ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων (ομάδας συμμετρίας χώρου $P4_32_12$) της rmGP χρησιμοποιείται η στατική μέθοδος (batch method). Το ένζυμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από AMP ($A_{260}/A_{280} = 0.53$). Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε μικρούς σωλήνες μήκους περίπου 3 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3 mm, των οποίων τα δύο άκρα κλείνονται με parafilm.

Οι κρύσταλλοι της φυσικής T διαμόρφωσης της GPb αναπτύσσονται από μίγμα 20-30 mg/mL καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 10 mM BES/HCl (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN₃ στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραιώσης [Oikonomakos *et al.*, 1985]. Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 h στους 16°C, ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αναστολέας πραγματοποιείται 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. Οι κρύσταλλοι αρχικά μεταφέρονται σε διάλυμα BES εντός τριβλίου Petri. Στη συνέχεια, επιλέγονται μεμονωμένοι κρύσταλλοι οι οποίοι δεν φέρουν ορατές προσμίξεις ή άλλες εναποθέσεις μικροκρυστάλλων στην επιφάνειά τους οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή δεδομένων.

Στην περίπτωση συλλογής σε θερμοκρασία δωματίου οι κρύσταλλοι μεταφέρονται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur μέσα σε μικρούς τριχοειδείς σωλήνες και το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο τον περιβάλλει απομακρύνεται με χρήση μικρών λωρίδων απορροφητικού χαρτιού για να αντικατασταθεί από το διάλυμα του αναστολέα που θα μελετηθεί. Το διάλυμα του αναστολέα προστίθεται στον σωλήνα και αφήνεται για ικανό χρονικό διάστημα ώστε να εμποτίσει τον κρύσταλλο (π.χ. 2-3 hrs). Στη συνέχεια το διάλυμα απομακρύνεται από το σωλήνα και στα δύο του άκρα τοποθετείται μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος BES (για την αποφυγή αφυδάτωσης του κρυστάλλου). Τέλος ο τριχοειδής σωλήνας σφραγίζεται και στα δύο του άκρα με τη χρήση μικρής ποσότητας κεριού και τοποθετείται στο γωνιόμετρο για την έκθεση του στη δέσμη ακτίνων Χ.

2.14.2 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του τρόπου πρόσδεσης των υπό μελέτη αναστολέων στην GP. Ο κρύσταλλος της gmGPb (T-στερεοδιαμόρφωση) τοποθετήθηκε σε τριχοειδή σωλήνα και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε γωνιόμετρο που 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-Χ, έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων των ατόμων, που αποτελούν την πρωτεΐνη, με την ακτινοβολία Χ 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 ηλεκτρονιακή πυκνότητα της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου.

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

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 [49, 50] που εμπεριέχεται στη συλλογή προγραμμάτων CCP4 [51]. Έγιναν πολλαπλοί κύκλοι διόρθωσης του μοντέλου με το πρόγραμμα Coot [52, 53] και βελτιστοποίησης με το REFMAC [54, 50]. Μόρια ύδατος προστέθηκαν στο μοντέλο εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπιζονταν στον ηλεκτρονικό χάρτη $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$. 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.

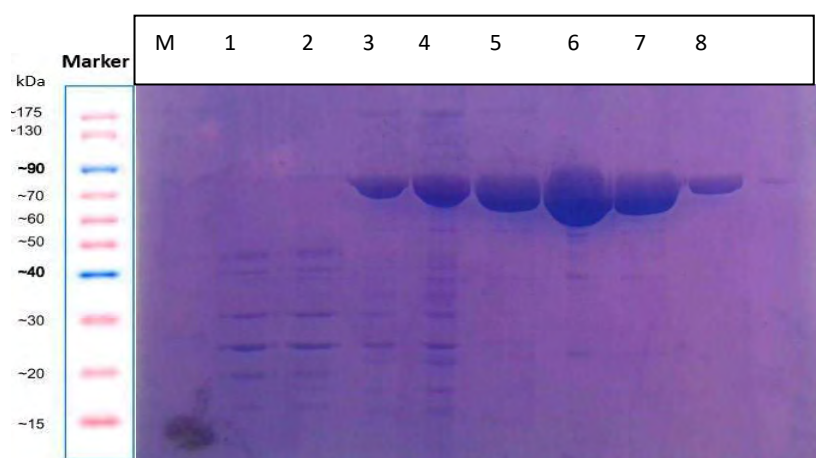
Ο υπολογισμός των διαφορικών χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ και $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$, στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης αποκάλυψαν επιπρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Ακολούθησε διαδοχική βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στους νέους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πακέτο προγραμμάτων CCP4 [51]. Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ και $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$. 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 [55].

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση και καθαρισμός πρωτεϊνών

3.1.1 Καθαρισμός και απομόνωση της gmGPb

Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 12 % υπό αποδιατακτικές συνθήκες, στην οποία αναλύθηκαν ως προς την καθαρότητα και την ποσότητα, δείγματα από τα διάφορα στάδια της μεθόδου.



