ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου για την ανάπτυξη δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων

ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2015

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου για την ανάπτυξη δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων

ΣΩΤΗΡΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

Α.Μ.: 61202

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:
Δρ Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδαη, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδαη, Καθηγήτρια .....
2. Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής .....
3. Αθανάσιος Γκιμήσης, Αναπληρωτής Καθηγητής .....

Ημερομηνία εξέτασης: 10/ 7/ 2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μέθοδος του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού δυνάμει φαρμάκων εφαρμόσθηκε στο ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (RMGP*b*), ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμού του γλυκογόνου και θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2. Προηγούμενες κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες σε παράγωγα *α*- και *β*-D γλυκόζης έδειξαν ότι ιδιαίτερα τα *β*-D- παράγωγα αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της RMGP*b*. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες γλυκοπυρανοζιτικών παραγώγων 5-αλογονο-1,2,3-τριαζολίων και αμιδίων καθώς και δομικές μελέτες γλυκοπυρανοζυλιδενο-σπειροισοξαζολινων ως σύμπλοκων με το ένζυμο με χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. Επίσης, μελετήθηκαν παράγωγα *β*-D ξυλοπυρανόζης, για τον προσδιορισμό των δομικών χαρακτηριστικών που συνεισφέρουν στην υψηλή συγγένεια σύνδεσης που επιδεικνύει μια ένωση κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου πέραν της εξειδίκευσης που προσδίδει ο δακτύλιος της γλυκόζης. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιηθήκαν κρύσταλλοι της φυσικής πρωτεΐνης οι οποίοι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα αναστολέα γνωστής συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για τα μεν παράγωγα των 1,2,3-τριαζολών η προσθήκη 5-αλκυνυλο και 5 φαινυλο τμημάτων στην περιοχή του *α*-υποκέντρου, δυσχεραίνουν την πρόσδεσή στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Στα δε αμίδια η εισαγωγή ενός δακτυλίου πυριδίνης καθώς και ενός ατόμου βρωμίου δεν αναστέλουν ισχυρά το ένζυμο. Τα αποτελέσματα, ωστόσο, ήταν ενθαρρυντικά για τα παράγωγα ξυλόζης, τα οποία για πρώτη φορά βρέθηκε ότι συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο ανοίγοντας νέους δρόμους για το ρόλο του σακχάρου ή των αρωματικών υποκαταστατών που φέρει αυτό στη σύνδεση ενός προσδέτη στο εν λόγω κέντρο.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Επιστήμες ζωής

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, μεταβολισμός του γλυκογόνου, φωσφορυλάση του γλυκογόνου, κατευθυνόμενος από τη δομή-σχεδιασμός φαρμάκων, αναστολείς-παράγωγα ξυλόζης, κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, συγχροτρονική ακτινοβολία

ABSTRACT

The structure-based drug design approach has been applied on glycogen phosphorylase (RMGP*b*) a key enzyme in glycogen metabolism that is exploited as a therapeutic target for the treatment of type 2 diabtes. Previous biochemical and structural studies of *α*- and *β*-D glucose derivatives showed that the *β*-D- derivatives are the most potent inhibitors of RMGP*b*. In the frame of the present study, kinetic studies of glucopyranose based 5-halogen-1,2,3-triazoles and amides were perfomed along with structural studies of glucopyranosyl-spiroisoxazolines in complex with RMGP*b* using X-ray protein crystallography. In addition, *β*-D-xylopyranose derivatives were examined with the aim to identify the structural determinants that contribute to the ligand binding affinity for the catalytic site of the enzyme, beyond the specificity induced by the glucose moiety. To this end, native crystals of RMGP*b* were soaked in various ligand solutions of known concentration. The results showed that introduction of of 5-alkinyl and 5-phenyl groups at 1,2,3-triazoles pointing towards the α-subsite were not favourable for ligand binding at the active site of the enzyme. Similarly in the case of the amides tested, in which a pyrimidine group either alone or substituted by a bromine atom was introduced, did not result in very potent inhibitors of enzyme activities. The results though were exciting for the *β*-D-xylose derivatives, which for the first time, showed that they bind at the catalytic site of RMGP*b*. This provides new insights for the role of sugar as the leading or driving component for ligand binding as compared to the aromatic substituents like naphthoyl groups.

SUBJECT AREA: Life Sciences

KEYWORDS: Type 2 diabetes, glycogen metabolism, glycogen phosphorylase, structure-based drug design, xylose derivatives, X-ray protein crystallography, Synchrotron Radiation

Αφιερωμένο

Στους Γονείς μου,

Στον Αδελφό μου,

Στην Γιαγιά μου,

Στον Μάκη,

Στα Αστεράκια μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω,

Τους γονείς μου, τον αδελφό μου και τη γιαγιά μου που πάντα ήταν μαζί μου, με στήριζαν σε όλες μου τις επιλογές και έκαναν ό,τι μπορούσαν για να είμαι χαρούμενη και ευτυχισμένη και να κυνηγήσω το όνειρό μου.

Την Δρ. Ευαγγελία Χρυσίνα που εκτός από την αμέτρητη βοήθειά της, τις γνώσεις και τις τεχνικές που μου μετέφερε, στάθηκε δίπλα μου ως φίλη και πραγματικά πίστεψε σε μένα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ μέσα από τα βαθη της καρδιάς μου για όλα.

Την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδαη που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω το μεταπτυχιακό στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών με συμβούλεψε και στήριξε την ερευνητική μου εργασία. Επίσης, τις καθηγήτριες κα Ντια Γαλανοπούλου και κα Μαίρη Μαυρή για τη βοήθεια, τη στήριξή τους και την κατανόησή τους σε όλο το διάστημα της διδασκαλίας των μαθημάτων.

Τους υπεύθυνους στο Diamond Light Source, Oxford, UK για τη βοήθεια που μας προσέφεραν κατά τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων καθώς και το πρόγραμμα BioStruct-X, για τη χρηματοδότηση της επίσκεψής μου εκεί.

Όλα τα παιδιά από το εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για το μοναδικό κλίμα που δημιουργήσαμε, τα γέλια αλλά και τα νεύρα, τον Γιώργο Οικονομάκο, τον τεχνικό έρευνας του εργαστηρίου μας που είχε πάντα λύση για όλα, τον υποψήφιο διδάκτορα Μιχάλη Μαμάη για την αμέριστη βοήθειά του στα πρώτα βήματά μου στο εργαστήριο αλλά κυρίως την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Καραμολέγκου που με το γέλιο και την αισιοδοξία της με έκανε να βλέπω τα πράγματα με άλλη ματιά.

Τον Μάκη, που με στήριξε όλο αυτό το χρονικό διάστημα και που υπάρχει στη ζωή μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....

1.1 Σακχαρώδης διαβήτης 23

1.2 Τύποι διαβήτη 28

1.3 Σακχαρώδης διαβήτης και οξειδωτικό στρες.....31

1.4 Γλυκόλυση και γλυκονεογέννεση 33

1.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου 36

1.6 Τα κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου 40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....

Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων

2.1 Εισαγωγή 47

2.2 Κρυστάλλωση του μακρομοριακού στόχου 48

2.3 Βασικές Αρχές κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ .....

2.3.1 Συμμετρία χώρου, κρυσταλλικές τάξεις και κρυσταλλικά συστήματα 55

2.3.2 Παράμετροι ατομικών θέσεων 58

2.3.3 Περίθλαση ακτίνων Χ.....58

2.3.4 Πηγές ακτίνων Χ 60

2.3.5 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής μακρομορίων.....63

2.3.6 Μελέτη ενώσεων ως συμπλόκων με τον πρωτεϊνικό στόχο .66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....

Πειραματικό μέρος

3.1 Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* από σκελετικούς μύες κουνελιού 70

3.2 Συνθετική Πορεία 73

a) 1-γλυκοζυλο-5-αλογονο 1,2,3 τριαζόλια.....73

b) *N*-*β*-D-γλυκοπυρανοζυλο αμίδια 76

c) N-ακυλο-N'-*β*-D-ξυλοπυρανοζυλο ουρίες 76

d) D-γλυκοπυρανοζυλιδενο-σπειροισοξαζολινες.....77

3.3 Κινητικά Πειράματα 78

3.4 Κρυστάλλωση της RMGP*b* στην Τ διαμόρφωση 81

3.5 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων 86

3.6 Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων 87
3.7 Προσδιορισμός και ανάλυση της τρισδιάστατης δομής της RMGP*b* με τους αναστολείς 88

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....

Αποτελέσματα

4.1 Μελέτη της ενζυμικής κινητικής της RMGP*b* παρουσία παραγώγων γλυκόζης 91
4.2 Δοκιμές βελτίωσης των συνθηκών κρυστάλλωσης της RMGPb 97
4.3 Δομικές μελέτες για τις D-γλυκοπυρανοζυλιδενο-σπειρο-ισοξαζολινες 101
4.4 Δομικές μελέτες για τις 1-γλυκοζυλο 5-αλογονο-1,2,3- τριαζόλια 105
4.5 Δομικές μελέτες για τις N-ακυλο-*N'*-*β*-D-ξυλοπυρανοζυλο ουρίες 109

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 121

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ 127

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 129

7. ΑΝΑΦΟΡΕΣ 159

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.: Ο αριθμός των ασθενών που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη όπως καταγράφηκε από την International Diabetes Federation (IDF) το 2014.....24
Σχήμα 2.: Ο κεντρικός ρόλος του παγκρέατος στη ρύθμιση της γλυκόζης.....25
Σχήμα 3.: Αυξημένη γλυκόζη και ελεύθερα λιπαρά οξέα.....32
Σχήμα 4.: Αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....34
Σχήμα 5.: Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....37
Σχήμα 6.: Ο μηχανισμός δράσης της PLP.....38
Σχήμα 7.:Σχηματική απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....39
Σχήμα 8.:Η πρόσδεση της σπειροϋδαντοίνης της γλυκοπυρανόζης στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.....41
Σχήμα 9.:Η ένωση φλαβοπιριδόλη κατά την πρόσδεσή της στο κέντρο αναστολής της RMGP*b*. 41
Σχήμα 10.: Ο ολιγοσακχαρίτης μαλτοπενταόζη κατά τη σύνδεσή του στο κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου στην RMGP*b* από *E.Coli* 42
Σχήμα 11.: Η ένωση W1807 κατά τη σύνδεσή της στο αλλοστερικό κέντρο της RMGP*b*.....43
Σχήμα 12.: Η ένωση CP320626 κατά τη σύνδεσή της στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP*b*.....44
Σχήμα 13.: Η γλυκοπυρανοζυλο-βενζιμιδαζόλιο κατά τη σύνδεσή της σε ένα νέο κέντρο της RMGP*b*, το οποίο ονομάστηκε κέντρο σύνδεσης του βενζιμιδαζολίου.....45
Σχήμα 14.: Τα επιμέρους στάδια του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων.....48
Σχήμα 15.: Ο κρύσταλλος σχηματίζεται με επανάληψη της μοναδιαίας κυψελίδας.....49
Σχήμα 16.: Το διάγραμμα φάσεων το οποίο υποδεικνύει την αλλαγή της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ως προς τη συγκέντρωση του παράγοντα καθίζησης.....50
Σχήμα 17.: Διάταξη κρυστάλλωσης με χρήση της μεθόδου α. κρεμάμενης σταγόνας και β.καθήμενης σταγόνας.....53

Σχήμα 18.: Το σύνολο των Bravais Lattices για όλα τα κρυσταλλικά συστήματα 56
Σχήμα 19.: Απεικόνιση των επιπέδων (100), (110) και (111) στο κυβικό κρυσταλλικό σύστημα 58
Σχήμα 20.: Ο τρόπος περίθλασης των ακτίνων X σε δυο διαδοχικά κρυσταλλικά επίπεδα, σύμφωνα με το νόμο του Bragg 59
Σχήμα 21.: Σύνθεση των 4-υποκατεστημένων N-γλυκοπυρανοζυλο-5-αλογονο-1,2,3 τριαζολίων 74
Σχήμα 22.: Pb- καταλυόμενη αντίδραση Sonogashira με 5-ιωδο-1,2,3-τριαζολες 74
Σχήμα 23.: Pb- καταλυόμενη αντίδραση Suzuki με 5-αλογονο-1,2,3-τριαζόλες 75
Σχήμα 24.: Σχηματική απεικόνιση της κλασικής μεθόδου κρυσταλλώσεων ...83
Σχήμα 25.: Σχηματική απεικόνιση της μικροπλάκας 1 και των συνθηκών που διερευνήθηκαν 84
Σχήμα 26.: Σχηματική απεικόνιση της μικροπλάκας 2 και των συνθηκών που διερευνήθηκαν 85
Σχήμα 27.: Γλυκοπυρανοζιτικό παράγωγο ,πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση των παραγώγων των 1,2,3- τριαζολών 92
Σχήμα 28.: Σχηματική αναπαράσταση του $2F_o$-F_c χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης DCG169 (A), DCGi46 (B) και DCGi42 (Γ) στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* 103
Σχήμα 29 .: Διδιάστατη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων των ενώσεων DCG169 (A), DCGi46 (B) και DCGi42 (Γ) της RMGP*b* με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. 104
Σχήμα 30.: Σχηματική αναπαράσταση του $2F_o$-F_c χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης DCGk56 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* 106
Σχήμα 31.: Διδιάστατη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης DCGk56 της RMGP*b* με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου. 107
Σχήμα 32: Η πρόσθετη πυκνότητα που υπάρχει στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου 107

Σχήμα 33.: Σχηματική αναπαράσταση του $2F_o$-F_c χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης DCGj102 στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP*b* 108
Σχήμα 34.: Η ένωση DCGj102 που έχει προσδεθεί στο νέο αλλοστερικό κέντρο και η ένωση που φαίνεται να έχει προσδεθεί στο καταλυτικό κέντρο 108
Σχήμα 35.: Σχηματική αναπαράσταση του $2F_o$-F_c χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης DCGi104 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* 109
Σχήμα 36.: Σχηματική αναπαράσταση του $2F_o$-F_c χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης KB263 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* 111
Σχήμα 37.: Διδιάστατη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης KB263 με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b* 112
Σχήμα 38.: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης της KB263 στο καταλυτικό κέντρο τα ενζύμου 113
Σχήμα 39.: Υπέρθεση της ένωσης KB263 με το αντίστοιχο γλυκοπυρανοζιτικό ανάλογο κατά τη σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* 114
Σχήμα 40.: Υπέρθεση του ένωσης KB263 με το αντίστοιχο γλυκοπυρανοζιτικό ανάλογο κατά τη σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* 114
Σχήμα 41.: Σχηματική αναπαράσταση του $2F_o$-F_c χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης KB263 στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP*b* 115
Σχήμα 42.: Σχηματική αναπαράσταση του $2F_o$-F_c χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης KB283 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* 116
Σχήμα 43.: Διδιάστατη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης KB283 με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b* 116
Σχήμα 44.: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης της KB283 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου 117

Σχήμα 45.: Διδιάστατη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης KB283 με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b* 118
Σχήμα 46: Σχηματική αναπαράσταση του $2F_o$-F_c χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης KB264 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* 118
Σχήμα 47.: Διδιάστατη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης KB264 με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b* 119
Σχήμα 48.: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης της KB264 στο καταλυτικό κέντρο τα ενζύμου.....120
Σχήμα 49: Υπέρθεση της ένωσης KB283 με το αντίστοιχο γλυκοπυρανοζιτικό ανάλογο κατά τη σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* 120

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.: Η δομή της ανθρώπινης ινσουλί 26
Εικόνα 2.: Δομή γλυκαγόνης 27
Εικόνα 3.: Κρύσταλλοι που έχουν αναπτυχθεί με τη μέθοδο μικροσποράς 52
Εικόνα 4.: Ρομποτική διάταξη που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του ΕΙΕ για τις αυτοματοποιημένες κρυσταλλώσεις καθώς και για τη μέθοδο μικροσποράς.....54
Εικόνα 5. : Λογισμικό εγκατεστημένο στην ρομποτική διάταξη της Εικ. 4 για τις αυτοματοποιημένες κρυσταλλώσεις.....54
Εικόνα 6.: Το διάγραμμα απεικονίζει το πλήθος των πρωτεϊνικών δομών που κατατίθενται στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων 60
Εικόνα 7.: Περιθλασίγραμμα όπου φαίνονται οι δακτύλιοι πάγου.....100

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ

Φωτογραφία 1.: Η μικροπλάκα των 24 και 96 βοθρίων 53

Φωτογραφία 2.: Γεννήτρια ακτίνων Χ στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας (ΙΒΦΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών 61
Φωτογραφία 3: Τμήμα του κεντρικού δακτυλίου αποθήκευσης ήδη επιταχυμένων ηλεκτρονίων στην Ευρωπαϊκή εγκατάσταση συγχροτρονικής ακτινοβολίας, Diamond Light Source (DLS)-Οξφόρδη, Αγγλία 62
Φωτογραφία 4: Περιθλασίγραμμα ακτίνων Χ της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου 64
Φωτογραφία 5.: Κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που αναπτύχθηκαν με τη batch μέθοδο, α. με την προσθήκη IMP, β. χωρίς την προσθήκη IMP 97
Φωτογραφία 6: Κρύσταλλοι φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που αναπτύχθηκαν με το oryxnano με microseeding στο JBScreen JCSG++HTS kit 99

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.: Τα 7 κρυσταλλικά συστήματα και τα χαρακτηριστικά τους 55
Πίνακας 2.: Ο πίνακας με τις 32 ομάδες χώρου συμμετρίας 55
Πίνακας 3.: Τα παράγωγα των 1,2,3-τριαζολών που μελετήθηκαν είτε κινητικά είτε κρυσταλλογραφικά 75
Πίνακας 4: Τα παράγωγα των N-β-D γλυκοπυρανοζυλο-παραγώγων που μελετήθηκαν κινητικά 76
Πίνακας 5.: Οι πρόδρομες ενώσεις (ανάλογα γλυκόζης) και τα ανάλογα ξυλόζης που μελετήθηκαν 77
Πίνακας 6.: Οι D-γλυκοπυρανοζυλιδενο-σπειροισοξαζολινες που μελετήθηκαν 78
Πίνακας 7.: Τα ανάλογα των 1,2,3-τριαζολών που μελετήθηκαν κινητικά και οι τιμές IC_{50} αυτών 94
Πίνακας 8.: Τα ανάλογα των N-(*β*-D-γλυκοπυρανόζυλο) αμιδίων που μελετήθηκαν κινητικά και οι τιμές IC_{50} αυτών 96

Πίνακας 9.: Τα ανάλογα γλυκόζης των σπειροισοξαζολών που μελετήθηκαν κρυσταλλογραφικά 102
Πίνακας 10.: Τα ανάλογα γλυκόζης των 5,5'-δισ-1,2,3- τριαζολίων που μελετήθηκαν κρυσταλλογραφικά 105
Πίνακας 11.: Τα ανάλογα ξυλόζης που μελετήθηκαν κρυσταλλογραφικά ως αναστολείς της RMGP*b* και οι τιμές K_i αυτών.....110
Πίνακας 12.: Συνολικός πίνακας των 1-γλυκοπυρανοζυλο-1,2,3-τριαζολίων που μελετήθηκαν κινητικά ή/και κρυσταλλογραφικά 123
Πίνακας 13.: Συνολικός πίνακας των *N*-*β*-D-γλυκοπυρανόζυλο αμιδίων που μελετήθηκαν κινητικά.....125
Πίνακας 14.: Συνολικός πίνακας των γλυκοπυρανοζυλιδενο σπειροισοξαζολινων που μελετήθηκαν κινητικά.....125
Πίνακας 15.: Συνολικός πίνακας των N-ακυλο-N΄-β-D-ξυλοπυρανοζυλο ουρίων που μελετήθηκαν κρυσταλλογραφικά.....126