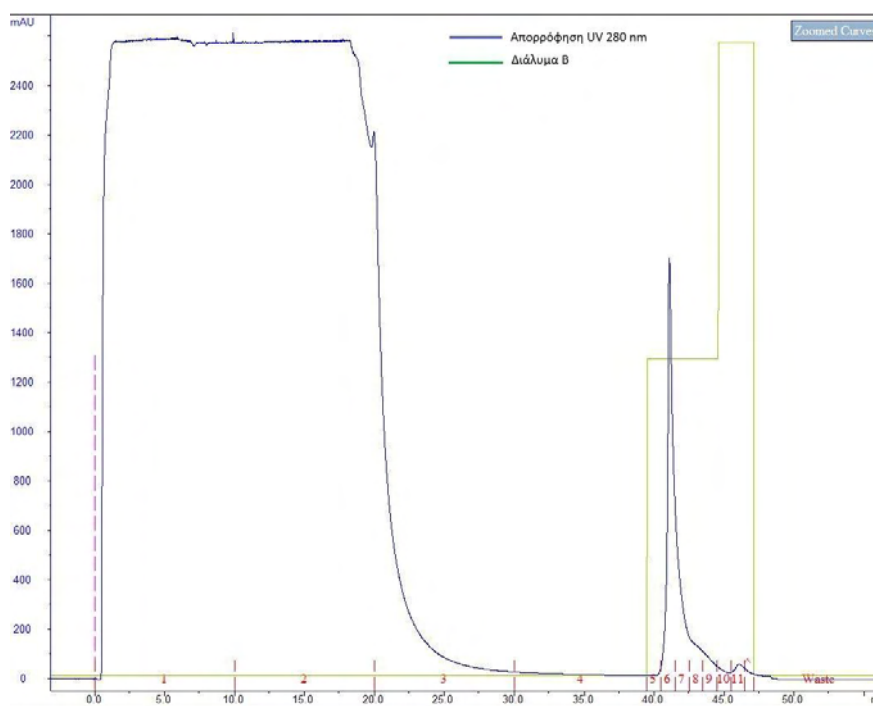
Εικόνα 3.1: 12% SDS-PAGE, από την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (97 kDa). Αρχικά, παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Έπειτα, διαδρομή 1: στο τέλος της διαδικασίας παραλαβής του μυϊκού εκχυλίσματος, αφού διηθηθεί μέσω υαλοβάμβακα, διαδρομή 2: πριν την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο και συγκεκριμένα στην καταβύθιση των πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον πριν την ρύθμιση του pH, διαδρομή 3 (3rd HMEPA) 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 ανακρυστάλλωσεων, 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 2.3 kg σκελετικών μυών κονίκλων.**

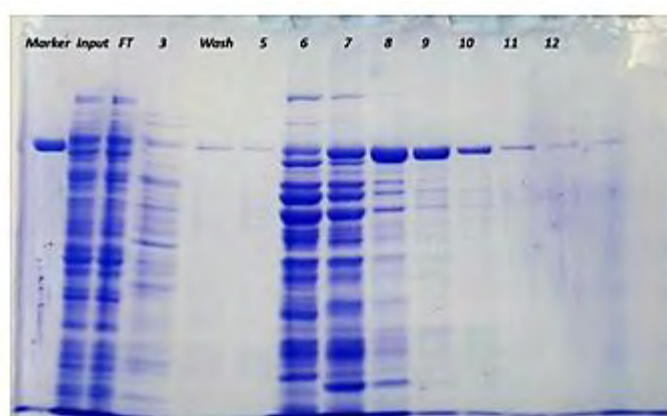
3.1.2. Καθαρισμός και απομόνωση της hIGPb

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 Ni²⁺ τα οποία βρίσκονται ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια σεφαρόζης στη στήλη. Η λύση των κυττάρων και η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με το διάλυμα Α 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, αλλά απέτρεπε, σε ένα βαθμό, την μη ειδική σύνδεση άλλων πρωτεϊνών. Το διάλυμα Β περιείχε 20 mM β-GP, 0.5 M NaCl, 0.5 M Imidazole pH 7.0. Η αυξημένη συγκέντρωση του ιμιδαζολίου απομάκρυνε τις προσδεσμένες πρωτεΐνες από τη στήλη.

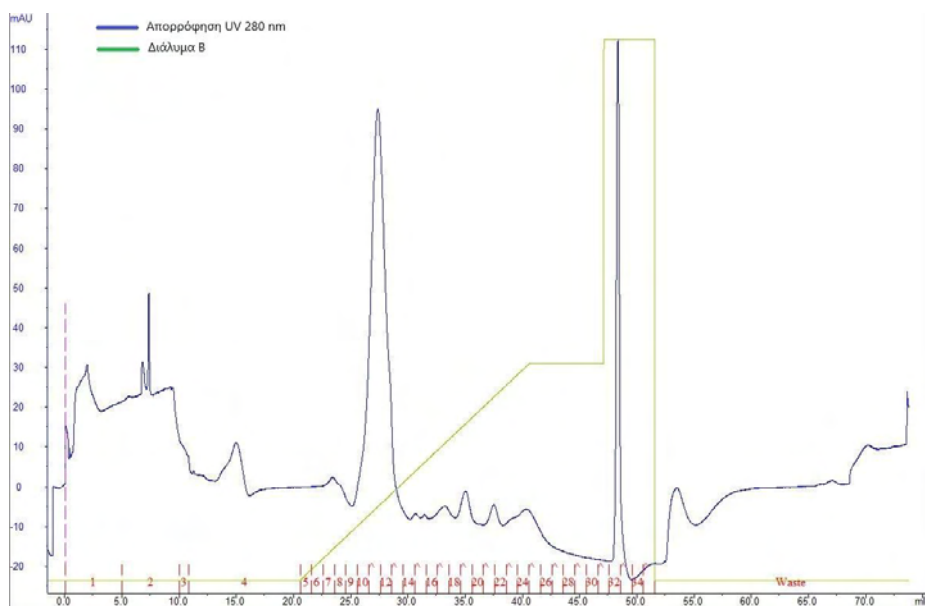


Εικόνα 3.2: Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα από τη στήλη His-Trap (πρώτο βήμα καθαρισμού)