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ

Πίνακας Π1 : Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCG169 129

Πίνακας Π2. : Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCGi46 131

Πίνακας Π3. : Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCGi42 133

Πίνακας Π4. : Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCGk56 135

Πίνακας Π5.: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCGj102 137

Πίνακας Π6.: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCGi104 139

Πίνακας Π7.: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:KB263 140

Πίνακας Π8.: Δεσμοί Υδρογόνου μεταξύ της ένωσης KB263 και των αμινοξέων και των μόριων νερού στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* 142

Πίνακας Π9.: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση KB263 μέσω μορίων νερού με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b* 143

Πίνακας Π10.: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ της ένωσης KB263 και των αμινοξέων και των νερών του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b* 144

Πίνακας Π11.: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης KB263 και των αμινοξέων και των μορίων νερού στο νέο αλλοστερικοό κέντρο της RMGP*b* 145

Πίνακας Π12.: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση KB263 μέσω μορίων νερού με αμινοξέα του νέου αλλοστερικού κέντρου της RMGP*b* 145

Πίνακας Π13.: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ της ένωσης KB263 και των αμινοξέων και των νερών του νέου αλλοστερικού κέντρου της RMGP*b* 146

Πίνακας Π14.: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:KB283 147

Πίνακας Π15.: Δεσμοί Υδρογόνου μεταξύ της ένωσης KB283 και των αμινοξέων και των μόριων νερού στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* 149

Πίνακας Π16.: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση KB283 μέσω μορίων νερού με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b* 150

Πίνακας Π17.: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ της ένωσης KB283 και των αμινοξέων και των νερών του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b* 151
Πίνακας Π18.: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:KB264 153
Πίνακας Π19.: Δεσμοί Υδρογόνου μεταξύ της ένωσης KB264 και των αμινοξέων και των μόριων νερού στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb 155
Πίνακας Π20.: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση KB264 μέσω μορίων νερού με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGPb 156
Πίνακας Π21.: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ της ένωσης KB264 και των αμινοξέων και των νερών του καταλυτικού κέντρου της RMGPb 157

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της συνεργασίας της καθ. Α. Σιαφάκα-Καπάδαη, Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, με την Δρ Ε.Δ. Χρυσίνα του Εργαστηρίου Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών εκπαιδεύτηκα στις βασικές αρχές της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ και σε τεχνικές που αφορούν στον κατευθυνόμενο-από τη δομή-σχεδιασμό αναστολέων του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου, οι οποίες περιλαμβάνουν, συλλογή δεδομένων περίθλασης με χρήση συμβατικών πηγών αλλά και πηγών συγχροτρονικής ακτινοβολίας, επεξεργασία και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων ακτίνων Χ, μεθόδους κρυστάλλωσης πρωτεϊνών, κρυσταλλώσεις με χρήση αυτοματοποιημένων μεθόδων, ενζυμική κινητική και απομόνωση, καθαρισμός και κρυστάλλωση πρωτεϊνών από φυσικές πηγές. Τέλος, μου δόθηκε η δυνατότητα να επισκεφθώ την Ευρωπαϊκή εγκατάσταση συγχροτρονικής ακτινοβολίας DLS-Diamond Light Source στην Οξφόρδη, μέσω του Ευρωπαϊκού προγράμματος για πρόσβαση σε μεγάλες εγκαταστάσεις, BioStruct-X (www.biostruct-x.eu).

Κεφάλαιο 1
Θεωρητικό Μέρος

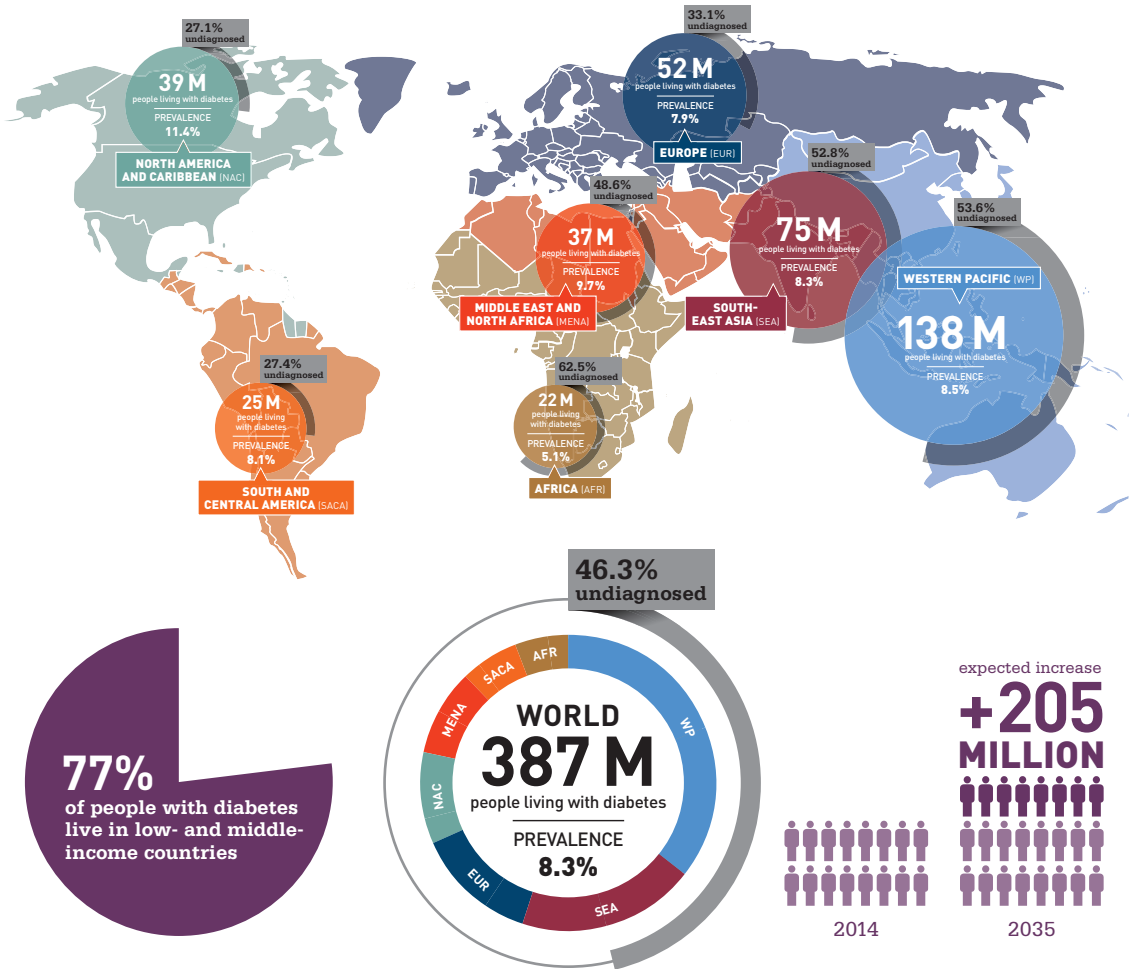
1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης *(diabetes mellitus)* αποτελεί χρόνιο νόσημα, γνωστό από τον 1^{ο} μ.Χ. αιώνα. Συνίσταται σε χρόνια και γενικευμένη μεταβολική διαταραχή, η οποία οφείλεται σε σχετική ή απόλυτη έλλειψη της ορμόνης ινσουλίνης. Εμφανίζει συμπτώματα που ποικίλλουν ανάλογα με τον ασθενή και η εξέλιξή του είναι απρόβλεπτη.

Όσον αφορά στην ονομασία, *diabetes mellitus*, προέρχεται από το ρήμα διαβαίνω, αφού η τροφή που καταναλώνει ο ασθενής "διαβαίνει" από μέσα του, αλλά δεν κατακρατείται για αυτό και ο ασθενής αδυνατίζει. Το *mellitus* προέρχεται από τη γλυκιά (σαν μέλι) γεύση των ούρων του.

Σήμερα, 387 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη και μέχρι το 2035 αναμένεται οι ασθενείς να ξεπεράσουν τα 592 εκατομμύρια. Ιδιαίτερα ο αριθμός των ατόμων που πάσχει από διαβήτη τύπου 2 αυξάνεται συνεχώς από χώρα σε χώρα. Όπως φαίνεται και στο χάρτη το μεγαλύτερο μέρος των νοσούντων βρίσκεται στις χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος ενώ πολύ σοβαρό πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι στο 50% περίπου των ασθενών ο διαβήτης δεν έχει διαγνωστεί. (Σχήμα 1.)

Ειδικότερα, ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί ομάδα μεταβολικών παθήσεων που χαρακτηρίζονται από υπεργλυκαιμία ως συνέπεια διαταραχών στην έκκριση ινσουλίνης, στη δράση της ή και στα δυο. Η χρόνια υπεργλυκαιμία που προκαλεί ο σακχαρώδης διαβήτης σχετίζεται με την πρόκληση μακροχρόνιων βλαβών, δυσλειτουργίας ή ανεπάρκειας διαφόρων οργάνων και κυρίως των ματιών, των νεφρών, των νεύρων, της καρδιάς και των αγγείων.[1]

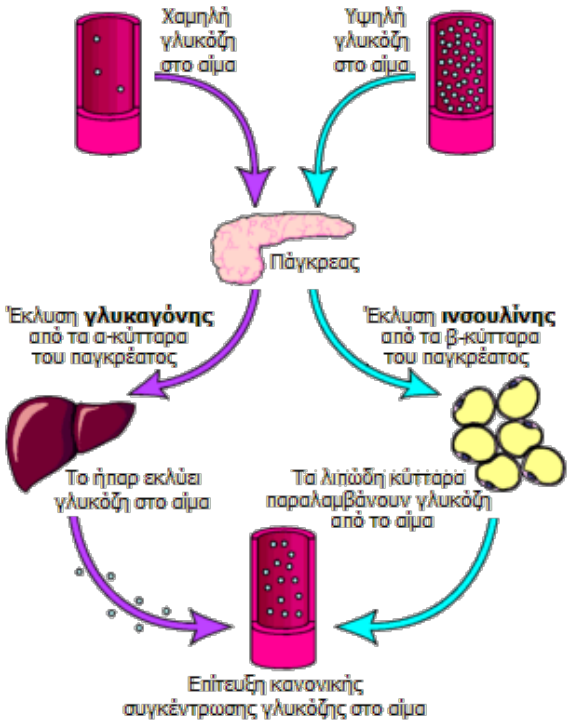


Σχήμα 1.: Ο αριθμός των ασθενών που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη όπως καταγράφηκε από την International Diabetes Federation (IDF) το 2014.

Πολλοί παθογενετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην ανάπτυξη του σακχαρώδους διαβήτη, συμπεριλαμβανομένων της αυτοάνοσης καταστροφής των β-κυττάρων του παγκρέατος, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την ανεπάρκεια της ινσουλίνης, και των διαταραχών που οδηγούν σε αντίσταση στην ινσουλίνη. Στο σακχαρώδη διαβήτη παρατηρούνται διαταραχές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, του λίπους και των πρωτεϊνών οι οποίες προέρχονται είτε από την ανεπαρκή δράση της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους λόγω ανεπαρκούς έκκρισής της είτε λόγω ελαττωμένης ανταπόκρισης των ιστών στους οποίους κυκλοφορεί η ινσουλίνη.

Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη είναι πολυπεπτιδικές ορμόνες οι οποίες εκκρίνονται απ' ευθείας στην κυκλοφορία του αίματος από το πάγκρεας (ενδοκρινείς ορμόνες). Με τις δύο αυτές ορμόνες ρυθμίζεται η συγκέντρωση

γλυκόζης στο αίμα, που κατά μέσον όρο πρέπει να παραμένει σε ένα περιορισμένο εύρος (70 mg/dL έως 110 mg/dL). Και οι δύο ορμόνες παράγονται από τα νησίδια Langerhans του παγκρέατος και έχουν ακριβώς αντίθετη δράση, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ρυθμιστική τους ικανότητα. Ένα αρκετά απλουστευμένο σχήμα που δείχνει τον κεντρικό ρόλο του παγκρέατος στη ρύθμιση της γλυκόζης παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 2.)

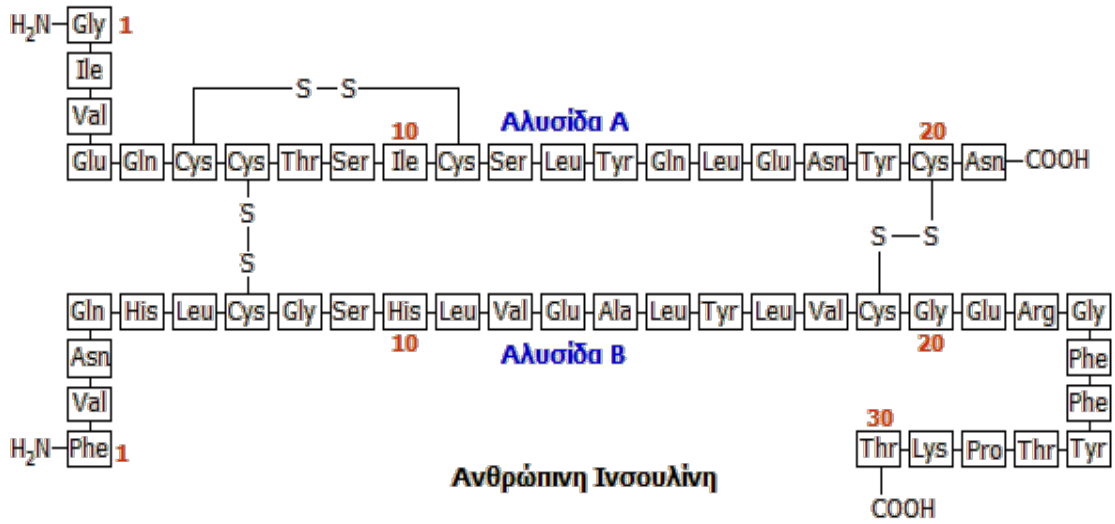


Σχήμα 2.: Στο σχήμα φαίνεται ο κεντρικός ρόλος του παγκρέατος στη ρύθμιση της γλυκόζης. Η ινσουλίνη επηρεάζει ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των μυϊκών, των ερυθρών και των λιπωδών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά σε απόκριση στην ινσουλίνη απορροφούν τη γλυκόζη, επιτυγχάνοντας έτσι τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα σε κανονικά επίπεδα. Η γλυκαγόνη λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο αλλά στην αντίθετη κατεύθυνση. [2]

Ο ρόλος της γλυκόζης στον οργανισμό είναι πολύ σημαντικός καθώς αποτελεί πηγή ενέργειας για τον εγκέφαλο και τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Όταν η γλυκόζη μπει στο κύτταρο μπορεί να συμμετέχει σε διάφορες πορείες, αναλόγως του τύπου του κυττάρου που βρίσκεται και τις ανάγκες του οργανισμού εκείνη τη στιγμή. Με αυτόν τον τρόπο αποθηκεύεται με τη μορφή γλυκογόνου όταν υπάρχει σε περίσσεια για να χρησιμοποιηθεί αργότερα όταν ο οργανισμός το έχει ανάγκη και είτε μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της

γλυκολυτικής πορείας και τελικά σε ενέργεια, είτε με αερόβιες συνθήκες μετατρέπεται σε ενέργεια με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Ακόμη, μπορεί να συμμετάσχει στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και της γλυκερόλης και τελικά στη σύνθεση των τριγλυκεριδίων

Αναλυτικότερα, η **ινσουλίνη** (Εικόνα 1.) εκκρίνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος που αποτελούν το 60-85% των κυττάρων των νησιδίων *Langerhans*. Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα «σηματοδοτούν» την έκκριση της ορμόνης από τα β-κύτταρα η δε δράση των τελευταίων είναι ξεκάθαρα αναβολική. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, τόσο αυξάνει ο ρυθμός έκκρισης ινσουλίνης. Με τη σειρά της η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα είδη κυττάρων του οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα. Χωρίς την ινσουλίνη τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη που αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας. Επιπλέον, η ινσουλίνη προάγει την αποθήκευση της γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ με τη μορφή γλυκογόνου. [3]

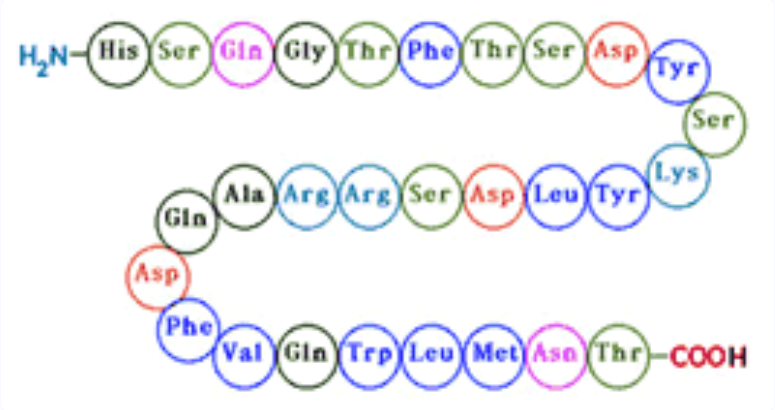


Εικόνα 1: Η δομή της ανθρώπινης ινσουλίνης

Όταν τα επίπεδα γλυκογόνου στο ήπαρ είναι ικανοποιητικά, η γλυκόζη αρχίζει να κατευθύνεται στα λιπώδη κύτταρα όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και γλυκερόλης και τελικά τριγλυκεριδίων. Η ινσουλίνη "καθοδηγεί" τα κύτταρα, όταν αυτά αναζητούν ενέργεια, να καταναλώσουν

γλυκόζη αντί λιπαρών οξέων και επομένως εμπλέκεται στους μηχανισμούς συσσώρευσης λίπους στο σώμα. Πέραν της εμπλοκής της στο ισοζύγιο σακχάρου/λίπους, η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη αμινοξέων για σχηματισμό πρωτεϊνών, ενώ η έλλειψή της (όπως π.χ. σε καταστάσεις νηστείας) οδηγεί σε κατανάλωση και αλλοίωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών.

Η **γλυκαγόνη** (Εικόνα 2.) εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων και η δράση της είναι ξεκάθαρα καταβολική. Αντίθετα με την ινσουλίνη, η έκκρισή της διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης γλυκόζης του αίματος ενώ ενισχύεται από ορισμένα αμινοξέα και από τη μυϊκή δραστηριότητα. Η γλυκαγόνη αυξάνει τη στάθμη γλυκόζης στο αίμα επειδή διασπά το αποταμιευμένο στο ήπαρ γλυκογόνο και στους μύες προς γλυκόζη. Επιπλέον, ενεργοποιεί τη λιπόλυση στους λιπώδεις ιστούς με αποτέλεσμα την αποδέσμευση λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία του αίματος. [4]



Εικόνα 2: Δομή γλυκαγόνης

Η ανεπάρκεια της ινσουλίνης προκαλεί την νόσο του σακχαρώδη διαβήτη (τύπου 1 ή τύπου 2). Η ορμόνη αυτή έχει παρασκευαστεί συνθετικά από το 1921 και χορηγείται σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Παρασκευάζεται και με βάση την ινσουλίνη από ζώα, κυρίως χοίρους.