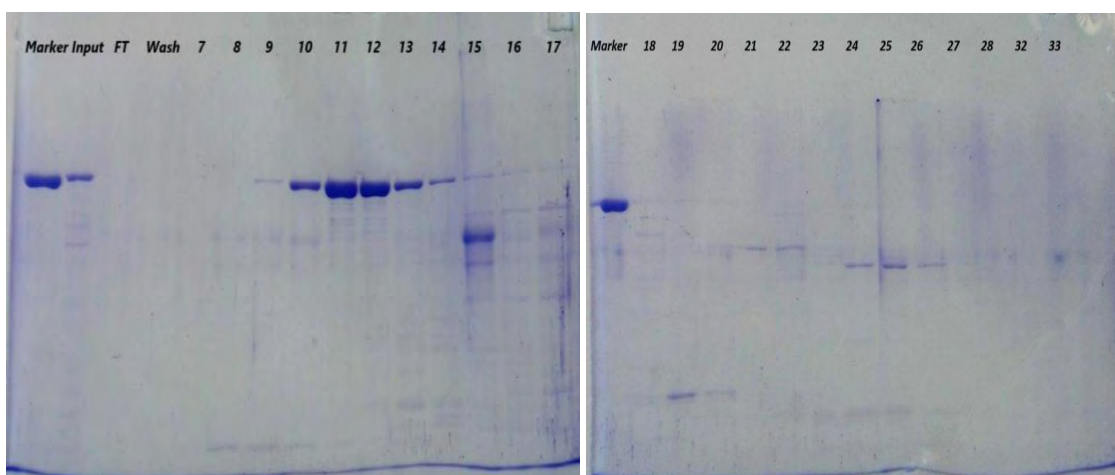


Εικόνα 3.3: Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυση. Διαδρομή 1: χρησιμοποιείται ως μάρτυρας η φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία έχει απομονωθεί από κονίκλους (rmGPb) και έχει μοριακό βάρος 97 kDa, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (input), διαδρομή 3: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη (Flow Through), διαδρομή 4: κλάσμα 3, διαδρομή 5 πλύση της στήλης (Wash), διαδρομές 6-13 έκλουση των συνδεσμένων 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 20 mM pH 8, DTT 1 mM (διάλυμα Α). 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 Β), διότι αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος.

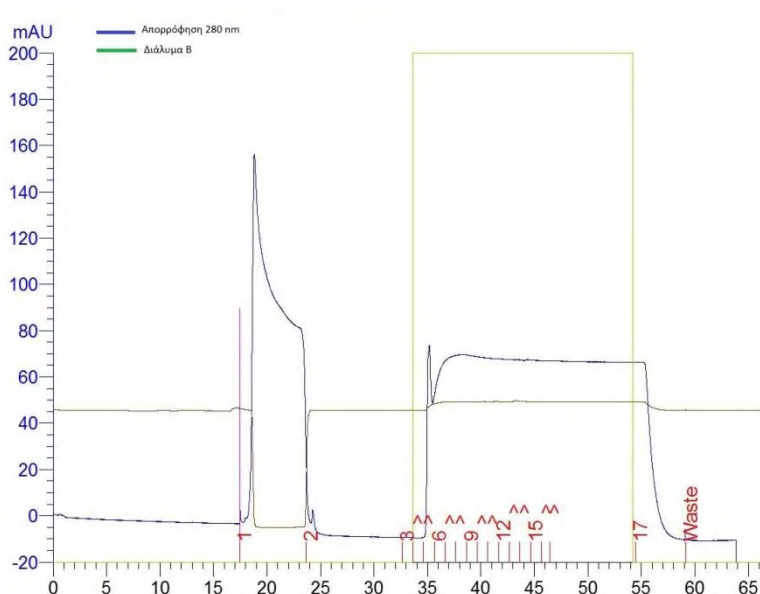


Εικόνα 3.4: Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα από τη στήλη ιοντοανταλλαγής Resource Q (δεύτερο βήμα καθαρισμού)

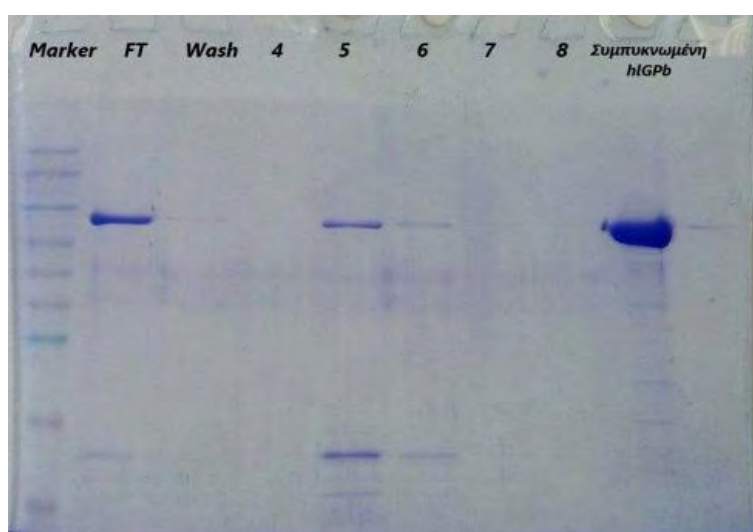


Εικόνα 3.5: Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυση. Διαδρομή 1: χρησιμοποιείται ως μάρτυρας η φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία έχει απομονωθεί από κονίκλους (rmGPb) και έχει μοριακό βάρος 97 kDa, διαδρομή 2: εφαρμογή στη στήλη (input), διαδρομή 3: πλύση της στήλης (Wash), διαδρομές 5-15 (1ο τζελ) και 2-14 (2ο τζελ) έκλυση των προσδεσμένων 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^{2+} 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 εξισορρόπηση 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 έκλυση 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: Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα από τη στήλη His-Trap (τρίτο βήμα καθαρισμού)



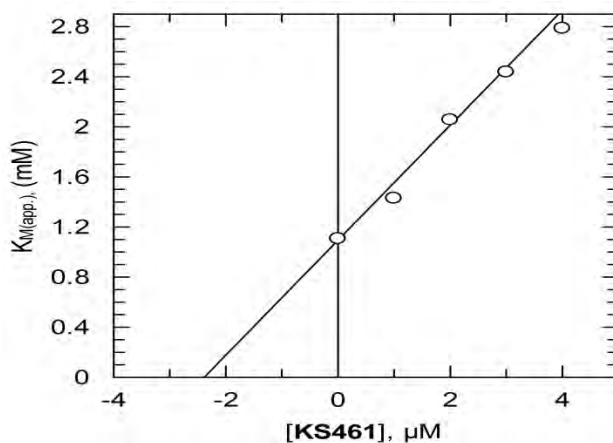
Εικόνα 3.7: Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από 10 % SDS-PAGE ανάλυση. Διαδρομή 1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών, διαδρομή 2: πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη της (Flow Through, κλάσμα 2), διαδρομή 3: πλύση της στήλης (Wash), διαδρομές 4-8 έκλυση των προδεδεμένων πρωτεϊνών. Στη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

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

3.2. Κινητικές μελέτες

3.2.1. Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα KS461 έναντι της hIGPa

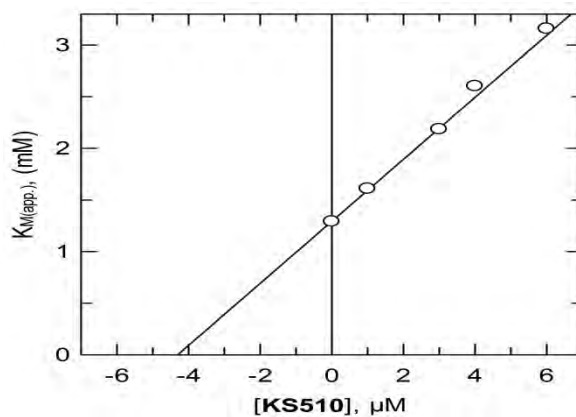
Η K_i για τον αναστολέα **KS461** έναντι της hIGPa υπολογίστηκε σε $2.38 \pm 0.19 \mu\text{M}$ όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.8.



Εικόνα 3.8: Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της K_i για τον αναστολέα **KS461** ως προς την hIGPa.

3.2.2. Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα KS510 έναντι της hIGPa

Η K_i για τον αναστολέα **KS510** έναντι της hIGPa υπολογίστηκε σε $4.42 \pm 0.17 \mu\text{M}$ όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.9.



Εικόνα 3.9: Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της K_i για τον αναστολέα **KS510** ως προς την hIGPa.

3.3. Δομικά αποτελέσματα

Στους παρακάτω πίνακες αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις van der Waals που σχηματίζουν οι αναστολές με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου στον κρύσταλλο της rmGPb. Στις Εικόνες αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζουν οι αναστολές 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).

Πίνακας 3.1: Αλληλεπιδράσεις του **KS461** με τα κατάλοιπα της rmGPb στον πρωτεϊνικό κρύσταλλο