1.2 Τύποι Διαβήτη

Οι κύριοι τύποι του διαβήτη είναι τρεις, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και ο διαβήτης της κύησης. Γνωρίζουμε όμως ότι υπάρχουν και πολλά ακόμη είδη διαβήτη πιο εξειδικευμένα. [1, 5]

Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1 ή Νεανικός Διαβήτης (ινσουλινο-εξαρτώμενος)

Ο νεανικός σακχαρώδης διαβήτης ή διαβήτης τύπου 1 παρουσιάζεται όταν το πάγκρεας δεν παράγει καθόλου ινσουλίνη. Πρόκειται για τον σπανιότερο από τους 2 τύπους (περίπου 10% των διαβητικών) και συνήθως εμφανίζεται στην παιδική ηλικία. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) αναφέρει όμως ότι η συχνότητά εμφάνισής του στην Ευρώπη παρουσιάζει σημαντική αύξηση τα τελευταία χρόνια. [6]

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων οφείλεται σε προοδευτική καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, με αποτέλεσμα την απόλυτη έλλειψη και αδυναμία του οργανισμού να παράγει ινσουλίνη. Εμφανίζεται κυρίως σε νεαρά άτομα ηλικίας κάτω των 20 ετών και συνήθως εκδηλώνεται απότομα με έντονα κλινικά συμπτώματα, όπως πολυουρία, πολυδιψία, πολυφαγία και μεγάλη απώλεια βάρους σε σύντομο χρονικό διάστημα, που μπορούν να οδηγήσουν τα νεαρά κυρίως άτομα, σε διαβητικό κώμα.

Ο νεανικός σακχαρώδης διαβήτης κατατάσσεται στα αυτοάνοσα νοσήματα και οφείλεται στην καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν την ινσουλίνη από το ανοσοποιητικό σύστημα του ίδιου του ασθενούς. Έχει βρεθεί ότι σε ποσοστό 90% ευθύνεται το ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο, από γενετικό λάθος, στρέφεται εναντίων των β κυττάρων και τα καταστρέφει. Στο υπόλοιπο 10% τα αίτια δεν είναι γνωστά και χαρακτηρίζεται ως ιδιοπαθής. Είναι διαφορετικής αιτιολογίας από τον διαβήτη των ενηλίκων. Διάφοροι λοιμογόνοι παράγοντες, κυρίως ιοί, ενοχοποιούνται για την ανοσολογική διέγερση και την επίθεση που δέχονται τα β κύτταρα του παγκρέατος, τα οποία κυριολεκτικά πολιορκούνται από πληθώρα Τ λεμφοκυττάρων που δημιουργούνται λόγω της διέγερσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο αυξημένος αριθμός λεμφοκυττάρων στο περιβάλλον των β κυττάρων αρχικά τα

οδηγεί σε δυσλειτουργία και τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Έτσι με την πάροδο των ετών ελαττώνεται ο αριθμός τους και η παραγωγή της ινσουλίνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση του σακχαρώδη διαβήτη.

Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (μη ινσουλινο-εξαρτώμενος)

Ο διαβήτης τύπου 2 λέγεται και μη ινσουλινοεξαρτώμενος ή διαβήτης των ενηλίκων. Ο χαρακτηρισμός του ως διαβήτης των ενηλίκων, οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως πάντως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 χρονών και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών.

Στο διαβήτη τύπου 2 το πάγκρεας παράγει ινσουλίνη. Η ινσουλίνη όμως που παράγεται δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό. Τελικά και η μορφή αυτή του διαβήτη, μπορεί να καταλήξει σε αδυναμία του σώματος να χρησιμοποιήσει το σάκχαρο ως την κύρια πηγή ενέργειας. Ωστόσο, η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται - σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου 1 - από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου 2 ονομάζεται και "μη ινσουλινοεξαρτώμενος".

Ο διαβήτης τύπου 2 αποτελεί τη συχνότερη μορφή διαβήτη. Περίπου το 90-95% όλων των περιπτώσεων διαβήτη είναι μορφές διαβήτη τύπου 2. Η παχυσαρκία αποτελεί σαφή προδιαθεσικό παράγοντα, αφού σε ποσοστό 80% περίπου, τα άτομα με διαβήτη τύπου 2 είναι παχύσαρκα.

Διαβήτης της κύησης

Πρόκειται για την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (δεν συμπεριλαμβάνονται στον ορισμό γυναίκες με διαγνωσμένο διαβήτη πριν την έναρξη της εγκυμοσύνης). Ο τύπος αυτός μοιάζει με το διαβήτη τύπου 2 ως προς την ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης και την ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Σήμερα είναι γνωστό ότι ο διαβήτης κύησης εμφανίζεται στο 3-5% των κυήσεων και συσχετίζεται με την παχυσαρκία (δηλαδή η παχύσαρκη γυναίκα έχει μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσει διαβήτη κύησης και επιπλέον έχει

μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξει αργότερα στη ζωή της μόνιμα διαβήτη τύπου 2). Ο διαβήτης κύησης είναι αναστρέψιμη νόσος, η οποία υποχωρεί μετά τον τοκετό, συνδέεται όμως με προγεννητικές επιπλοκές και προβλήματα στην υγεία μητέρας και νεογνού. Τα νεογνά από μητέρες με διαβήτη κύησης κινδυνεύουν στην μετέπειτα ζωή τους να αναπτύξουν παχυσαρκία και δυνητικά διαταραχή ανοχής γλυκόζης ή ακόμη και σακχαρώδη διαβήτη.

Άλλοι τύποι διαβήτη μπορεί να αφορούν ειδικές γενετικές ασθένειες και ανωμαλίες ή όταν ο διαβήτης οφείλεται σε άλλη παθολογική κατάσταση ή αντίδραση.

Από τα πιο γνωστά φάρμακα που χορηγούνται στους ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 είναι η μετφορμίνη η οποία βοηθά στην ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης του αίματος μειώνοντας την ποσότητα αποθηκευμένης γλυκόζης που απελευθερώνεται από το συκώτι και επιβραδύνοντας την απορρόφηση γλυκόζης από το έντερο, ουσιαστικά η μετφορμίνη αναστέλλει τη γλυκογονόλυση και τη γλυκονεογένεση στο ήπαρ. Άλλο γνωστό φάρμακο είναι οι θειαζολιδινεδιόνες οι οποίες βελτιώνουν την ινσουλινοαντίσταση, ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων στον οργανισμό. Σε περιπτώσεις υπεργλυκαιμίας χορηγούνται επίσης και σουλφονυλουρίες οι οποίες προκαλούν υπογλυκαιμία και ελαττώνουν τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος διαγείροντας το πάγκρεας να εκκρίνει περισσότερη ινσουλίνη. Άλλα φάρμακα που χορηγούνται στους ασθενείς είναι μεγλιτινίδες, αναστολείς της γλυκοσιδάσης άλφα (Acarbose), αναστολείς DPP-4 (Sitagliptin, Vildagliptin), μιμητικά ινκρετινών, καθώς και συνδυασμός κάποιων φαρμάκων. [7]

Το ιδανικό φάρμακο για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 δεν υπάρχει. Όλα τα φάρμακα έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και δρουν μέχρι ενός σημείου. Για αυτό το λόγο κρίνεται αναγκαία η εύρεση νέων μεθόδων και νέων φαρμάκων για την αντιμετώπιση αυτής της ολοένα αυξανόμενης ασθένειας. Πολλές μελέτες έχουν γίνει και συνεχίζονται που αφορούν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και στα ένζυμα που εμπλέκονται στη ρύθμιση αυτού.

1.3 Σακχαρώδης διαβήτης και οξειδωτικό στρες

Πρόσφατες μελέτες τόσο πειραματικές όσο και κλινικές, απέδειξαν ότι το οξειδωτικό στρες επηρεάζει σε πολύ μεγάλο βαθμό το διαβήτη. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεια και των δυο κύριων τύπων διαβήτη. Οι επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη είναι αποτέλεσμα της χρόνιας υπεργλυκαιμίας και πιθανώς των αυξημένων ελεύθερων λιπαρών οξέων.[8]

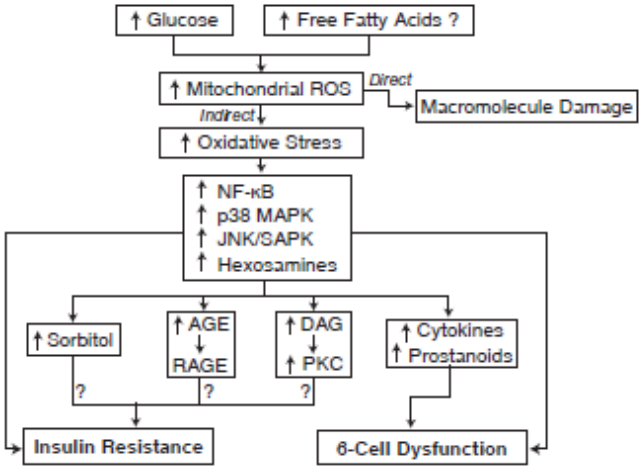
Το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των διαβητικών επιπλοκών, αφενός μέσω των αυξημένων ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αφετέρου λόγω της μειωμένης αποδόμησής τους από τον αντιοξειδωτικό αμυντικό μηχανισμό του κυττάρου. Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της υπεργλυκαιμίας, της παραγωγής των μιτοχονδριακών ελεύθερων ριζών οξυγόνου, του οξειδωτικού στρες και της ανάπτυξης των διαβητικών επιπλοκών.

Πιο συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι οι μικρο- και μακρο-αγγειακές επιπλοκές που αναπτύσσονται στο διαβήτη τύπου 1 και 2 αντίστοιχα, προέρχονται από τα χρόνια αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και πιθανώς και από τα αυξημένα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Φαίνεται ότι το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αυτές τις αγγειακές επιπλοκές.

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαφορά μεταξύ της αυξημένης παραγωγής και της μειωμένης αποδόμησης των ελευθέρων ριζών οξυγόνου οι οποίες παράγονται κατά τις διάφορες μεταβολικές διεργασίες.

Στο διαβήτη τύπου 2 η ενεργοποίηση των οδών του πυρηνικού παράγοντα NF-kB, των οδών των p38 MAPK και JNK/SAPK κινασών από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, σε συνδυασμό με την εκτροπή του μεταβολισμού της γλυκόζης κατά την γλυκόλυση (δηλαδή με την παραγωγή τελικών παραγόντων μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (PKC)), η οποία προκαλείται από την υπεργλυκαιμία και πιθανώς και από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, συμβάλλουν τόσο στην ανάπτυξη της αντίστασης στην ινσουλίνη όσο και

στη διαταραχή της απευθείας καταστροφής των ενδοθηλιακών κυττάρων και των β-κυττάρων του παγκρέατος. (Σχήμα 3.) [9]



Σχήμα 3.: Η αυξημένη γλυκόζη και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα συμβάλλουν στην παθογένεια του διαβήτη μέσω της παραγωγής των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και στη συνέχεια με την ενεργοποίηση ενός αριθμού οδών ευαίσθητων στο στρες. Θεωρείται ότι υπάρχει σχέση μεταξύ υπεργλυκαιμίας, της παραγωγής των μιτοχονδριακών ελεύθερων ριζών οξυγόνου, του οξειδωτικού στρες και της ανάπτυξης των διαβητικών επιπλοκών. Στο διαβήτη τύπου 2 η ενεργοποίηση των οδών του NF-kB των p38 MAPK και JNK/SAPK κινασών και της εξαμινιδάσης από την αύξηση της γλυκόζης και ίσως και των ελευθέρων λιπαρών οξέων οδηγούν στην αντίσταση στην ινσουλίνη. [9]

Σε πρόσφατες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν βιοδείκτες οξειδωτικού στρες, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η σχέση μεταξύ του στρες και του διαβήτη. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε ποντίκια όπου έχει προκληθεί ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης (τύπου 1) με τη χρήση στρεπτοζοτοκίνης (STZ) και αλλοξάνης (alloxan). Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών οξυγόνου, η οποία συσχετίζεται με την οξείδωση της γλυκόζης και με τη μη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών τα οποία συμβάλλουν στην ανάπτυξη διαβητικών επιπλοκών. Τα τελευταία χρόνια έχουν μελετηθεί εκτενώς αρκετά αντιοξειδωτικά με προστατευτική δράση για να διαλευκανθεί η σχέση μεταξύ των ελευθέρων ριζών και του διαβήτη. *In vitro* και κλινικές μελέτες μπορούν να παράσχουν επιπρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες για τη σχέση του οξειδωτικού στρες και του διαβήτη.[8]

Το 2002 πραγματοποιήθηκε μια έρευνα από το πανεπιστήμιο Duke της Βόρειας Καρολίνας που αφορούσε το πόσο επηρεάζει το στρες τα επίδεδα τα γλυκόζης στο αίμα. Οι ερευνητές προσπάθησαν να εξετάσουν εάν η καταπολέμηση, ο σωστός χειρισμός και ο έλεγχος του στρες, έχουν ευεργετική επίδραση στα επίπεδα γλυκόζης του οργανισμού των διαβητικών. Στη μελέτη αυτή έλαβαν μέρος 108 ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Μετά από ένα χρόνο, η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι διαβητικοί που είχαν λάβει μέρος στο πρόγραμμα για τη διαχείρηση του στρες, είχαν σημαντική βελτίωση της γλυκόζης του αίματος και της αιμοσφαιρίνης, ενώ, οι ασθενείς που ήταν περισσότερο αγχώδεις δεν φάνηκε ότι επωφελούνταν περισσότερο από τους ασθενείς που υπέφεραν μέτρια από το στρες. [10]

1.4 Γλυκόλυση και γλυκονεογένεση

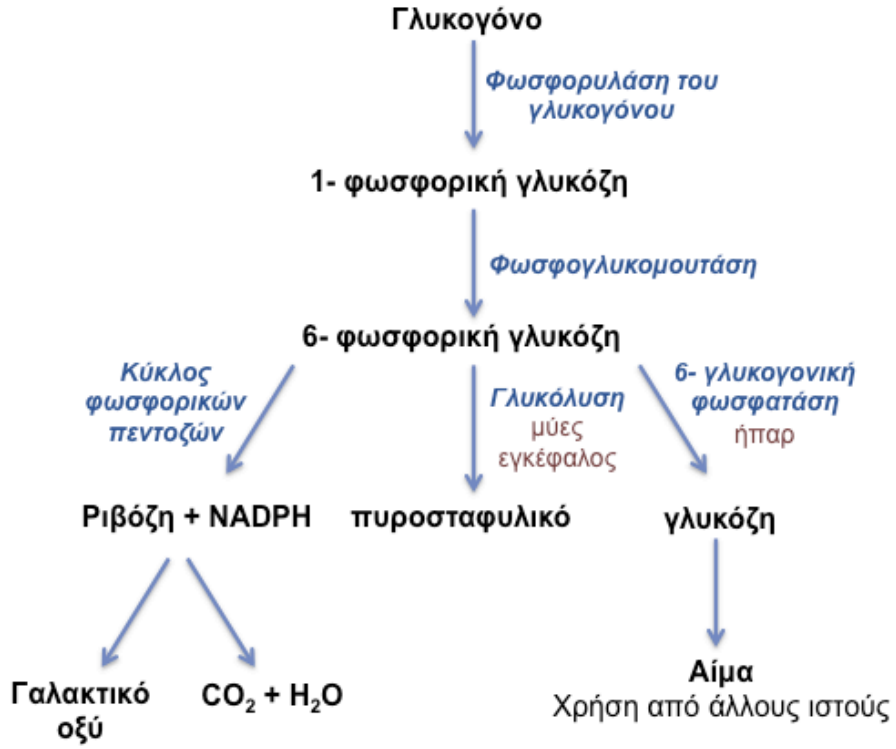
Η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τον οργανισμό. Γλυκόζη λαμβάνουμε από τις τροφές καθώς και από τη διάσπαση σύνθετων υδατανθρακών. Ακόμη σε περιπτώσεις νηστείας, παρατεταμένης ασιτίας, άσκησης ή στρες ο οργανισμός λαμβάνει γλυκόζη από τη διάσπαση του γλυκογόνου μέσω τη γλυκόλυσης. Το γλυκογόνο είναι ένα μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές μονάδων γλυκόζης και αποτελεί μια άμεσα κινητοποιούμενη πηγή γλυκόζης.

Ειδικότερα, το γλυκογόνο είναι πολύ σημαντικό απόθεμα καυσίμων για τον οργανισμό, γιατί ο ελεγχόμενος καταβολισμός του και η απελευθέρωση της γλυκόζης αυξάνουν τα επίπεδα της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος μεταξύ των γευμάτων.

Το γλυκογόνο αποθηκεύεται κυρίως στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες. Στο ήπαρ η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη σε σχέση με τους μύες, ωστόσο η συνολική ποσότητα αυτού που αποθηκεύεται στους μύες είναι μεγαλύτερη λόγω της μεγαλύτερης μάζας τους. Στο ήπαρ η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρούνται τα επίπεδα της γλυκόζης που χρειάζονται για την κάλυψη των

αναγκών του ανθρώπινου οργανισμού στο σύνολό του ενώ στους μύες η ίδια διεργασία αφορά μόνο στην κάλυψη των αναγκών στο συγκεκριμένο ιστό.

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου πραγματοποιείται σε τρία κύρια στάδια (Σχήμα 4). Το πρώτο στάδιο είναι η απελευθέρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο, μια αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου.



Σχήμα 4.: Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου και καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση των μονάδων της γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του γλυκογόνου. Ουσιαστικά ο γλυκοζιτικός δεσμός C-1 της τελικής μονάδας και ο C-4 του γειτονικού διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν.

Το δεύτερο στάδιο της αποικοδόμησης του γλυκογόνου είναι η ανακατασκευή του υποστρώματος η οποία επιτυγχάνεται μετά τη διάσπαση του δεσμού όπου διατηρείται η διαμόρφωση α στον C-1.

Η 1-φωσφορική γλυκόζη που απελευθερώνεται από το γλυκογόνο μπορεί να μετατραπεί σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Η μετατροπή αυτή αποτελεί και το τελευταίο στάδιο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Η 6-φωσφορική γλυκόζη που παράγεται μπορεί να ακολουθήσει 3 πιθανές κατευθύνσεις, είτε να αποτελέσει το αρχικό υπόστρωμα για τη γλυκόλυση, είτε να ακολουθήσει την πορεία των φωσφορικών πεντοζών, για την απόδοση NADPH και παραγώγων ριβόζης, είτε να μετατραπεί σε ελεύθερη γλυκόζη προκειμένου να απελευθερωθεί στην κυκλοφορία του αίματος.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου όμως δεν μπορεί να ολοκληρώσει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου καθώς αυτή μπορεί να καταλύσει τη διάσπαση των δεσμών που βρίσκονται σε διακλαδώσεις, δηλαδή τους α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Όπως γνωρίζουμε το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο μόριο. Συνεπώς, προκειμένου να ολοκληρωθεί η διαδικασία της αποικοδόμησης του γλυκογόνου, χρειάζεται δυο μόρια. Αυτά τα μόρια είναι μια μεταφοράση και μια α-1,6 γλυκοζιδάση, τα οποία μεταφέρουν μια ομάδα τριών μονάδων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη, αφήνοντας έτσι εκτεθιμένη μια μόνο μονάδα γλυκόζης με α-1,6 γλυκοζιτικό δεσμό, τον οποίο υδρολύει η α-1,6 γλυκοζιδάση.

Όσον αφορά στη γλυκονεογένεση (σύνθεση του γλυκογόνου), αυτή χρειάζεται μια ενεργοποιημένη μορφή γλυκόζης, την UDP-γλυκόζη (ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη), η οποία παράγεται από την αντίδραση της UTP και της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η παραχθείσα UDP-γλυκόζη και συγκεκριμένα η ενεργοποιημένη γλυκοζυλική της μονάδα μεταφέρεται στο υδροξύλιο του C-4 ενός άκρου του γλυκογόνου προς το σχηματισμό ενός γλυκοζιτικού δεσμού α-1,4. Κατά την επιμήκυνση η UDP αντικαθίσταται από την τελική υδροξυλική ομάδα του αυξανόμενου μορίου του γλυκογόνου. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από τη συνθάση του γλυκογόνου που είναι και τα καθοριστικό ένζυμο στη σύνθεση του γλυκογόνου.
Επειδή το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο μόριο χρειάζεται ένα μόριο σχηματισμού διακλαδώσεων για τους δεσμούς α-1,6. Ο δεσμός α-1,6 σχηματίζεται με τη διάσπαση ενός δεσμού α-1,4, όπου μια ομάδα συνήθως 7 μονάδων μεταφέρεται σε μια πιο εσωτερική θέση.

1.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου απαντάται σε 3 ισομορφές οι οποίες παράγονται από διαφορετικά γονίδια των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων: τη μυϊκή, την ηπατική και αυτήν του εγκεφάλου. Και οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν 80% ομολογία στην αμινοξική τους ακολουθία, ενώ τα 15 από τα 16 αμινοξέα που συνδέονται με τη γλυκόζη στο καταλυτικό κέντρο είναι ίδια και στις 3 ισομορφές. [11]

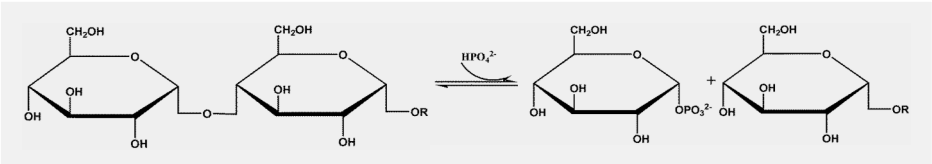
Όσον αφορά στη μυϊκή φωσφορυλάση (GPMM), εκφράζεται στους μύες και υπάρχει σε δυο αλληλομετατραπόμενες μορφές, τη μορφή *a* που είναι συνήθως η ενεργή μορφή και τη μορφή *b* που είναι συνήθως η ανενεργή μορφή, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία απουσία οποιουδήποτε τροποποιητή. Ακόμη, καθεμιά από αυτές τις δυο ισομορφές βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης *R* και μιας λιγότερο ενεργούς τεταμένης κατάστασης *T*. Η ισορροπία, ευνοεί τη φωσφορυλάση *a* στην κατάσταση *R* και τη φωσφορυλάση *b* στην κατάσταση *T*. Η φωσφορυλάση *b* μετατρέπεται στη φωσφορυλάση *a* όταν αυτή φωσφορυλιώνεται σε μια μονάδα σερίνης σε κάθε υπομονάδα.

Η ηπατική φωσφορυλάση (GPLL) εκφράζεται στο ήπαρ και εμφανίζει και αυτή δυο ισομορφές, όπως και η μυϊκή αλλά η διαφορά είναι ότι αυτή που εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα στη μετάπτωση από την κατάσταση T στην κατάσταση R είναι η φωσφορυλάση α σε αντίθεση με τη μυϊκή φωσφορυλάση b.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου (GPBB) εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και συγκεκριμένα στα αστροκύτταρα και το μυοκάρδιο και παρέχει γλυκόζη όταν υπάρχει ανάγκη, σε περιόδους ασιτίας, ή υπογλυκαιμίας για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του εγκεφάλου.[12] Η λειτουργία της δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη, όμως παρ' όλα αυτά είναι πολύ σημαντική καθώς παρέχει στον εγκέφαλο γλυκόζη όταν αυτός την έχει ανάγκη και σε περίπτωση που δεν καταφέρει να ικανοποιήσει αυτήν την ανάγκη του εγκεφάλου, τότε έχουμε απώλεια αισθήσεων του οργανισμού και στην συνέχεια επέρχεται ο θάνατος. Όσον αφορά στις διαβητικές επιπλοκές, φαίνεται ότι η γλυκόλυση

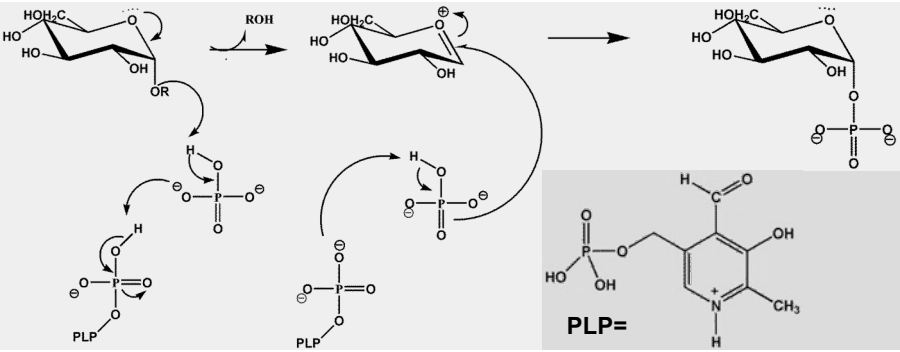
επηρεάζεται από την ινσουλίνη που επάγεται από την υπογλυκαιμία και ίσως εμπλέκεται στην ανάπτυξη της διαβητικής επιπλοκής. Ακόμη αυτή η ισομορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου χρησιμοποιείται ως βιοδείκτης για την κίρρωση του ήπατος και την ισχαιμία του μυοκαρδίου.[13]

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει και στις τρεις ισομορφές της την ίδια αντίδραση. (Σχήμα 5.)



Σχήμα 5. : Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Στην κατάλυση πολύ σημαντικό ρόλο παίζει η φωσφορική πυριδοξάλη (pyridoxal 5'-phosphate, PLP) η οποία είναι ένα παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B_6). Μελέτες έδειξαν ότι η αλδεϋδική ομάδα της PLP σχηματίζει βάση Schiff με τη Lys 680 της φωσφορυλάσης πράγμα που επιφέρει αναδιατάξεις και δομικές αλλαγές στην πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, η ορθοφωσφορική ομάδα που αντιδρά, καταλαμβάνει μια θέση μεταξύ του γλυκογόνου (που είναι το υπόστρωμα) και της 5΄-φωσφορικής ομάδας της PLP. Η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP δρα μαζί με το ορθοφωσφορικό, είτε ως δότης είτε ως δέκτης πρωτονίων. Δηλαδή δρα ως οξεοβασικός δείκτης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου καρβοκατιόντος το οποίο προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό, για το σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Με αυτόν τον τρόπο η PLP διευκολύνει τη φωσφολυτική διάσπαση. (Σχήμα 6.) [14]



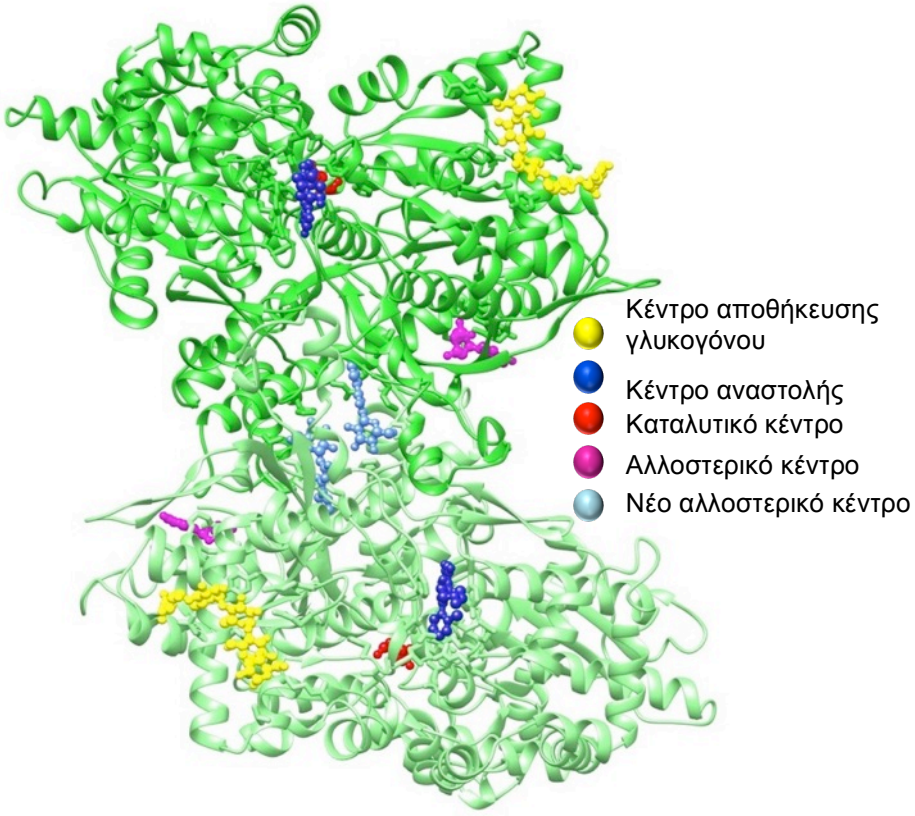
Σχήμα 6. : Ο μηχανισμός δράσης της PLP

Το 1936 απομονώθηκε και το 1942 κρυσταλλώθηκε για πρώτη φορά η φωσφορυλάση του γλυκογόνου από τους σκελετικούς μύες κουνελιού από τους Green και Cori και προσδιορίστηκε η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου.[15]

Σύμφωνα με την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου στην *T* διαμόρφωση (RMGP*b*), η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελείται από 2 πανομοιότυπες συμμετρικές υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kDa και 842 αμινοξέων η κάθε μια. Οι υπομονάδες αυτές συνδέονται με ένα δυϊκό άξονα συμμετρίας (2-fold axis) και κάθε υπομονάδα διπλώνεται συμπαγώς σε δυο περιοχές, την αμινοτελική περιοχή 484 μονάδων και την καρβοξυ-τελική περιοχή 358 μονάδων. (Σχήμα 7.)

Κατά τη μετατροπή του ενζύμου από την *T* διαμόρφωση στην *R* παρατηρούνται δομικές αλλαγές όπως υποδεικνύει η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου. Αυτές τις δομικές μεταβολές τις περιέγραψαν οι Barford και Johnson το 1989. Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι στην *T* διαμόρφωση σχηματίζεται μια διεπιφάνεια από την αντιπαράλληλη σύνδεση δυο συμμετρικών tower ελίκων (αμινοξέα 262-279), η οποία σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων Asn270 και Asn274 και των συμμετρικών τους ομολόγων. Η κίνηση αυτή των δυο ελίκων πραγματοποιείται μέσω ενός εύκαμπτου βρόγχου ο οποίος σχηματίζεται από τα αμινοξέα 252-258 και βρίσκεται μεταξύ των ελίκων και ενός β-πτυχωτού φύλλου που αποτελείται από τα αμινοξέα 237-247. [16]

Η υψηλή ομολογία των τριών ισομορφών της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, της ηπατικής, της μυϊκής και αυτής του εγκεφάλου, καθώς και η δυνατότητα απομόνωσης της δεύτερης από το μυϊκό ιστό κουνελιού, οδήγησαν στην αξιοποίηση του μυϊκού ισοενζύμου ως μοριακό στόχο. Έτσι τα κέντρα σύνδεσης του χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό πρόδρομων ενώσεων. Οι ισχυρότεροι αναστολείς αυτού του ενζύμου, μελετήθηκαν και εξετάσθηκαν για τη δράση τους σε ηπατοκύτταρα προκειμένου να βρεθεί αν αναστέλλουν και την ηπατική φωσφορυλάση. Πράγματι, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ίδιοι αναστολείς αναστέλλουν και τη δράση της ηπατικής φωσφορυλάσης.[17] Έτσι η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου καθίσταται πρότυπος στόχος για την ανάπτυξη δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.



Σχήμα 7. :Σχηματική απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Με διαφορετικές αποχρώσεις του πράσινου χρώματας απεικονίζονται οι δυο συμμετρικές υπομονάδες. Υποδεικνύονται επίσης τα διακριτά κέντρα σύνδεσης: το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, το κέντρο αναστολής, το καταλυτικό κέντρο, το αλλοστερικό κέντρο και το νέο αλλοστερικό κέντρο με κίτρινο, μπλε, κόκκινο, μωβ και γαλάζιο, αντιστοίχως.

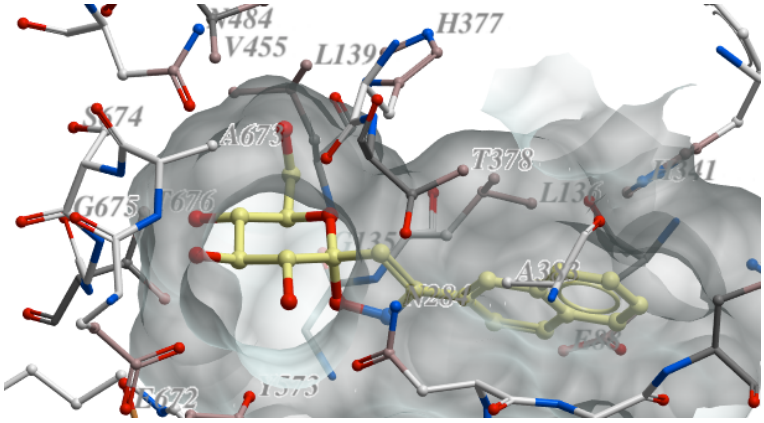
1.6 Τα κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ έως σήμερα έχουν προσδιορισθεί πέντε διακριτά κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου: το καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, το αλλοστερικό κέντρο, το νέο αλλοστερικό κέντρο και τα τελευταία χρόνια βρέθηκε άλλο ένα το κέντρο σύνδεσης αυτό του βενζιμιδαζολίου.[18] Όλα τα κέντρα του ενζύμου, πλην αυτού του βενζιμιδαζολίου, χρησιμοποιούνται ως στόχος για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Ειδικότερα:

Το **καταλυτικό κέντρο**, στο οποίο συνδέονται η γλυκόζη και παράγωγα αυτής χρησιμοποιήθηκε ως στόχος για το σχεδιασμό ισχυρών αναστολέων του ενζύμου με υψηλή συγγένεια για το ένζυμο. Πιο συγκεκριμένα, το καταλυτικό κέντρο είναι ένα μακρύ κανάλι, το λεγόμενο β-κανάλι, το οποίο περιλαμβάνει πολικά και μη πολικά αμινοξέα καθώς και μόρια νερού. Σε αυτό διακρίνονται η α-υποπεριοχή στην οποία προσδένονται το ορθοφωσφορικό ιόν ή η 1-φωσφορική ομάδα και το το β-υπόκεντρο. [19]

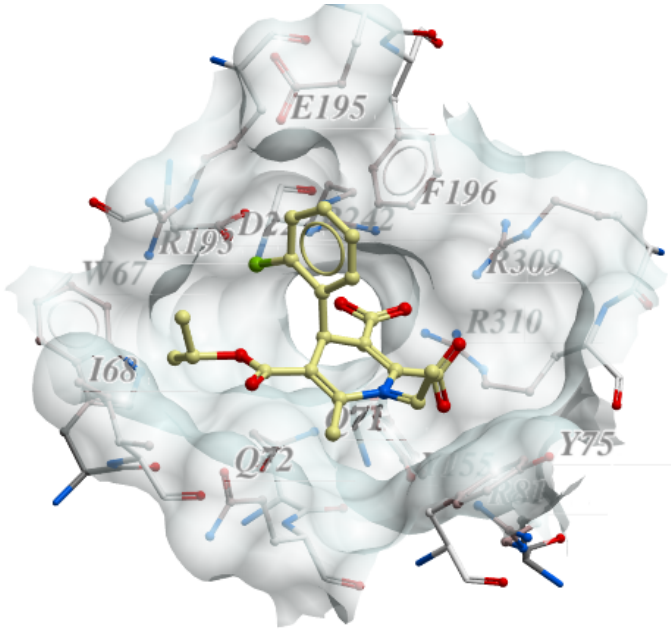
Οι περισσότεροι αναστολείς που συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου είναι γλυκοπυρανόζυλο παράγωγα, τα οποία προσδένονται κατά μήκος του β-καναλιού με το υδρόφοβο τμήμα τους να εκτείνεται προς το β-υποκέντρο. Η είσοδος του καταλυτικού κέντρου στην Τ διαμόρφωση (κλειστή) φράσσεται από έναν ευκίνητο βρόγχο (280s loop) ο οποίος περιλαμβάνει τα αμινοξέα 282-287. Μελέτες έδειξαν ότι τα β-D-γλυκοπυραζυλο ανάλογα είναι πολύ καλύτεροι αναστολείς από τους αντίστοιχους α-. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων ενώσεων αποτελούν τα ανάλογα των β-D-γλυκοπυρανοζυλο-αμινών οι οποίες συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου αλληλεπιδρώντας με το περιβάλλον τους κυρίως μέσω δεσμών υδρογόνου αλλά και Van der Waals αλληλεπιδράσεων. Η κρυσταλλική δομή αυτών των ενώσεων ως συμπλόκων με το ένζυμο έδειξε ότι στα περισσότερα από αυτά τα σύμπλοκα σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου της His377 και του αμιδικού αζώτου ο οποίος διατηρείται. (Σχήμα 8)

Το **κέντρο αναστολής** βρίσκεται στην επιφάνεια της RMGP*b* και στην *T* διαμόρφωση σχηματίζεται από τα αμινοξέα Phe285 και Tyr613 που ανήκουν στον 280s βρόγχο και στην α19 έλικα αντίστοιχα.



Σχήμα 8.: Η πρόσδεση της σπειροϋδαντοίνης της γλυκοπυρανόζης στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Διακρίνεται ο προσανατολισμός της υδρόφοβης ομάδας στην περιοχή του β-καναλιού και ο 280s βρόγχος κατά μήκος του καταλυτικού καναλιού (αμινοξέα 282-287). Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα *MolSoft ICM*.