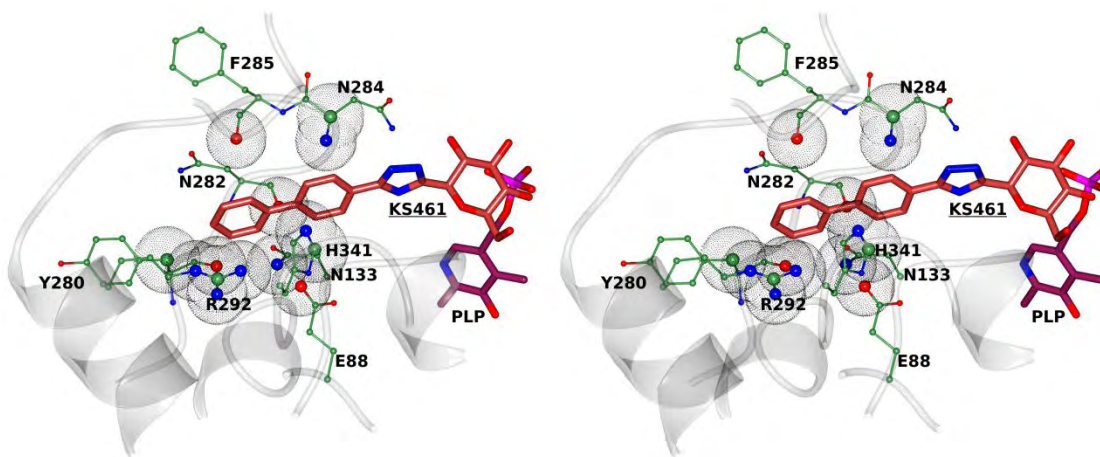
Ατομα αναστολέα	Πρωτεϊνικά κατάλοιπα	
	Δεσμοί υδρογόνου (Å)	Αλληλεπιδράσεις Van der Waals
C1'		His377(O), Water324(O), Water311(O)
C2'		Glu672(OE2), His377(O), Water324(O), Water321(O)
O2'	Glu672(OE2):3.2, Tyr573(OH):3.1, Asn284(ND2):3.0, Water324(O):3.0, Water321(O):2.8	Asn284(CG,OD1)
C3'		Gly675(N), Glu672(OE2), Water133(O)
O3'	Ser674(N):3.1, Gly675(N):3.2, Glu672(OE2):2.7, Ala673(N):3.2	Ala673(C,CA,CB), Ser674(CA,C), Glu672(CG,CD,C), Water321(O)
C4'	Water133(O):2.6	Gly675(N), Water133(O)
O4'	Gly675(N):2.8, Water133(O):2.6	Gly675(C,CA,O), Thr676(N), Asn484(ND2), Ser674(CB,C)
C5'		Gly135(C), Leu136(N), Water133(O)
O5'		His377(ND1,CB), Leu136(CA,CB,N)
C6'		Gly135(O,C), His377(ND1), Asn484(ND2), Leu136(CA)
O6'	Asn484(ND2):2.7, His377(ND1):2.7	Val455(CG2,CG1), Leu139(CD2), His377(CE1,CG), Asn484(CG)
C1		Asn284(ND2), His377(CB,O), Water311(O)
N2	His377(O):2.7	Asn284(ND2,OD1), His377(CB,C), Thr378(CB)
N3		Asn284(ND2,CG,OD1), His377(CB,O), Thr378(CB,CG2)
C4		Asn284(ND2), Water311(O)
N5	Water311(O):2.9	Leu136(CB), Asn284(ND2)
C6		Asn284(N)
C7		Asn284(CA,N), Water326(O)
C8		His341(CE1,NE2), Asn284(N), Water326(O)
C9		Asn282(O), His341(CE1,NE2)
C10		Glu88(OE2), Asn282(O)
C11		Asn284(N), Water311(O)
C12		Asn282(O), Phe285(O)
C13		Arg292(NH2), Phe285(O)
C14		Arg292(NH2,CZ,NE), Phe285(O)

C15		Arg292(NE,CZ,NH1,NH2), Tyr280(CB)
C16		Tyr280(O,CB), Arg292(CZ,NH1)
C17		Glu88(OE2), Asn133(ND2), Asn282(O), Water216(O)
Total	16	105

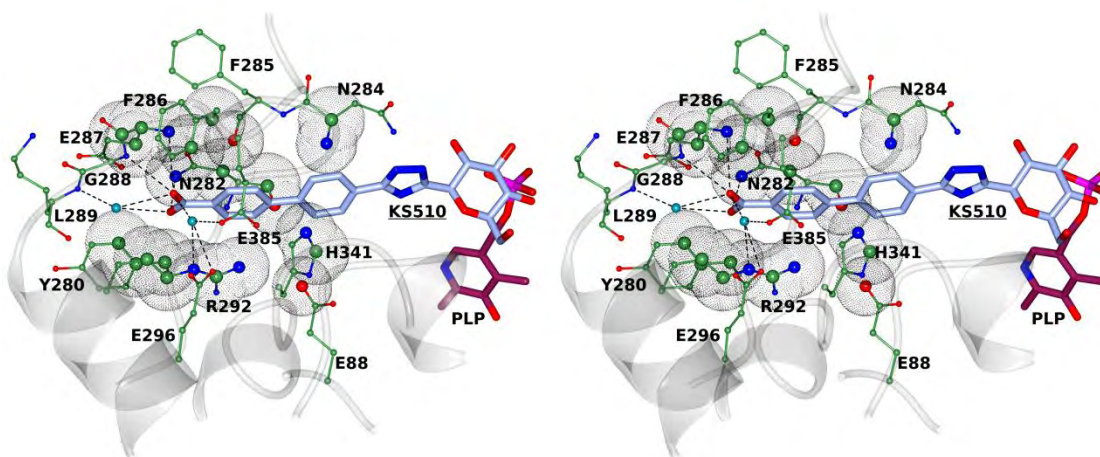
Πίνακας 3.2: Αλληλεπιδράσεις του *KS510* με τα κατάλοιπα της rmGPb στον πρωτεϊνικό κρύσταλλο

Άτομα αναστολέα	Πρωτεϊνικά κατάλοιπα	
	Δεσμοί υδρογόνου (Å)	Αλληλεπιδράσεις Van der Waals
C1'		Water328(O)
C2'		Glu672(OE2), His377(O), Water321(O), Water328(O)
O2'	Asn284(ND2):3.1, Tyr573(OH):3.0, Glu672(OE2):3.0, Water328(O):2.9, Water321(O):2.8	Asn284(CG):
C3'		Glu672(OE2), Gly675(N), Water133(O)
O3'	Ser674(N):3.1, Glu672(OE2):2.6, Gly675(N):3.1, Ala673(N):3.3	Gly675(CA), Ser674(CA,C), Glu672(CG,CD,C), Ala673(CA,CB), Water321(O)
C4'		Gly675(N), Water133(O)
O4'	Gly675(N):2.9, Water133(O):2.6	Gly675(C,O,CA), Thr676(N), Ser674(CB,C), Asn484(ND2)
C5'		Gly135(C), Leu136(N), Water133(O)
O5'		His377(ND1,CB), Leu136(CA,N,CB)
C6'		Gly135(O,C), Leu139(CD2), His377(ND1), Asn484(ND2), Leu136(CA,N)
O6'	Asn484(ND2):2.8, His377(ND1):2.7	Val455(CG2,CB,CG1), Leu139(CD2), His377(CE1,CG), Asn484(CG)
C1		Asn284(ND2), His377(CB,O), Water311(O)
N2	His377(O):2.7	Asn284(ND2,OD1), His377(CA,CB,C), Thr378(CB)
N3		Asn284(ND2,OD1,CG), His377(CB,C,O), Thr378(CB,CG2)
C4		Asn284(ND2,CG), Leu136(CD1), Water311(O)
N5	Water311(O):3.0	Asn284(ND2), Leu136(CB)
C6		Asn284(N)
C7		Asn284(CA,N), Water340(O)
C8		His341(CE1,NE2), Asn284(N), Water340(O)
C9		His341(CE1, NE2)