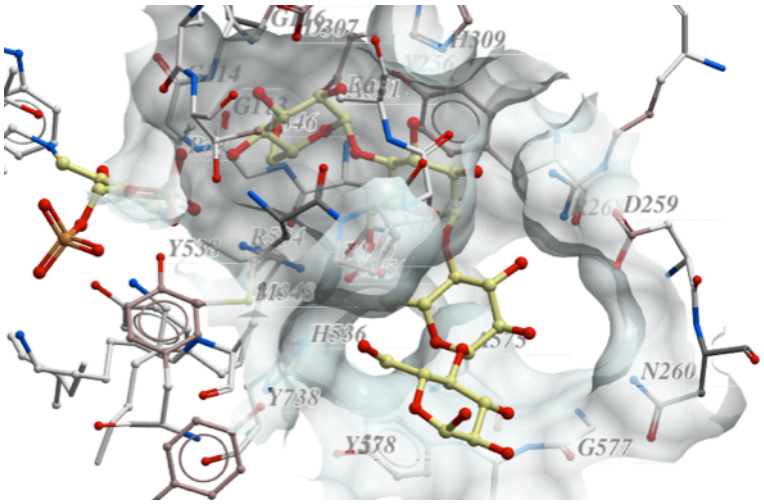
Οι ενώσεις που προτιμούν αυτό το κέντρο σχηματίζουν π-π αλληλεπιδράσεις επιστοίβασης μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων και των αμινοξέων Phe285 και Tyr613. (Σχήμα 9)



Σχήμα 9.: Η ένωση φλαβοπιριδόλη κατά την πρόσδεσή της στο κέντρο αναστολής ης RMGP*b*. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα MolSoft ICM.

Στο κέντρο αυτό συνδέονται πουρίνες, νουκλεοτίδια, νουκλεοζίτες και η ένωση της φλαβοπιριδόλης. Η σύνδεση αυτών σταθεροποιεί την T διαμόρφωση της φωσφορυλάσης, εμποδίζοντας την είσοδο στο καταλυτικό κέντρο και αναστέλλοντας έτσι τη δράση του ενζύμου.[19]

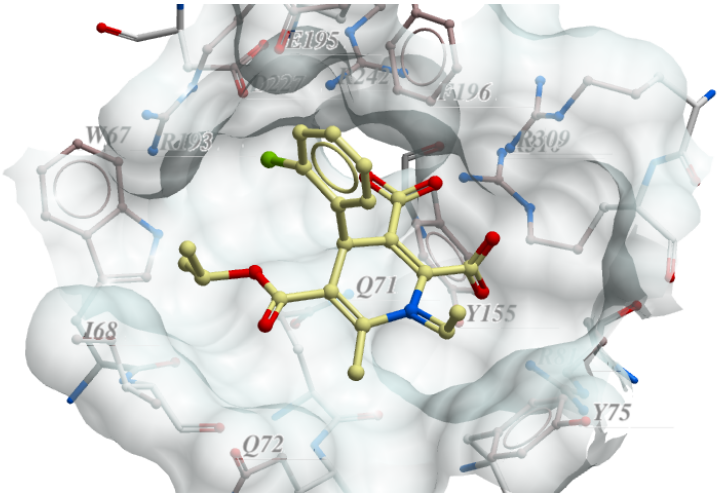
Το **κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου** εντοπίζεται στην επιφάνεια του ενζύμου απέναντι από το κέντρο αναστολής. Αυτό το κέντρο επικοινωνεί με ένα κανάλι με την καταλυτική περιοχή και εκεί μπορεί να χωρέσουν μέχρι και 6 μονάδες γλυκόζης. Αυτή η απόσταση είναι που καθιστά τη φωσφορυλάση διεκπεραιωτικό ένζυμο, της δίνει δηλαδή τη δυνατότητα να φωσφορυλύει ταυτόχρονα πολλές μονάδες χωρίς να πρέπει να αποσυνδέεται και να συνδέεται εκ νέου μετά από κάθε καταλυτικό κύκλο. [20] Η δομή ενός ολιγοσακχαρίτη που έχει προσδιοριστεί ως σύμπλοκο με την *E.coli* φωσφορυλάση του γλυκογόνου παρουσιάζεται στο σχήμα 10.



Σχήμα 10. : Ο ολιγοσακχαρίτης μαλτοπεντανόζη κατά τη σύνδεσή του στο κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου στην RMGP*b* του E.Coli. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα MolSoft ICM.

Αναστολή του RMGP*b* προκαλείται και με την πρόσδεση αλλοστερικών μορίων στο **αλλοστερικό κέντρο**, το οποίο σχηματίζεται από αμινοξέα που ανήκουν και στις δύο συμμετρικές υπομονάδες. Οι αλλοστερικοί ενεργοποιητές, AMP και IMP, και οι αλλοστερικοί αναστολείς όπως η 6-φωσφορική γλυκόζη προδένονται σε αυτό το κέντρο και προκαλούν είτε την ενεργή είτε την

ανενεργή μορφή του ενζύμου αντίστοιχα. Ενώσεις όπως τα ινδιρουβίδια και οι ακυλο-ουρίες προσδένονται σε αυτό το κέντρο. Δομικές μελέτες ενώσεων (από ποικίλες κατηγορίες) ως συμπλόκων με το ένζυμο, έδειξαν ότι συνδέονται σε μη ειδικά υπόκεντρα του αλλοστερικού κέντρου. Ο πιο ισχυρός αναστολέας που έχει ταυτοποιηθεί για αυτό το κέντρο είναι ο W1807 με K_i 1.6 nm (Σχήμα 11). Αυτός ο αναστολέας προκαλεί δραματικές αλλαγές στην τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης κατά τη σύνδεσή του στο αλλοστερικό κέντρο. [19] *In vivo* μελέτες σε αρουραίους έδειξαν ότι προκαλεί σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα , αλλά παρόλα αυτά δεν κρίθηκε κατάλληλος για περαιτέρω αξιοποιήση σε κλινικές μελέτες.

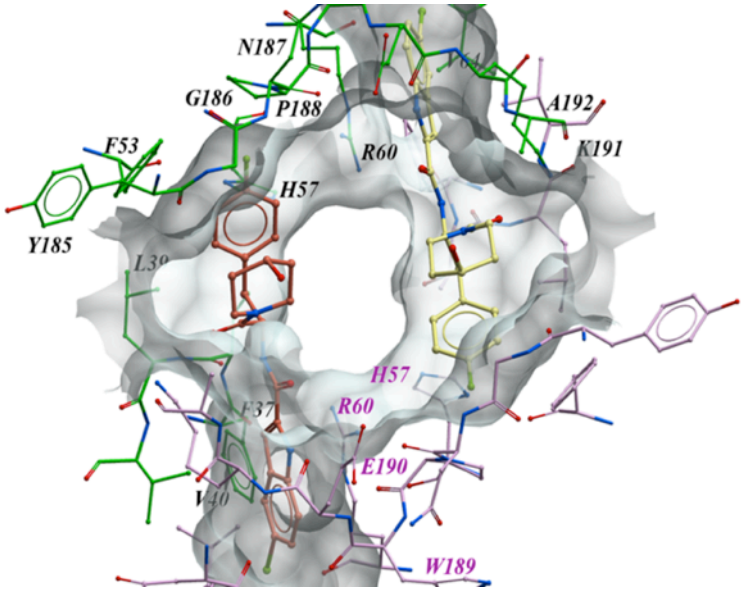


Σχήμα 11. : Η ένωση W1807 κατά τη σύνδεσή της στο αλλοστερικό κέντρο της RMGP*b*. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα MolSoft ICM.

Το **νέο αλλοστερικό κέντρο** ανακαλύφθηκε το 2000 ύστερα από συγκρυστάλλωση της RMGP*b* με το ινδολο-2-καρβοζαμίδιο (κωδική ονομασία CP320626) (Σχήμα 12.) έναν σχυρό αναστολέα του ενζύμου με IC_{50}= 334 ± 10 nM παρουσία 10mM γλυκόζης και IC_{50}= 178 ± 10 nM απουσία γλυκόζης. Αυτό το κέντρο εντοπίζεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς και έχει αμφίφιλο (πολικό και μη πολικό) χαρακτήρα. Εκτός από το ινδολο-2-καρβοξαμίδιο βρέθηκε ότι συνδέονται και γλυκοπυρανόζυλο ανάλογα, χωρίς όμως ο γλυκοπυρανοζιτικός δακτύλιος να παρουσιάζει συγκεκριμένη θέση σύνδεσης. Από τις ενώσεις που μελετέθηκαν βρέθηκε ότι αυτές οι οποίες έφεραν μια ναφθυλομάδα ως υποκαταστάτη επέδειξαν πολύ ευνοϊκή σύνδεση.

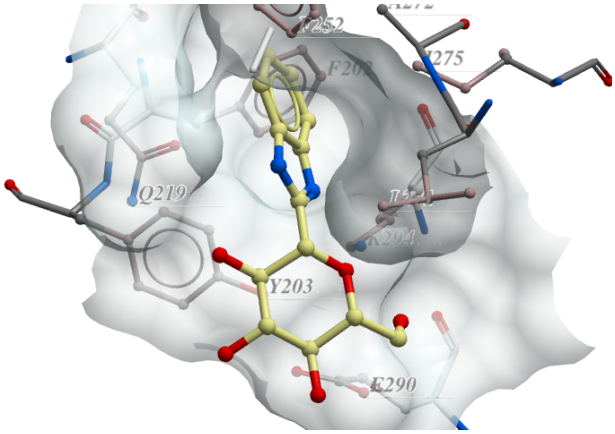
Αξίζει να σημειωθεί ότι για όλους τους προσδέτες που έφεραν την ομάδα γλυκοπυρανοζιτικού δακτυλίου ο προσανατολισμός και η θέση αυτού διατηρούνται.[19,21]

Πρόσφατα, δομικές μελέτες σε μια σειρά C-(β-D- γλυκοπυρανοζυλο) αζολών έδειξαν ότι το βενζιμιδαζόλιο προσδένεται σε μια διαφορετική θέση από αυτές που μέχρι τότε είχαν ανακαλυφθεί για τη GP.



Σχήμα 12. : Η ένωση CP320626 κατά τη σύνδεσή της στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP*b*. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα MolSoft ICM.

Αυτό το νέο **κέντρο σύνδεσης του βενζιμιδαζολίου** βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, αρκετά μακριά από τα άλλα κέντρα σύνδεσης (32 Å μακριά από το καταλυτικό, το αλλοστερικό και το νέο αλλοστερικό κέντρο) και απαρτίζεται από τα μη πολικά αμινοξέα Phe202, Tyr203, Val221 και Phe252 (Σχήμα 13.).[21] Το κέντρο αυτό δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα ως στόχος για τον σχεδιασμό νέων αναστολέων.



Σχήμα 13. : Η ένωση γλυκοπυρανοζυλο-βενζιμιδαζόλιο κατά τη σύνδεσή της σε ένα νέο κέντρο της RMGb , το οποίο ονομάστηκε κέντρο σύνδεσης του βενζιμιδαζολίου. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα MolSoft ICM.

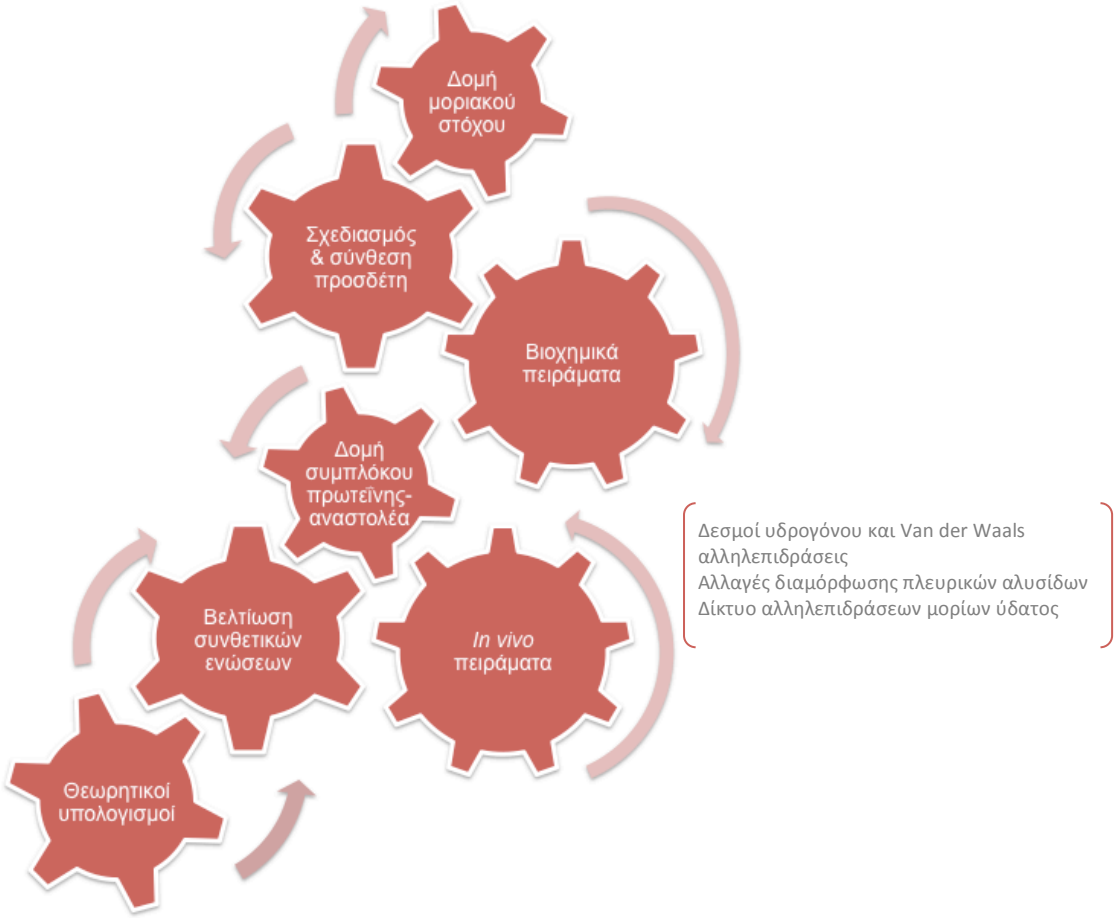
Κεφάλαιο 2
Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων

2.1 Εισαγωγή

Ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων αναπτύχθηκε δίνοντας αρχικά έμφαση στο μακρομοριακό στόχο και πιο συγκεκριμένα στοχεύοντας στα γνωστά κέντρα σύνδεσής αυτού όπως αποτυπώνονται στην τρισδιάστατη δομή του. Στόχος είναι η ταυτοποίηση φυσικών ή συνθετικών ενώσεων ως πρόδρομων για την ανάπτυξη δυνάμει φαρμάκων.

Η μέθοδος του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων περιλαμβάνει τα εξής στάδια (Σχήμα 14.) :

1. Τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής του μακρομοριακού στόχου και την ταυτοποίηση των κέντρων σύνδεσης αυτού
2. Το σχεδιασμό και τη σύνθεση ενώσεων οι οποίες φαίνεται να επηρεάζουν τη βιολογική λειτουργία του πρωτεϊνικού στόχου, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ενώσεις (lead molecules)
3. Την αξιολόγηση των προς μελέτη ενώσεων, μέσω βιοχημικών πειραμάτων (*in vitro*), ως προς τη συγγένεια τους με το μακρομοριακό στόχο
4. Τις δομικές μελέτες του συμπλόκου μακρομόριο-προσδέτης, με μεθόδους όπως η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ
5. Τη μελέτη του τρόπου σύνδεσης του προσδέτη με το μακρομοριακό στόχο
6. Το σχεδιασμό νέων βελτιωμένων παραγώγων των πρόδρομων ενώσεων, με την προσθήκη νέων λειτουργικών ομάδων και τη διεξαγωγή θεωρητικών υπολογισμών πρόσδεσης (*in silico*)
7. Τα *in vivo* πειράματα όταν εντοπιστεί ένα παράγωγο της πρόδρομης ένωσης με υψηλή συγγένεια για το μακρομοριακό στόχο.



Σχήμα 14.: Τα επιμέρους στάδια του κατευθυνόμενου-από τη δομή-σχεδιασμού φαρμάκων. [19]

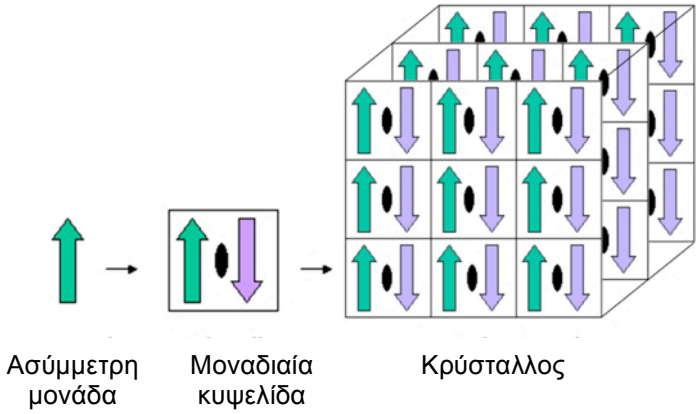
2.2 Κρυστάλλωση του μακρομοριακού στόχου

Για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής του πρωτεϊνικού στόχου με τη χρήση των ακτίνων Χ , πρέπει να αναπτυχθούν κρύσταλλοι αφού μόνο του ένα μόριο περιθλά πολύ ασθενώς την ακτινοβολία. Έτσι η περιοδική επανάληψη του ίδιου μορίου σε διατεταγμένη μορφή ενισχύει το σήμα που προκύπτει από την περίθλαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και έτσι γίνεται δυνατή η καταγραφή του.

Οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι είναι ευαίσθητοι και εύθραυστοι σε όλα τα είδη των περιβαλλοντικών μεταβολών αφού περιέχουν περίπου 50% διαλύτη, ο οποίος βρίσκεται στο χώρο μεταξύ των διατεταγμένων μορίων εντός της στοιχειώδους

κυψελίδας του κρυστάλλου. Οι αλληλεπιδράσεις οι οποίες συγκρατούν τα μόρια πρωτεΐνης είναι συνήθως ασθενείς, όπως είναι οι δεσμοί υδρογόνου, γέφυρες άλατος και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις.

Η μοναδιαία κυψελίδα αποτελεί τη δομική μονάδα του κρυστάλλου και μπορεί να αποτελείται από έναν πεπερασμένο αριθμό ασύμμετρων μονάδων (asymmetric unit) ανάλογα με το τι ορίζει η ομάδα χώρου συμμετρίας που ανήκει το κρυσταλλικό πλέγμα. (Σχήμα 15.) Έχουν ταυτοποιηθεί 230 ομάδες χώρου συμμετρίας. [22]

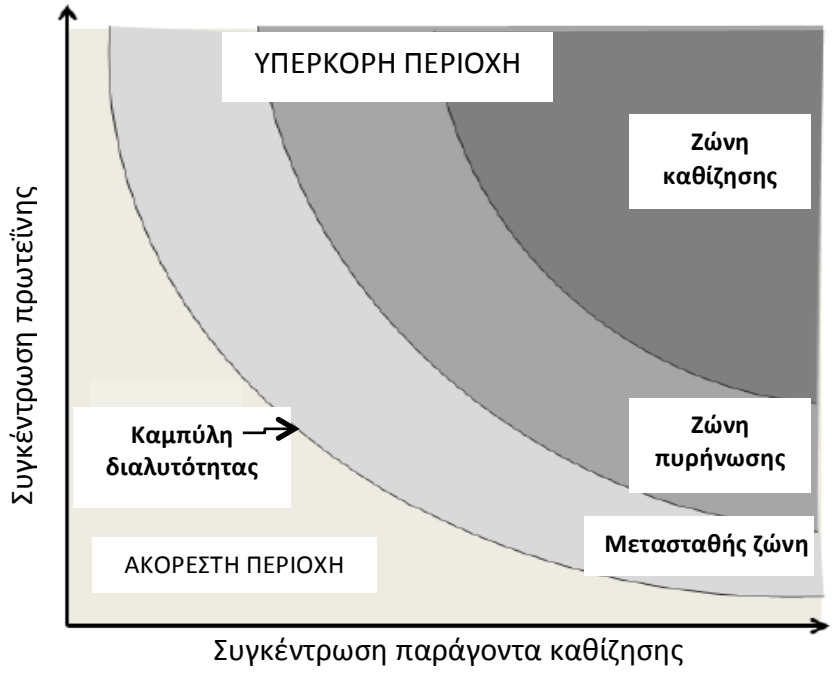


Σχήμα 15.: Ο κρύσταλλος σχηματίζεται με επανάληψη της μοναδιαίας κυψελίδας.

Γενικότερα, για να κρυσταλλωθεί μια ουσία μέσα σε ένα διάλυμα, είναι αναγκαίο να ελαττωθεί η διαλυτότητά της με ελεγχόμενο τρόπο, δηλαδή πρέπει πρώτα να έρθουν τα μόρια σε μια υπέρκορη κατάσταση. Ο υπερκορεσμός είναι η κινητήρια δύναμη για την κρυστάλλωση, και για αυτό το λόγο θεωρείται η πιο κρίσιμη παράμετρος, επηρεάζοντας το ρυθμό πυρήνωσης και ανάπτυξης των κρυστάλλων. Στο υπέρκορο διάλυμα, το οποίο αποτελεί μια θερμοδυναμικά ασταθή κατάσταση, αποσταθεροποιούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης και του διαλύτη και γι' αυτό γίνεται δυνατός ο σχηματισμός κρυστάλλων. Όταν το διάλυμα επανέλθει σε ισορροπία, τα μόρια της πρωτεΐνης καθιζάνουν, είτε με μορφή κρυστάλλων, είτε ως άμορφα ιζήματα. Ο υπερκορεσμός αυτός μπορεί να επιτευχθεί μέσω σταδιακής αφυδάτωσης του διαλύτη και μέσω αλλαγής της διαλυτότητας του βιολογικού μορίου.

Το μέγεθος και η πολυπλοκότητα των πρωτεϊνών γενικά δυσκολεύει την κρυστάλλωσή τους σε σχέση με μικρότερα μόρια και ανόργανες ουσίες. Η φύση της διαδικασίας της κρυστάλλωσης διέπεται από θερμοδυναμικούς και κινητικούς παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να την καταστήσουν εξαιρετικά μεταβλητή και κατά συνέπεια δύσκολη να ελεγχθεί. Μια μεγάλη ποικιλία παραγόντων επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης όπως είναι η θερμοκρασία, το pH, η ιοντική ισχύς και οι πολικοί ή μη πολικοί διαλύτες. Ακόμη, πολύ σημαντικό ρόλο παίζει η καθαρότητα του δείγματος καθώς έχει βρεθεί ότι η κρυστάλλωση πρωτεΐνης πολύ χαμηλής καθαρότητας δεν είναι δυνατή λόγω της παρεμπόδισης από τις προσμίξεις. Σε πολλές περιπτώσεις η επιτυχημένη κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης είναι αποτέλεσμα εμπειρικών δοκιμών και βασίζεται στη γνώση και την κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη δημιουργία κρυστάλλων. [23]

Η διαδικασία της κρυστάλλωσης περιγράφεται από το διάγραμμα των φάσεων (Σχήμα 16.) όπου παρουσιάζεται η σχέση που διέπει τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών μορίων με τη συγκέντρωση του παράγοντα καθίζησης.



Σχήμα 16: Το διάγραμμα φάσεων το οποίο υποδεικνύει την αλλαγή της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης ως προς τη συγκέντρωση του παράγοντα καθίζησης.

Η καμπύλη διαλυτότητας χωρίζει τη συγκέντρωση σε δυο τμήματα, την υπέρκορη και την ακόρεστη ζώνη. Κάθε σημείο της καμπύλης αντιστοιχεί σε μια συγκέντρωση στην οποία το διάλυμα βρίσκεται σε ισορροπία με τον παράγοντα καθίζησης. Στην περιοχή κάτω από τη καμπύλη διαλυτότητας δεν είναι δυνατή η κρυστάλλωση καθώς το διάλυμα εκεί είναι ακόρεστο. Πάνω από τη καμπύλη διαλυτότητας είναι η υπέρκορη περιοχή όπου για μια δεδομένη συγκέντρωση ενός παράγοντα καθίζησης, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι υψηλότερη από αυτήν που είχε στην κατάσταση ισορροπίας. [24]

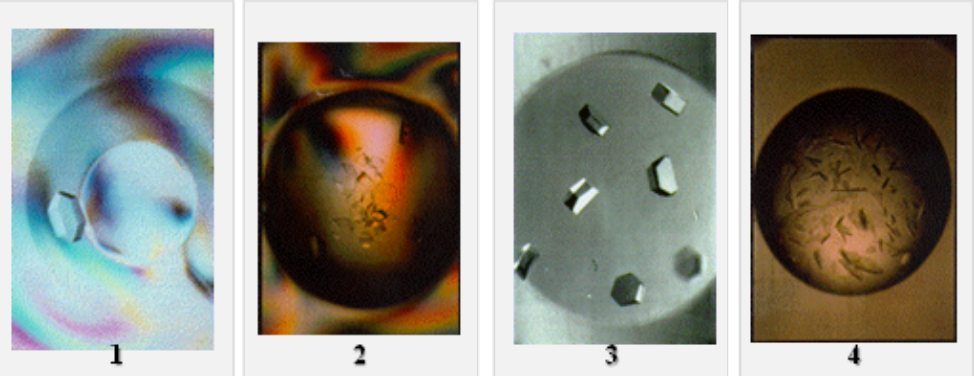
Ανάλογα με την κινητική πορεία η οποία ακολουθείται για την επίτευξη ισορροπίας ή υπερκορεσμού, αυτή η περιοχή μπορεί να διαιρεθεί όπως φαίνεται και στο διάγραμμα σε τρεις ζώνες, την *ζώνη καθίζησης*, η οποία αντιστοιχεί στην περιοχή όπου τα πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται σε περίσσεια διαχωρίζονται από το υπόλοιπο διάλυμα δημιουργώντας άμορφα ιζήματα, την *ζώνη πυρήνωσης,* η οποία περιγράφει την περιοχή όπου τα πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται σε κρυσταλλική μορφή είναι σε περίσσεια και τη *μετασταθή ζώνη*, στην οποία ένα υπέρκορο διάλυμα δε μπορεί να δημιουργήσει πυρήνες για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, εκτός αν προστεθεί ένας προσχηματισμένος κρύσταλλος σε αυτό, ο οποίος θα λειτουργήσει ως πυρήνας.

Έτσι, για να σχηματιστεί ένας κρύσταλλος και στη συνέχεια να αναπτυχθεί θα πρέπει η διαλυτότητα να φθάσει την ασταθή ζώνη πρώτα, και έπειτα να μπορεί να συνεχίσει να αναπτύσσεται είτε στην μετασταθή είτε στην ασταθή ζώνη [http://nobelprize.org].

Συγκεκριμένα, σε υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και παράγοντα καθίζησης, η πρωτεΐνη παριστάνεται ως ένα άμορφο υλικό, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι πυρήνες κρυστάλλωσης μπορεί να δημιουργήσουν κρυστάλλους περίθλασης. Σε ακόμη χαμηλότερες συγκεντρώσεις δε θα δημιουργηθούν κρύσταλλοι. Όμως αν ένας πυρήνας ή ένας κρύσταλλος τοποθετηθούν σε ένα τέτοιο διάλυμα, μπορεί να αναπτυχθεί ένας μεγάλος κρύσταλλος. Αυτή η περιοχή που ο κρύσταλλος μεγαλώνει αλλά δε λαμβάνει

χώρα πυρήνωση, ονομάζεται μετασταθής ζώνη. Σε ακόμη χαμηλότερες συγκεντρώσεις η πρωτεΐνη είναι τελείως διαλυτοποιημένη.

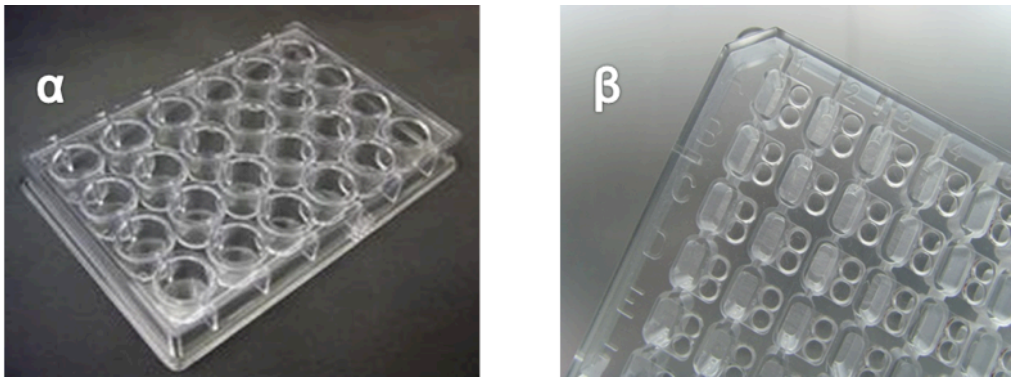
Πολύ συχνά παρατηρείται ότι οι κρύσταλλοι οι οποίοι αναπτύσσονται στη μετασταθή ζώνη έχουν καλύτερη διάταξη και περιθλούν καλύτερα την ακτινοβολία, απ' ότι οι κρύσταλλοι που αναπτύσσονται σε υψηλές συγκεντρώσεις (Εικόνα 3).



Εικόνα 3.: 1. Κρύσταλλοι που έχουν αναπτυχθεί με τη microbatch μέθοδο όπου έχει καθοριστεί το διάγραμμα των φάσεων ενός νέου απομονωμένου βακτηριακού ενζύμου. Ο εσωτερικός κύκλος που φαίνεται είναι το κάτω μέρος της μικροπλάκας ο οποίος έχει διάμετρο 1.4 nm. 2. Αυτός ο τύπος κρυστάλλων φαίνεται κυρίως με τη μέθοδο microbatch. Αυτοί οι κρύσταλλοι εμφανίζονται ξαφνικά μετά από 2 εβδομάδες και μεγαλώνουν πολύ γρήγορα. 3. Κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο διάχυσης ατμών χρησιμοποιώντας την τεχνική της μικροσποράς. Η διάμετρος του βοθρίου είναι 3mm. 4. Κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν με τη μέθοδο διάχυσης ατμών χωρίς μικροσπορά με τις ίδιες συνθήκες με την εικόνα 3.3.

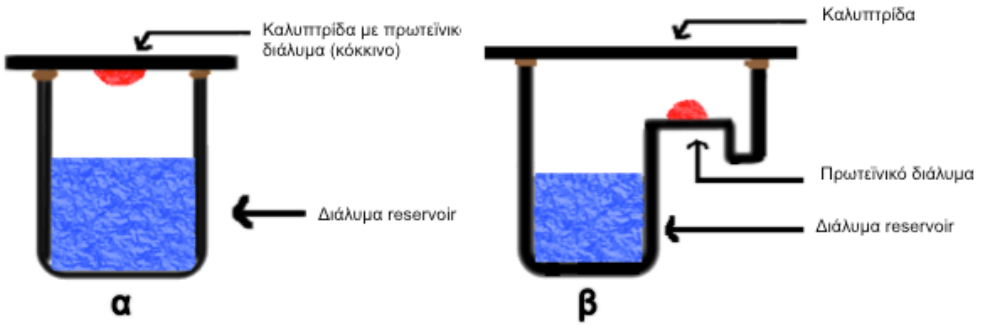
Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι κρυστάλλωσης, οι πιο συνήθεις περιλαμβάνουν τη batch μέθοδο, τη μέθοδο διάχυσης ατμών και τη μέθοδο διαπίδυσης Ειδικότερα, στην κρυστάλλωση με τη batch μέθοδο το πρωτεϊνικό διάλυμα αντιμετωπίζεται ως ένα κλειστό σύστημα και όλα τα συστατικά αναμιγνύονται στις τελικές τους συγκεντρώσεις και τοποθετούνται σε μικρούς γυάλινους σωλήνες οι οποίοι σφραγίζονται. Στη συνέχεια αφήνονται σε σταθερή θερμοκρασία για να ξεκινήσει η διαδικασία της κρυστάλλωσης. Οι πυρήνες κρυστάλλωσης που θα χρησιμοποιηθούν σε αυτή τη μέθοδο είναι είτε προσχηματισμένοι, είτε της ίδιας ή διαφορετικής πρωτεΐνης ακόμη και μικροκρύσταλλοι πορσελάνης ή άλλης ομόλογης πρωτεϊνης. [25]

Στη μέθοδο διάχυσης ατμών ανήκουν δυο από τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την κρυστάλλωση πρωτεϊνών, η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας και η μέθοδος της καθήμενης σταγόνας. Και στις δυο αυτές μεθόδους χρησιμοποιείται μικροπλάκα χωρητικότητας 24 ή 96 βοθρίων (wells) (Φωτογραφία 1.)



Φωτογραφία 1. : α. η μικροπλάκα των 24 βοθρίων β. η μικροπλάκα των 96 βοθρίων όπου κάθε βοθρίο μπορεί να φιλοξενήσει 2 σταγόνες μέγιστου όγκου 2μl η καθεμιά.

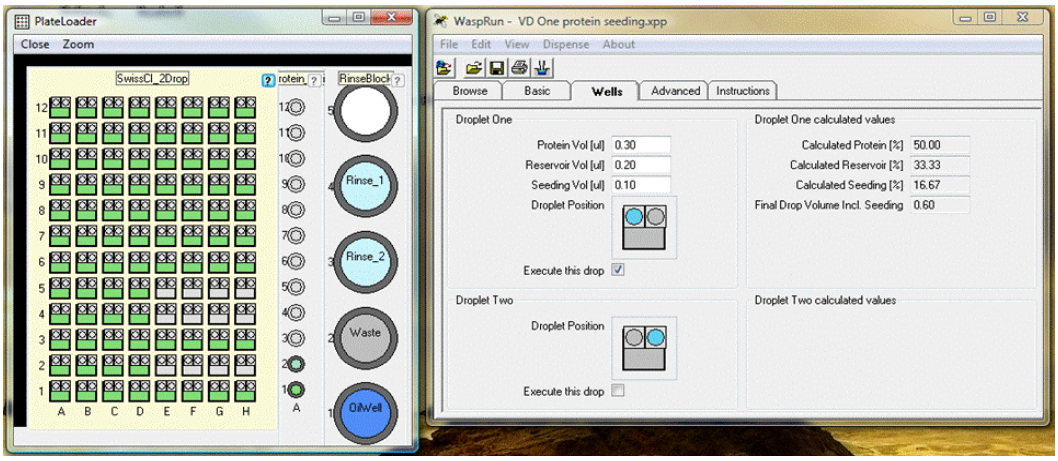
Σε κάθε βοθρίο τοποθετείται μια σταγόνα που περιέχει την καθαρή πρωτεΐνη και όλα τα υπόλοιπα συστατικά κρυστάλλωσης και εκτίθενται σε ένα αντίστοιχο διάλυμα που περιέχει τα ίδια συστατικά αλλά σε υψηλότερη συγκέντρωση. Το δεύτερο αυτό διάλυμα τοποθετείται στα βοθρία. Το νερό που βρίσκεται στη σταγόνα αρχίζει σιγά σιγά να εξατμίζεται και οι ατμοί μεταφέρονται από αυτή στο διάλυμα κρυστάλλωσης με αποτέλεσμα τη συμπύκνωση της σταγόνας και την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Η μεταφορά αυτή των ατμών συνεχίζεται ώσπου το σύστημα να έρθει σε ισορροπία. (Σχήμα 17.)



Σχήμα 17: Διάταξη κρυστάλλωσης με χρήση της μεθόδου α. κρεμάμενης σταγόνας και β.καθήμενης σταγόνας

Επειδή η δημιουργία και η ανάπτυξη κρυστάλλων απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα και σχετικά μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης, δημιουργήθηκαν αυτοματοποιήμενες συσκευές κρυστάλλωσης που επιτρέπουν ένα μεγάλο αριθμό κρυσταλλογραφικών δοκιμών (Εικόνα 4,5.). Με τη βοήθεια αυτών δύναται να δοκιμαστούν 96 διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης και μπορούν να τοποθετηθούν δύο διαφορετικές σταγόνες

Εικόνα 4.: Ρομποτική διάταξη που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του ΕΙΕ για τις αυτοματοποιημένες κρυσταλλώσεις καθώς και για τη μέθοδο μικροσποράς. (http://www.douglas.co.uk/oryxnano.htm)



Εικόνα 5. : Λογισμικό εγκατεστημένο στην ρομποτική διάταξη της Εικ. 4 για τις αυτοματοποιημένες κρυσταλλώσεις. Αριστερά υποδεικνύεται ο τρόπος επιλογής των βοθρίων που θα χρησιμοποιηθούν για εναπόθεση σταγόνων μίγματος πρωτεΐνης και διαλύματος κρυστάλλωσης και δεξιά τα δεδομένα που παρέχει ο χρήστης και φορούν στις επί μέρους συνθήκες. (http://www.douglas.co.uk/oryxnano.htm)

2.3 Βασικές Αρχές Κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ

2.3.1 Συμμετρία χώρου, κρυσταλλικές τάξεις και κρυσταλλικά συστήματα

Η μελέτη των κρυσταλλικών δομών αποκαλύπτει ότι το πλέγμα στον πραγματικό χώρο είναι μια τρισδιάστατη περιοδική επανάληψη επιπέδων διαφόρων προσανατολισμών τα οποία τέμνονται μεταξύ τους σε συγκεκριμένες ομάδες και έτσι σχηματίζουν τα επίπεδα του κρυστάλλου.
Υπάρχουν 7 συστήματα για την περιγραφή των κρυστάλλων τα οποία αποτελούν τη βάση για την ταξινόμησή τους. Αυτά τα 7 συστήματα είναι το κυβικό, το τετραγωνικό, το ορθορομβικό, το εξαγωνικό ή τριγωνικό, το ρομβοεδρικό, το μονοκλινές και το τρικλινές και σε αυτά κατατάσσεται ο κρύσταλλος ανάλογα με τις σχέσεις ανάμεσα στις σταθερές τις κυψελίδας. (Πίνακας 1.)