C10		Glu88(OE2), Asn282(O), His341(CE1)
C11		Asn284(N), Water311(O)
C12		Asn282(O), His341(NE2), Phe285(O)
C13		His341(NE2), Phe285(O)
C14		Arg292(NH2), Phe285(O), Phe286(CA), Water107(O)
C15		Arg292(NE,CZ,NH2), Phe285(O),Water107(O)
C16		Asn282(O,CB), Arg292(CZ,NH2), Phe285(O)
C17		Asn282(C,O,CB), Arg292(NH2), Phe285(O)
C18		Arg292(CD,NE,CG), Glu287(N), Asn282(ND2), Water107(O), Water338(O)
O19	Glu287(N):3.2, Gly288(N):3.1, Water107(O):2.7, Water338(O):3.3	Arg292(NE,CG), Glu287(CB,CA,C), Phe286(CD1),
O20	Asn282(ND2):3.1, Water338(O):2.8	Arg292(CD,CG), Tyr280(CB,CG,CD2), Glu287(CB)
Total	21	131



Εικόνα 3.10: Πρόσδεση του KS461 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.



Εικόνα 3.11: Πρόσδεση του KS510 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.

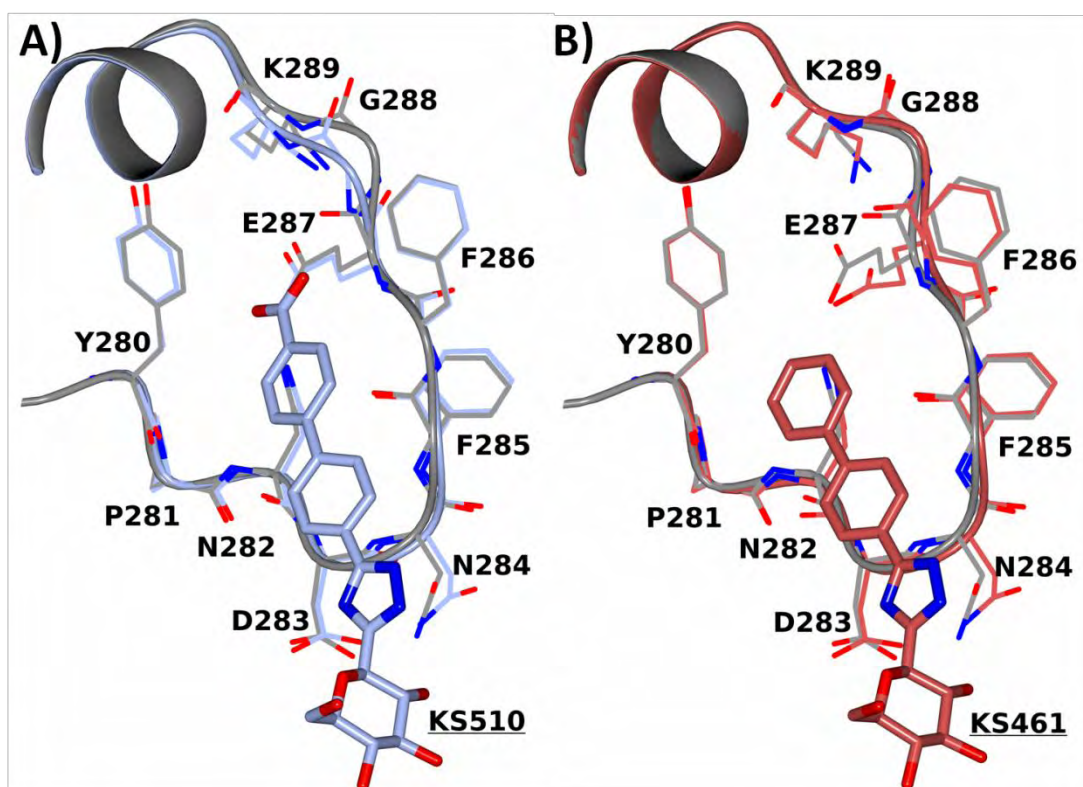
4.Συζήτηση

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας ως προς την επίδραση αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η βιοχημική μελέτη της GP στοχεύει στην κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό νέων αντι-υπεργλυκαιμικών παραγόντων για τη θεραπεία του ΣΔ2. Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της διαμόρφωσης T της gmGPb με την α- και β-D-γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για τη σύνθεση μιας σειράς αναστολέων, αναλόγων της γλυκόζης. Η σταθερά αναστολής της α-D-γλυκόζης και της β-D-γλυκόζης ως προς της GPb είναι 1.7 mM και 7.4 mM αντίστοιχα. Η αποτελεσματικότητα των αναλόγων γλυκόζης οφείλεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ της περιφερειακής υδροξυλομάδας της και των αμινοξικών καταλοίπων στο καταλυτικό κέντρο.