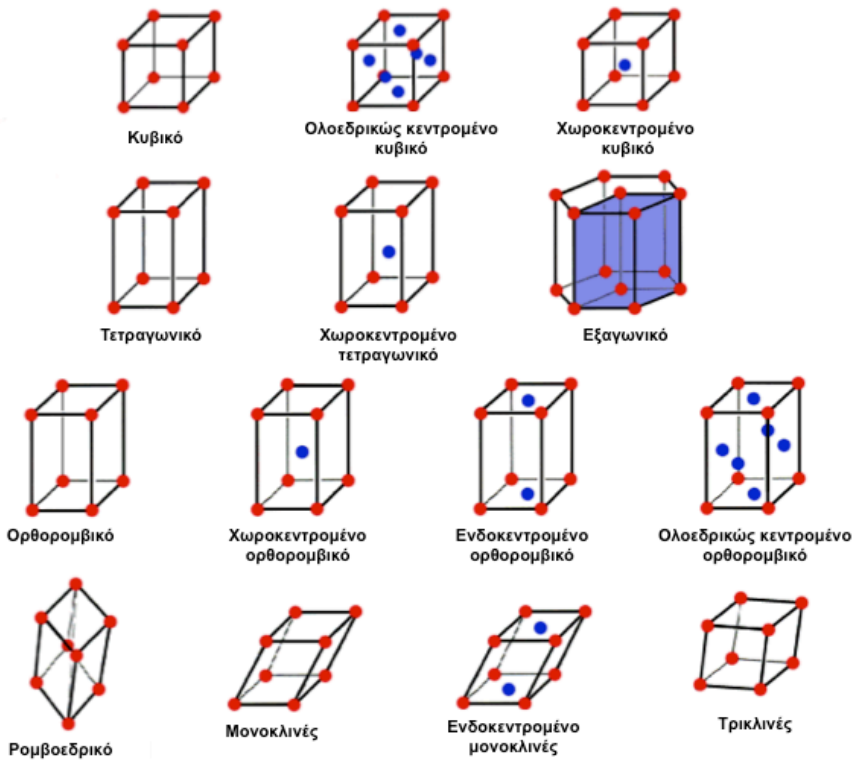
Κρυσταλλικό Σύστημα	Σχέσεις μεταξύ πλευρών	Σχέσεις μεταξύ γωνιών
Κυβικό	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90°$
Τετραγωνικό	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90°$
Ορθορομβικό	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90°$
Μονοκλινές	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = 90° \neq \gamma$
Τρικλινές	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90°$
Ρομβοεδρικό	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90°$
Εξαγωνικό ή Τριγωνικό	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90; \gamma = 120°$

Πίνακας 1. : Τα 7 κρυσταλλικά συστήματα και τα χαρακτηριστικά τους.

Υπάρχουν επίσης και 14 διαφορετικοί τύποι πλεγμάτων, Bravais Lattices, (Σχήμα 18.) τα οποία προκύπτουν από το συνδυασμό των 7 κρυσταλλικών συστημάτων με κεντροσυμμετρικό πλέγμα. Κάθε Bravais Lattice αφορά ένα συγκεκριμένο τύπο πλέγματος:

- **Πρωτογενές (Primitive, P) :** υπάρχουν σημεία του πλέγματος μόνο στις γωνίες της κυψελίδας

- **Χωροκεντρομένο (Body-centered, I) :** υπάρχει ένα επιπλέον σημείο στο κέντρο της κυψελίδας
- **Ολοεδρικώς κεντρομένο (Face-centered, F) :** υπάρχει ένα επιπλέον σημείο του πλέγματος σε κάθε πλευρά της κυψελίδας
- **Ενδοκεντρωμένο (Base-centered A, B or C) :** υπάρχει ένα επιπλέον σημείο του πλέγματος στο κέντρο ενός από τα ζεύγη πλευρών της κυψελίδας.



Σχήμα 18. : Το σύνολο των Bravais Lattices για όλα τα κρυσταλλικά συστήματα.
(http://www.seas.upenn.edu/~chem101/sschem/solidstatechem.html)

Η εσωτερική δομή των κρυστάλλων μπορεί να θεωρηθεί ως επανάληψη μιας βάσης δομικών μονάδων στα σημεία ενός γεωμετρικού πλέγματος. Γνωρίζοντας το κρυσταλλικό σύστημα και τον τύπο του πλέγματος (P, I, F, C) αυτό που απομένει είναι να αναζητηθεί η χωρική κατανομή της ηλεκτρονικής πυκνότητας, δηλαδή οι θέσεις των πραγματικών δομικών μονάδων σε σχέση με το πλέγμα Bravais. Η συνολική συμμετρία της ατομικής δομής, δηλαδή η συμμετρία του πλέγματος μαζί με τη συμμετρία διάταξης των ατόμων στην ίδια βάση λέγεται ομάδα χώρου συμμετρίας (space group) και μελετάται με τη θεωρία των ομάδων συμμετρίας.

Κάθε μόριο αποτελείται από ένα συνδυασμό συμμετρίας αντικειμένου ο οποίος περιγράφει τη συνολική συμμετρία του μορίου. Αυτός ο συνδυασμός λέγεται ομάδα χώρου σημείου (point group) και συνολικά υπάρχουν 32 ομάδες συμμετρίας σημείου. Οι ομάδες χώρου συμμετρίας δημιουργούνται από τους συνδυασμούς των 32 αυτών ομάδων σημείου. (Πίνακας 2.)

Οι απλούστεροι πίνακες συμμετρίας (symmetry operations) που απαιτούνται για να περιγράψουν τη συμμετρία των μοναδιαίων κυψελίδων είναι: (α) η μεταφορά, (β) η περιστροφή γύρω από έναν άξονα (στοιχείο: άξονας περιστροφής) και (γ) η ανάκλαση (στοιχείο: επίπεδο-καθρέφτης). Συνδυασμοί αυτών των πινάκων παράγουν πολυπλοκότερα στοιχεία συμμετρίας, συμπεριλαμβανομένων των κέντρων συμμετρίας , τους κοχλιοτούς άξονες και κεκλιμένα επίπεδα.

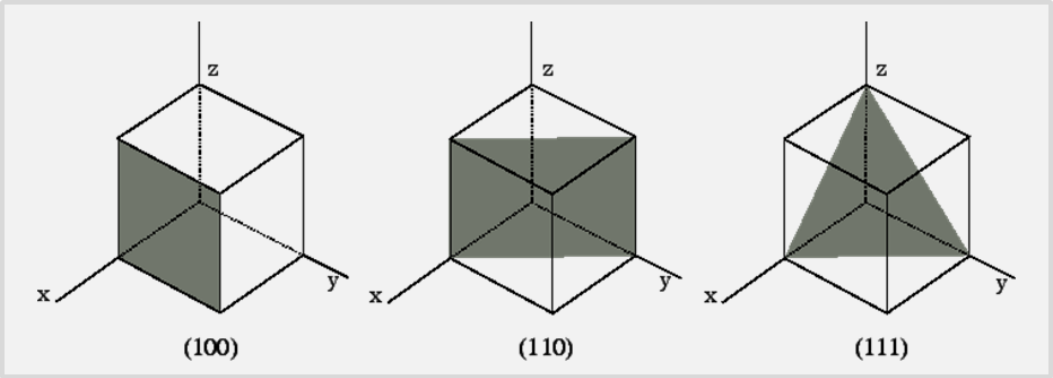
Κρυσταλλικό Σύστημα	32 Κρυσταλλογραφικά Pont Groups						
Τρικλινές	**1**	-1					
Μονοκλινές	**2**	***m***	2/*m*				
Ορθορομβικό	222	***mm2***	*mmm*				
Τετράγωνο	**4**	-4	4/*m*	422	***4mm***	-42*m*	4/*mmm*
Τριγωνικό	**3**	-3	32	***3m***	-3*m*		
Εξαγωνικό	**6**	-6	6/*m*	622	***6mm***	-62*m*	6/*mmm*
Κυβικό	23	*m-3*	432	-43*m*	*m-3m*		

Πίνακας 2.: Ο πίνακας με τις 32 ομάδες χώρου συμμετρίας. [22]

Η κάθε ομάδα χώρου συμμετρίας αντιπροσωπεύεται με ένα σύνολο συμβόλων στο οποίο αναγνωρίζεται ο τύπος του πλέγματος (Bravais Lattice) καθώς και τα στοιχεία συμμετρίας που είναι επιτρεπτά. Όπως βλέπουμε και στον πίνακα 2, υπάρχουν διάφοροι συμβολισμοί για τη συμμετρία. Οι ομάδες χώρου σημείου που είναι με κόκκινο χρώμα κατέχουν κέντρο αναστροφής και ονομάζονται κεντροσυμμετρικές ενώ αυτές που είναι με μπλε έχουν μόνο άξονα περιστροφής και ονομάζονται εναντιομορφικές. Αυτά που είναι με έντονο αναφέρονται στις πολικές.

2.3.2 Παράμετροι ατομικών θέσεων

Μια ομάδα παράλληλων κρυσταλλικών επιπέδων σε ένα κρύσταλλο ή πλέγμα συμβολίζεται με μια ομάδα ακέραιων αριθμών, οι οποίες αναγράφονται μέσα σε μια παρένθεση, χωρίς κόμματα, (hkl) και ονομάζονται δείκτες Miller. Η σταθερά h δίνει τον αριθμό των επιπέδων στον άξονα x ή αντίστοιχα, τον αριθμό των τμημάτων στα οποία τέμνεται η a πλευρά της μοναδιαίας κυψελίδας από μια οικογένεια επιπέδων. Αντίστοιχα, οι σταθερές k και ℓ δίνουν τον αριθμό των επιπέδων στους άξονες y και z. Κατά κανόνα, οι σταθερές Miller ορίζουν την κατεύθυνση και τον προσανατολισμό των επιπέδων μέσα σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα. Μπορεί να αναφέρονται σε μια συγκεκριμένη έδρα του κρυστάλλου, μια κατεύθυνση, ένα σύνολο εδρών ή ένα σύνολο κατευθύνσεων (Σχήμα 19.).



Σχήμα 19. : Απεικόνιση των επιπέδων (100), (110) και (111) στο κυβικό κρυσταλλικό σύστημα.
(http://www.iue.tuwien.ac.at/phd/ungersboeck/node24.html)

2.3.3 Περίθλαση ακτίνων Χ

Το 1912 οι W. Friedrich, P. Knipping και M. Laue διεξήγαγαν το πρώτο πείραμα κρυσταλλογραφίας με τη χρήση ακτίνων Χ όπου ακόμη δεν είχε αποσαφηνιστεί η φύση της συγκεκριμένης ακτινοβολίας και κατάφεραν να πάρουν το πρώτο περιθλασίγραμμα (diffraction pattern) από ένα μονοκρύσταλλο θειϊκού χαλκού και θειώδους ψευδαργύρου. Ο Laue στη συνέχεια μελέτησε το φαινόμενο της περίθλασης της ακτινοβολίας από έναν κρύσταλλο και αποκάλυψε την κυματική φύση των ακτίνων Χ. Σύμφωνα με αυτήν του την ερμηνεία, αν οι ακτίνες Χ ήταν κυματικής φύσης, τότε το μήκος

κύματος αυτών θα ήταν ίδιας τάξης μεγέθους με την απόσταση των ατόμων στο κρυσταλλικό πλέγμα και τα άτομα που θα βρίσκονταν σε αυτό θα έδιναν περίθλαση. Για αυτήν του την ανακάλυψη ο Laue τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ το 1914. [26]

Βασισμένος στις παρατηρήσεις του Laue, ο L. Bragg διατύπωσε το νόμο περίθλασης ακτίνων Χ. Σύμφωνα με το νόμο του Bragg ο κρύσταλλος αποτελείται από πολλά επίπεδα (επίπεδα του Bragg) τα οποία ανακλούν τις ακτίνες Χ. Αν τα εσωτερικά επίπεδα συμμετρίας του κρυσταλλικού πλέγματος ορίζονται από τους δείκτες Miller (hkl), και η απόσταση αυτών είναι d τότε η προσπίπτουσα υπό γωνία θ μονοχρωματική ακτινοβολία περιθλάται με την ίδια γωνία σύμφωνα με τη σχέση (Σχήμα 20.):

$$\mathbf{2d_H \sin\theta = n\lambda}$$

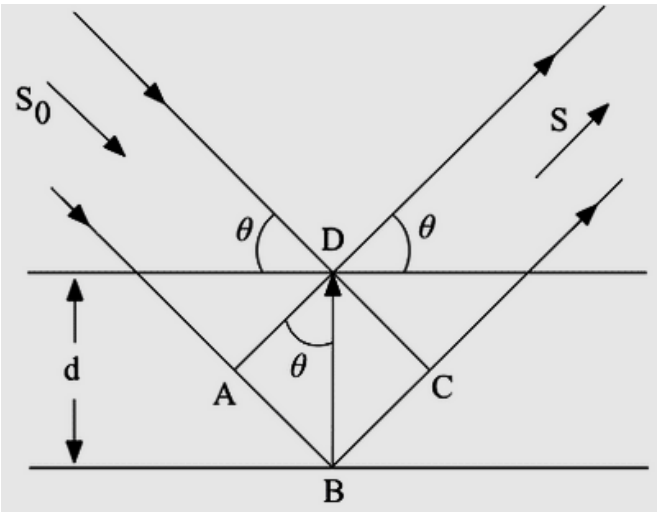
Όπου λ το μήκος της ακτινοβολίας

Αυτή η σχέση αποτελεί το νόμο του Bragg και μπορεί επίσης να γραφεί:

$$\mathbf{2\,(d_H/n)\sin\theta=\lambda}$$

ή

$$\mathbf{2d_{H'}\sin\theta=\lambda} \quad \text{όπου } \mathbf{H'=nh+nk+nl}$$

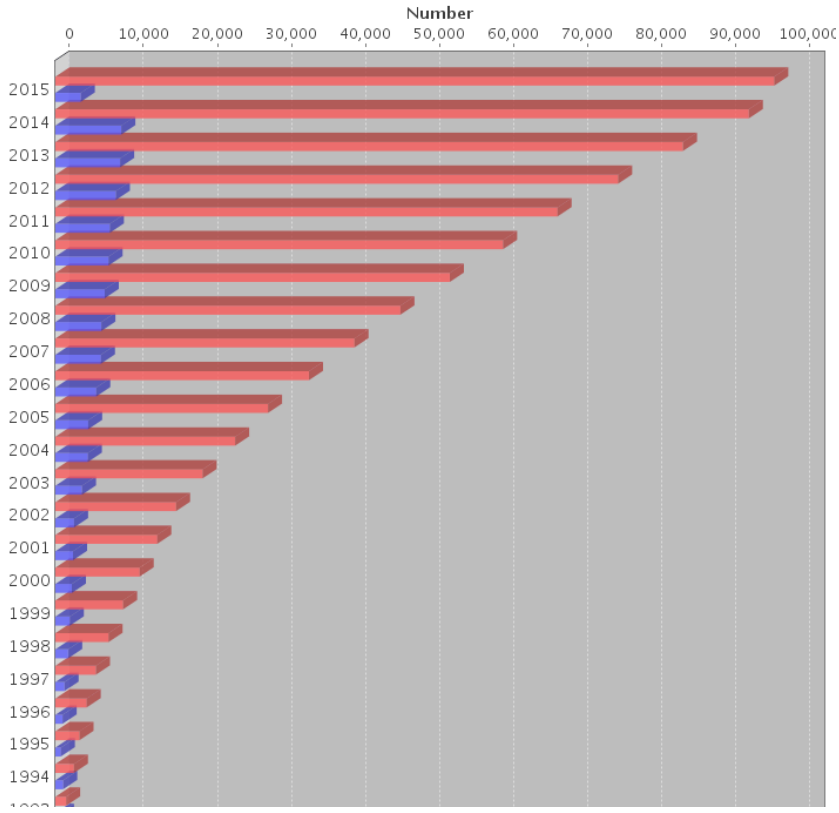


Σχήμα 20. : Ο τρόπος περίθλασης των ακτίνων Χ σε δυο διαδοχικά κρυσταλλικά επίπεδα, σύμφωνα με το νόμο του Bragg.

Για τη διατύπωση αυτής της σχέσης ο Laurence Bragg το 1915 πήρε το βραβείο Νόμπελ Φυσικής μαζί με τον πατέρα του. [27] Το σύνολο των επιπέδων που ορίζονται από τους δείκτες Miller (hkl) ονομάζεται αντίστροφο πλέγμα (reciprocal lattice) και συνδέεται με το πραγματικό ευθύ πλέγμα με μετασχηματισμό Fourier (κεφάλαιο 2.2.5).

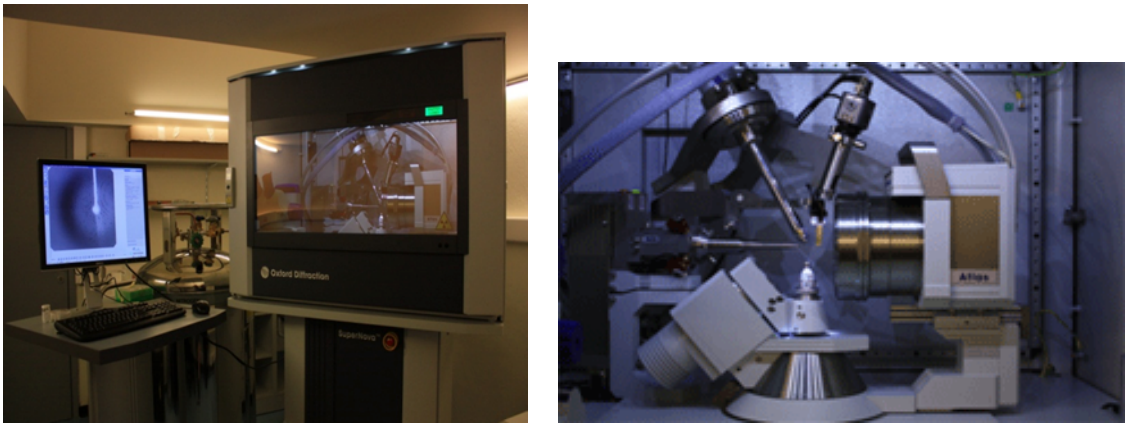
2.3.4 Πηγές ακτίνων Χ

Το 1957 μελετήθηκε και αναλύθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ το πρώτο πρωτεϊνικό μόριο και αυτό ήταν η μυοσφαιρίνη [28] και σειρά είχε το 1960 η αιμοσφαιρίνη [29] όπου ανακαλύφθηκε ο τρόπος μεταφοράς του οξυγόνου. Το πρώτο ένζυμο που μελετήθηκε κρυσταλλογραφικά ήταν η λυσοζύμη το 1965. Από τότε και μέχρι σήμερα ένας πολύ μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών έχουν αναλυθεί και έχουν κατατεθεί στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων, Protein Data Bank (PDB) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6.: Το διάγραμμα απεικονίζει το πλήθος των πρωτεϊνικών δομών που κατατίθενται στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων (PDB) (με μπλέ ετησίως, με κόκκινο συνολικά) και για τον προσδιορισμό τους έχει χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

Οι ακτίνες Χ παράγονται, όταν ηλεκτρόνια μεγάλης ταχύτητας, που έχουν επιταχυνθεί από υψηλή τάση, προσπίπτουν σε μεταλλικό στόχο. Όταν τα ηλεκτρόνια προσπίπτουν στο στόχο, προσδίδουν ενέργεια στα άτομα αυτού, η οποία στη συνέχεια διεγείρει τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στιβάδων των ατόμων. Έτσι τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε υψηλότερα ενεργειακά στιβάδες καταλαμβάνουν κατά το στάδιο της αποδιέγερσης χαμηλότερες ενεργειακά θέσεις, παράγοντας ακτινοβολία ακτίνων Χ. Τέτοιας κατηγορίας γεννήτριες ακτίνων Χ– συμβατικές πηγές, παράγουν ακτινοβολία μήκους 1.542 Å και συνήθως είναι εγκατεστημένες σε ερευνητικά κέντρα/ εργαστήρια (Φωτογραφία 2).