Σε αυτή την εργασία έγιναν συγκριτικές μελέτες για την ανασταλτική δράση δύο αναλόγων β-D-γλυκόζης, του **KS461** και του **KS510** ως προς την ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (hIGPa). Οι τιμές των σταθερών αναστολής που υπολογίστηκαν για τους **KS461** και **KS510** έναντι της hIGPa σε 2.38 και 4.42 μM, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές υποδηλώνουν πως οι δύο αναστολείς δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές ως προς τη συγγένεια με την hIGPa και μπορούν να θεωρηθούν ισοδύναμοι. Για τον προσδιορισμό της αιτίας για την οποία εμφανίζεται αυτή η μικρή διαφορά στις K_i παρά τη διαφορά στη χημική δομή των δύο αναστολέων ακολούθησαν δομικές μελέτες σε σύμπλοκα της gmGPb με τους δύο αναστολείς.

Οι δομικές μελέτες ανέδειξαν πως η καρβοξυλομάδα του **KS510** δημιουργεί ένα δεσμό υδρογόνου με την κύρια αλυσίδα των καταλοίπων Glu287 και Gly288 και την πλευρική αλυσίδα της Asn282, ενώ παράλληλα συμμετέχει σε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων όπου μόρια ύδατος γεφυρώνουν την αλληλεπίδραση της καρβοξυλομάδας με τα κατάλοιπα Lys289, Arg292 και Glu385. Η σύνδεση της γλυκόζης και του τριαζολικού δακτυλίου γίνεται με παρόμοιο τρόπο και στα δύο σύμπλοκα όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες [59]. Ωστόσο ο **KS510** φαίνεται να σχηματίζει περισσότερες αλληλεπιδράσεις van der Waals σε σχέση με τον **KS461** κάτι το οποίο δεν δικαιολογεί τις μικρές αποκλείσεις στις σταθερές αναστολής. Οι μικρές διαφορές στην ανασταλτική ισχύ μεταξύ του αναστολέα που φέρει καρβοξυλική ομάδα (**KS510**) σε σχέση με τον μη υποκατεστημένο (**KS461**) θα μπορούσε να αποδοθεί αν εστιάσουμε στις επιπλέον αλληλεπιδράσεις που δημιουργεί η καρβοξυλική ομάδα. Η παρουσία της καρβοξυλομάδας του αναστολέα προκαλεί επίσης μία σημαντική αλλαγή της διάταξης της καρβοξυλικής ομάδας της κύριας ανθρακικής αλυσίδας της Glu287, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.1 όπου

παρουσιάζεται η υπέρθεση του συμπλόκου **rmGPb-KS510** με την δομή ελεύθερη από αναστολέα (T-διαμόρφωση). Αντιθέτως παρατηρούμε πως στο σύμπλοκο **rmGPb-KS461** δεν εμφανίζεται αυτή η μεταβολή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η πρόσδεση του **KS510** να δημιουργεί διαταραχή στο βρόχο 280s, που έχει ενεργειακό κόστος το οποίο πρέπει να καταβληθεί από το ένζυμο προκειμένου να επιτευχθεί η πρόσδεση του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο.



Εικόνα 4.1: Παρουσιάζεται η υπέρθεση των συμπλόκων **rmGPb**-αναστολέα με την δομή ελεύθερη από αναστολέα (με γκρι απεικονίζεται η αμινοξική αλληλουχία του ενζύμου). Α) απεικονίζεται το σύμπλοκο **rmGPb-KS510**, Β) απεικονίζεται το σύμπλοκο **rmGPb-KS461**

Επιπρόσθετα, η δέσμευση του **KS510** παρασύρει ένα μόριο ύδατος στο καταλυτικό κέντρο τοποθετώντας το σε μικρή απόσταση (~ 3.3 Å) από τον φαινολικό δακτύλιο της Tyr280, κάτι το οποίο δημιουργεί μη επιθυμητές αλληλεπιδράσεις. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις αντισταθμίζονται από τις αλληλεπιδράσεις των δεσμών υδρογόνου των καρβοξυλικών ομάδων (O17 και O18). Στο σύμπλοκο **rmGPb-KS461** δεν εισέρχονται στην καταλυτική περιοχή πρόσθετα μόρια ύδατος αφού δεν έχουν καμία πολική ομάδα. Τα αποτελέσματα αυτά θα συνδράμουν στην περαιτέρω κατανόηση της β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου στην οποία προσδέονται αυτές οι ενώσεις και γενικότερα ανάλογα β-D-γλυκόζης. Έτσι, μέσω της μεθοδολογίας του από τη δομή κατευθυνόμενου σχεδιασμού φαρμάκων μπορούμε να οδηγηθούμε σε πιο βιοδραστικές ενώσεις.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] 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.

[2] William JM, Stephen KB. Clinical Chemistry. 6th ed. Elsevier Limited (2008)

[3] American Diabetes Association (2014). Standards of medical care in diabetes. Diabetes Care. Vol 37 (Suppl. 1): 14–80.

[4] DYANNE P. WESTERBERG, DO Diabetic Ketoacidosis: Evaluation and Treatment. , Cooper Medical School of Rowan University, Camden, New Jersey

[5] American Diabetes Association (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. Vol 33 (Suppl. 1): 62–69.

[6] World Health Organization (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva. (WHO/NCD/NCS/99.2).

[7] Zunino S., (2009). Type 2 diabetes and glycemic response to grapes or grape products. J. Nutr. Vol 139: 1794–1800.

[8] Beckett GJ. Lecture notes. Clinical biochemistry. 7th ed. Malden, Mass., USA: Blackwell Pub.; 2005

[9] Wilcox Gisela (2005). Insulin and Insulin Resistance. Articles from The Clinical Biochemist Reviews. Vol 26(Suppl.2): 19–39.

[10] Steiner D.F., Oyer P.E. (1967). The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol 57 (Suppl. 2): 473–80.

[11] Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006

[12] Orskov C., Holst J.J., Poulsen S.S., Kirkegaard P. (1987). Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man. Diabetologia. Vol 30(Suppl.11): 874–81.

[13] Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 5th (fifth) ed. Hardcover (2008)

- [14] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.
- [15] 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
- [16] 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;17:117-27
- [17] Oikonomakos N.G. (2002). Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* Vol 3: 561–586.
- [18] Oikonomakos N.G., Schnier J.B., Zographos S.E., Skamnaki V.T., Tsitsanou K.E., Johnson L.N. (2000a). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.* Vol 275: 3456634573.
- [19] Oikonomakos N.G., Skamnaki V.T., Tsitsanou K.E., Gavalas N.G., Johnson L.N. (2000b). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure.* Vol 8: 575–84.
- [20] McLaughlin, P.J., Stuart, D.I., Klein, H.W., Oikonomakos, N.G., and Johnson, L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry* 23, 5862-5873.
- [21] 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
- [22] Johnson L.N. (1992). Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *The FASEB Journal.* Vol 6 (Suppl. 6): 2274–2282
- [23] Oikonomakos N.G., Acharya K.R., Johnson L.N. (1992). Post- Translational Modifications of Proteins. Harding J.J. & Crabbe M.J. C. eds. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida. 81–127.
- [24] Johnson L.N., Hajdu J. (1989). Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals. *Biophysics & Synchrotron Radiation.* Hasnain S. edition. 142–155.

- [25] Kosmopoulou, M.N., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Eisenbrand, G., and Oikonomakos, N.G. (2005) Indirubin-3'-aminoxy-acetate inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor and the allosteric site. Broad specificities of the two sites. *Letters in Drug Design & Discovery*, in press.
- [26] Kantsadi A.L., Apostolou A., Theofanous S, Stravodimos G.A., Kyriakis E., Gorgogietas V.A., Chatzileontiadou D.S.M., Pegiou K., Skamnaki V.T., Stagos D., Kouretas D., Psarra A-M.G., Haroutounian S.A., Leonidas D.D., (2014). Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier
- [27] Somsak L., Czifrak K., Toth M., Bokor E., Chrysina E.D., Alexacou K.M., Hayes J.M., Tiraidis C., Lazoura E., Leonidas D.D., Zographos S.E., Oikonomakos N.G. (2008). New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents. *Curr. Med. Chem.* Vol 15: 2933–2983.
- [28] Oikonomakos N.G., Somsak L., Opin C. (2008). *Invest. Drugs*. Vol 9: 379.
- [29] Blundell T.L., Jhoti H., Abell C. (2002). High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature Reviews. Drug Discovery*. Vol 1
- [30] Witters L. A., Avruch J. (1978). Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase. *Biochemistry*. Vol 17: 406–410.
- [31] Rhodes G. *Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models*. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2006.
- [32] Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. *Principles of physical biochemistry*. 2nd ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall; 2006.
- [33] Rhodes G, (1993), *Crystallography made crystal clear*, Academic Press Inc., London.
- [34] Carl B, Tooze J. *Εισαγωγή στη Δομή των Πρωτεϊνών*. 2nd ed. Garland Science (2016)
- [35] Γεωργάτσος Ι.Γ. (2005). *Εισαγωγή στη βιοχημεία*. Έκδοση 6η. Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη

- [36] Κλώνης Ι. Ενζυμολογία: Έμβρυο; 2007.
- [37] Γεωργάτσος Ι.Γ., Γιουψάνης Τ. Α., Δ. Α. Κυριακίδης (2001). Ενζυμολογία. Έκδοση 4η. Εκδόσεις ΖΗΤΗ.
- [38] Lineweaver H. B, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants, . JAmChem 1934.
- [39] Yoshida N, Sato M. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. Appl Microbiol Biotechnol 2009;83:791-8.
- [40] Ettre LS, Sakodynskii KI. Tswett,M.S. And the Discovery of Chromatography .1. Early Work (1899-1903). Chromatographia 1993;35:223-31.
- [41] HealthCare G. Affinity Chromatography - Principles and Methods: GE HealthCare; 2007
- [42] HealthCare G. Ion Exchange Chromatography. Principles and Methods: GE HealthCare; 2010.
- [43] John M. Clark, Jr and Robert L. Switzer. Πειραματική Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- [44] Waugh DS. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. Protein Expr Purif 2011
- [45] 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).
- [46] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res 2003;31:3784-8.
- [47] 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
- [48] 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
- [49] Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998

- [50] Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997;53:240-55.
- [51] COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50:760-3.
- [52] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:2126-32.
- [53] Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:486-501.
- [54] 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
- [55] 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
- [56] Bollen M, Keppens S, Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 1998
- [57] Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinowetz A.M., McPherson R.K., Olson T.V., Treadway J.L. and Hoover D.J. (2000). Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at new allosteric site. *Chemistry and Biology*. Vol 7 (Suppl. 9): 677–682.
- [58] Sprang SR, Withers SG, Goldsmith EJ, Fletterick RJ, Madsen NB. Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase b by adenosine monophosphate. *Science* 1991;254:1367-71.
- [59] Tsitsanou KE, Skamnaki VT, Oikonomakos NG. Structural basis of the synergistic inhibition of glycogen phosphorylase a by caffeine and a potential antidiabetic drug. *Arch Biochem Biophys* 2000;384:245-54.