Φωτογραφία 2. : Γεννήτρια ακτίνων Χ στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας (ΙΒΦΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών

Η συγχροτρονική ακτινοβολία, είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που εκπέμπεται από ηλεκτρόνια ή ποζιτρόνια τα οποία κινούνται σε έναν μεγάλης κλίμακας κυκλικό επιταχυντή σε καμπύλη τροχιά και παράγει υψηλότερης ενέργειας ακτίνες Χ. [30] Η επιτάχυνση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μαγνητών και καθρεπτών κατά μήκος του επιταχυντή, οι οποίοι διασφαλίζουν παράλληλα την κυκλική τροχιά της δέσμης των ακτίνων και τη λαμπρότητα αυτών. [31] Τα χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας σύγχροτρον είναι τέτοια που την κάνουν ιδανική για πειράματα κρυσταλλογραφίας μακρομορίων καθώς τα δεδομένα που λαμβάνονται είναι υψηλής ποιότητας. (φωτογραφία 3.)

Φωτογραφία 3. : Τμήμα του κεντρικού δακτυλίου αποθήκευσης ήδη επιταχυμένων ηλεκτρονίων στην Ευρωπαϊκή εγκατάσταση συγχροτρονικής ακτινοβολίας, Diamond Light Source (DLS)- Οξφόρδη, Αγγλία.

Ενδεικτικά αναφέρονται τα εξης χαρακτηριστικά [32]:

- μεγάλο εύρος μήκους κύματος, που καλύπτει από μικροκύματα μέχρι «σκληρές» ακτίνες-Χ, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η επιλογή του μήκους κύματος από τους χειριστές του οργάνου ανάλογα με το πείραμα που διεξάγουν.
- υψηλή ροή φωτονίων, η οποία επιτρέπει την διεξαγωγή των πειραμάτων σε μικρούς χρόνους, δυνατότητα συλλογής δεδομένων με υψηλή πληρότητα πριν ο κρύσταλλος καταστραφεί από το σχηματισμό ελευθέρων ριζών.
- δυνατότητα χρήσης κρυστάλλων με μικρή απόδοση περίθλασης.
- υψηλής έντασης προσπίπτουσα και περιθλώμενη ακτινοβολία- η δέσμη των φωτονίων είναι σε μεγάλο βαθμό ευθυγραμμισμένη.
- υψηλή πολωσιμότητα
- μεγάλη γωνιακή και ενεργειακή ευκρίνεια

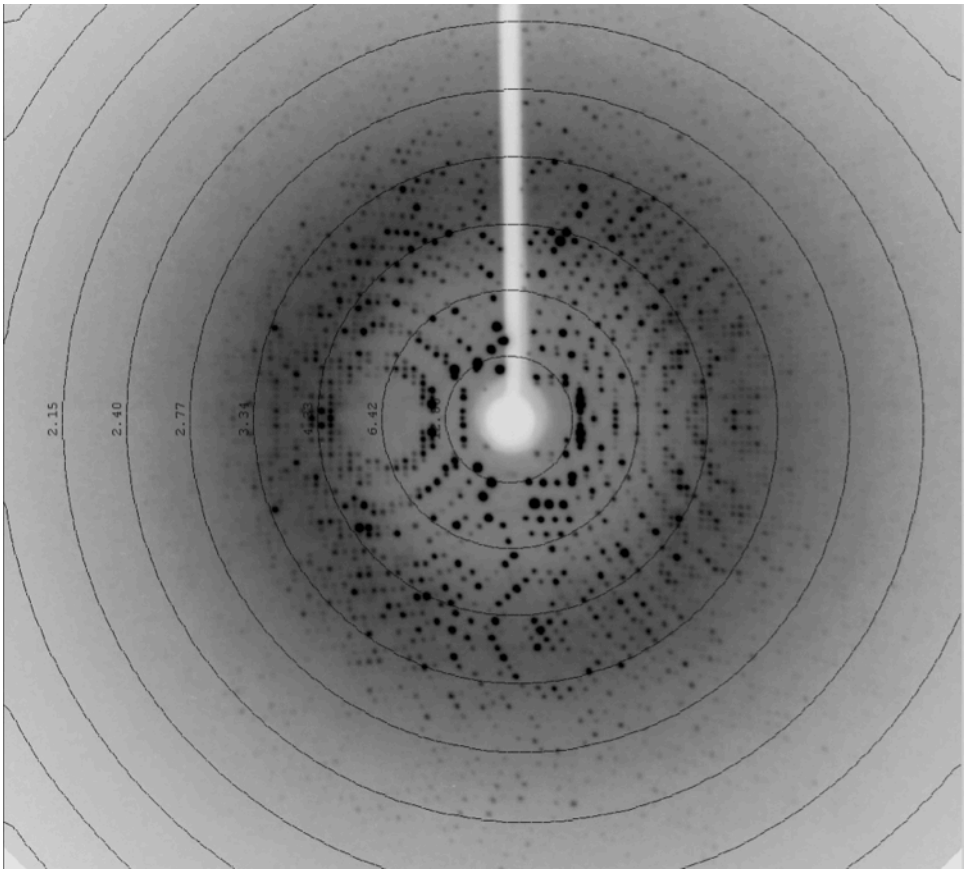
Στο σύγχροτρον, για την παραγωγή της δέσμης ακτινοβολίας αρχικά χρησιμοποιείται ένας προεπιταχυντής (booster ring) ο οποίος αυξάνει την ενέργεια των ηλεκτρονιών λόγω της μεγάλης κυκλικής επιτάχυνσης πριν αυτά μεταφερθούν σε ένα δεύτερο δακτύλιο, τον δακτύλιο αποθήκευσης (storage ring). Εκεί, η ταχύτητα της δέσμης διατηρείται σε ικανοποιητικά επίπεδα για

κάποιες ώρες ενώ παράλληλα σε τακτά χρονικά διαστήματα ανατροφοδοτείται από τον προεπιταχυντή. Στο παρελθόν η ανατροφοδότηση πραγματοποιείτο τουλάχιστον τρεις φορές την ημέρα, ενώ σήμερα μια φορά είναι αρκετή και μάλιστα χωρίς να διακόπτεται στο μεγάλο δακτύλιο η ροή.

Η διακριτική ικανότητα (ευκρίνεια) στην οποία μπορεί να προσδιοριστεί η τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης εξαρτάται και από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας (κάθε σταθμός διαθέτει συγκεκριμένο μήκος κύματος) και από τη γεωμετρία της διάταξης που χρησιμοποιείται κατά την έκθεση του δείγματος Πρέπει εδώ να επισημανθεί πώς σύμφωνα με τη σφαίρα του Ewald, υπάρχει μια περιοχή, κατά την περιστροφή του κρυστάλλου, η οποία δεν μπορεί να ακτινοβοληθεί. Γι' αυτό η διάταξη πολλές φορές επιβάλλει περιορισμούς στη συλλογή συγκεκριμένων περιθλάσεων, συνήθως σε συμβατικές πηγές ακτίνων Χ. [31]

2.3.5 Προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής μακρομορίων

Κάθε άτομο στον κρύσταλλο που ακτινοβολείται περιθλά την προσπίπτουσα ακτινοβολία εκπέμποντας ενέργεια, η οποία καταγράφεται από τον ανιχνευτή με τη μορφή κηλίδων το λεγόμενο περιθλασίγραμμα (Φωτογραφία 4.). Παλαιότερα που δεν υπήρχε η δυνατότητα ηλεκτρονικού υπολογιστή, το περιθλασίγραμμα αποτυπωνόταν σε φωτογραφικό φιλμ. Κάθε κηλίδα του περιθλασιγράμματος χαρακτηρίζεται από τους δείκτες Miller (hkl) όπου η γεωμετρική τους σχέση αποκαλύπτει την αντίστοιχη σχέση που έχουν τα άτομα στον κρύσταλλο, με μετασχηματισμό Fourier, υποδεικνύοντας τη θέση τους. Με αυτόν τρόπο μπορούμε να προσδιορίσουμε ακόμη και με τη συλλογή ενός μόνο περιθλασάγραμματος το κρυσταλλικό πλέγμα στο οποίο αναπτύχθηκε ο κρύσταλλος καθώς επίσης και τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας. Η ομάδα χώρου συμμετρίας ταυτοπείται από την παρατήρηση των συστηματικών περιθλάσεων Bragg όπου η παρουσία ή η απουσία αυτών αποτελεί ένδειξη για την παρουσία ή μη θεμελιωδών μοναδιαίων κυψελίδων ή στοιχείων συμμετρίας χώρου. Η ένταση των κηλίδων λαμβάνεται και αυτή υπόψη για το μετασχηματισμό Fourier καθώς είναι ανάλογη του τετραγώνου του πλάτους της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας.



Φωτογραφία 4 : Περιθλασίγραμμα ακτίνων Χ της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν αθροίζονται με τη μορφή ολοκληρώματος και ακολουθεί η μετατροπή των h,k,l σε x,y,z μέσω του μετασχηματισμού Fourier.

Μετασχηματισμός Fourier:

$$F(\underline{r}^*) = \int_s \rho(r)\, \exp(2\pi i \underline{r}^* \cdot \underline{r})\, \underline{dr}$$

$$\rho(\underline{r}) = \int_{s^*} F(r^*)\, \exp(-2\pi i \underline{r}^* \cdot \underline{r})\, \underline{dr}^*$$

το * αφορά στο αντίστροφο πλέγμα,

και το ( ) (metric matrix) αφορά σε όλες τις μετρήσεις

Ο δομικός παράγοντας (structure factor) F_H είναι το σύνολο όλων των περιθλάσεων κάθε ατόμου στη μοναδιαία κυψελίδα και εξαρτάται από τον αριθμό των ατόμων που βρίσκονται στη μοναδιαία κυψελίδα.
Ο δομικός παράγοντας ορίζεται από τη σχέση:

$$F_H = \sum_{j=1}^{N} Fj \exp(2\pi i r_H^* \cdot r_j)$$

$$= \sum_{j=1}^{N} fj \exp(2\pi i \bar{H} X_j) = A_H + iB_H \quad *$$

όπου $A_H = \sum_{j=1}^{N} fj \cos 2\pi \bar{H} X_j$

$B_H = \sum_{j=1}^{N} fj \sin 2\pi \bar{H} X_j$

$F_H = |F_H| \exp(i\varphi_H)$, με $\varphi_H = \alpha\tan(B_H/A_H)$

$*$ $(h\alpha^* + kb^* + lc^*)(xja + y_jb + z_jc) = hx_j + ky_j + lz_j = \bar{H}x_j$

- το r_H^* είναι το διάνυσμα στο οποίο θέλουμε να υπολογίσουμε το δομικό παράγοντα,
- το f_j υπολογίζεται από συγκεκριμένο sinθ/λ,
- το $\bar{H}$ είναι τα h,k,l για τα οποία θέλουμε να υπολογίσουμε τη θέση των ατόμων,
- το X_j είναι η ατομική θέση του ατόμου j (x,y,z κλασματικές συντεταγμένες)

Ο δομικός παράγοντας περιγράφεται ως κυματοσυνάρτηση και για το σαφή προσδιορισμό του απαιτείται εκτός από το πλάτος του, και η φάση του κύματος. [31]

Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της φάσης (phase problem) [33] στον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής ενός πρωτεϊνικού μορίου-στόχου, χρησιμοποιούνται μέθοδοι που περιλαμβάνουν την ισόμορφη μοριακή αντικατάσταση ή πολλαπλής μορφής αντικατάσταση, συνήθως μέσω ανώμαλης σκέδασης. Οι μέθοδοι αυτές χωρίζονται σε άμεσες και έμμεσες. Οι έμμεσες οδηγούν στην επίλυση της δομής βασιζόμενες σε κάποιες γνωστές

φάσεις, ενώ οι άμεσες ξεκινούν με όλες τις φάσεις άγνωστες. Μια επιτυχής μέθοδος επίλυσης είναι η χρήση της πολυχρωματικής ακτινοβολίας (*Multi-wavelength Anomalous Diffraction, MAD).* Σε αυτήν την τεχνική, τα ηλεκτρόνια εσωτερικών στοιβάδων των ατόμων απορροφούν ακτίνες-Χ συγκεκριμένου μήκους κύματος και επανεκπέμπουν τις ακτίνες Χ μετά από μια μικρή χρονική καθυστέρηση, επάγοντας μια αλλαγή στις φάσεις όλων των ανακλάσεων, φαινόμενο γνωστό ως ανώμαλη διασπορά (anomalous dispersion). Ανάλυση των μεταβολών που προκύπτουν στις φάσεις των ανακλάσεων έχει ως αποτέλεσμα την επίλυσή τους. [33]

Άλλες πειραματικές μέθοδοι επίλυσης του προβλήματος φάσης περιλαμβάνουν την *Πολλαπλή Ισόμορφη Αντικατάσταση (Multiple Isomorphus Replacement, MIR)*, όπου «βαρέα» άτομα (μεγάλος πλήθος e^-) εμφανίζονται στην κρυσταλλική δομή (είτε γιατί συμπεριλήφθησαν στην προετοιμασία του δείγματος είτε γιατι ο κρύσταλλος του πρωτεϊνικού δείγματος εμβαπτίστηκε σε διάλυμα που τα περιείχε) και η *Ανώμαλη Διασπορά ενός Μήκους Κύματος (Single Wavelength Anomalous Dispersion, SAD)*. Οι τιμές των φάσεων μπορούν επίσης να υπολογιστούν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της *Μοριακής Αντικατάστασης (molecular replacement),* όπου οι φάσεις ενός παρόμοιου μορίου (π.χ. πρωτεΐνες με μεγάλη ομοιότητα στις αμινοξικές τους αλληλουχίες) συνδυάζονται με τις πειραματικά καθοριζόμενες τιμές.

Μέσω της άμεσης μεθόδου, οι κρυσταλλογραφικές φάσεις προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας μια τριπλή σχέση (μια τριάδα ανακλάσεων στις οποίες η ένταση και η φάση της μιας μπορούν να εξηγηθούν σε σχέση με τις άλλες δύο), ενώ στην έμμεση μέθοδο, χρησιμοποιείται η *συνάρτηση Patterson*, μέσω της οποίας καταρχήν υπολογίζονται οι θέσεις των βαρέων ατόμων που έχουν εισαχθεί στη δομή και με βάση αυτές χαρακτηρίζονται και τα υπόλοιπα.

2.3.6 Μελέτη ενώσεων ως σύμπλοκα με τον πρωτεϊνικό στόχο

Γνωστής της τρισδιάστατης δομής του πρωτεϊνικού στόχου μπορούν να προσδιοριστούν τα (ή το) κέντρα (-ο) σύνδεσης αυτού για τον σχεδιασμό μικρομοριακών ή βιοδραστικών ενώσεων οι οποίες είναι είτε ανάλογα φυσικού

υποστρώματος (αν πρόκειται για ένζυμο), είτε δρουν σαν τροποποιητές, ενεργοποιητές, αναστολείς, αλλοστερικοί προσδέτες, και τροποποιούν τη λειτουργία του ενζύμου.

Προκειμένου να αποφανθούμε για τον τρόπο δράσης του προσδέτη σε έναν υποδοχέα, πρέπει να πραγματοποιηθεί μια σειρά πειραματικών διαδικασιών, όπως είναι η φθορισμομετρία, η επισήμανση ατόμων με ραδιενεργές ενώσεις είτε μέσω κινητικών πειραμάτων. Όσον αφορά στα ένζυμα, η πιο συνηθισμένη μέθοδος αξιολόγησης του τρόπου δράσης του προσδέτη, είναι η βιοχημική προσέγγιση των παραμέτρων IC_{50} και του K_i , οι οποίες υπολογίζονται σε διάφορες συγκεντρώσεις της ένωσης.

Αφού παρατηρηθεί ο προσδέτης, ακολουθεί ο σχηματισμός του συμπλόκου της μικρομοριακής ένωσης με τον πρωτεϊνικό στόχο. Αυτό γίνεται είτε με τη μέθοδο συγκρυστάλλωσης είτε με τη μέθοδο εμποτισμού των πρωτεϊνικών κρυστάλλων σε διάλυμα της ένωσης. Η διαδικασία εμποτισμού απαιτεί λίγα λεπτά ή και μέρες για να πραγματοποιηθεί. Για να εξετασθεί η σύνδεση ή μη του προσδέτη με τον κρυστάλλο, αυτός ακτινοβολείται. Ακολουθεί υπολογισμός του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Συγκεκριμένα, λαμβάνοντας υπόψιν τους δομικούς παράγοντες F_{calc} και F_{obs} όπου το F_{calc} προσδιορίζεται με βάση της φάσεις του αρχικού μοντέλου, και το F_{obs} βασίζεται στα πειραματικά δεδομένα περίθλασης, υπολογίζονται οι χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o$-F_c και F_o-F_c. Η πρόσδεση μιας ένωσης υποδευκνύεται με πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα που παρουσιάζεται και στους δυο χάρτες. Στη συνέχεια με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού αναλύεται η κρυσταλλική δομή και λαμβάνονται όλες οι απαραίτητες πληροφορίες για τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων της ένωσης με τα αμινοξέα που συνθέτουν το κέντρο σύνδεσης. Αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals που σχηματίζει ο προσδέτης με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης, καθώς και με τα μόρια νερού που βρίσκονται στο κέντρο σύνδεσης. Ακόμη, αξιολογείται συνολικά ο τρόπος σύνδεσης της μακρομοριακής ένωσης λαμβάνοντας υπόψη τη συγγένεια του προσδέτη για το ένζυμο, τη συνεισφορά του διαλύτη, την προσβάσιμη επιφάνεια και τον όγκο του μελετούμενου κέντρου. Συγκεκριμένα, τα μόρια του νερού μπορούν να

υποδείξουν θέσεις που μπορούν να προστεθούν νέες λειτουργικές ομάδες στην πρόδρομο ένωση, με σκοπό τη σύνθεση νέων παραγώγων πιο βελτιωμένων.

Η πληροφορία που παράγεται από την ανάλυση της δομής των συμπλόκων αξιολογείται και αξιοποιείται για το σχεδιασμό νέων πιο βελτιωμένων παραγώγων σε συνεργασία με τους συνθετικούς χημικούς. Γίνεται η αξιολόγηση αυτών *in silico*, με μοριακούς υπολογισμούς όπου υποδεικνύονται οι πιθανές ενεργειακές καταστάσεις αλλά και η χαμηλότερη ενεργειακά διαμόρφωση που μπορεί να λάβει ένας προσδέτης. Αφού βρεθούν αυτοί οι βελτιωμένοι προσδέτες, ακολουθεί η σύνθεσή τους και στη συνέχεια επαναλαμβάνονται τα παραπάνω κρυσταλλογραφικά πειράματα, προκειμένου να αξιολογήσουμε τον προσδέτη. Οι ισχυρότεροι προσδέτες που θα βρεθούν εξετάζονται ως δυνάμει φάρμακα σε φυσιολογικά πειράματα που βασίζονται σε κύτταρα ή σε μοντέλα ζώων.

Κεφάλαιο 3ο
Πειραματικό Μέρος

Υλικά που απαιτούνται

- 2-3 κουνέλια
- Μαχαίρι
- Ξύλινη βάση
- Κρεατομηχανή
- Δοχεία 20 lt
- Γάζα
- Υαλοβάμβακας
- Μεγάλα σωληνάρια φυγοκέντρησης
- Αντλία κενού Buchner
- Κυκλικά φίλτρα (18cm)
- Σακουλάκια διαπίδυσης (μεγάλα)
- Μικρά σωληνάρια φυγοκέντρησης

Διαλύματα που απαιτούνται

- CH_3COOH 1N
- Κεκορεσμένο $KHCO_3$
- 90% $(NH_3)_2SO_4$ (κορεσμός 41%)
- Tris 2M
- Tris 0.001M pH 7.5
- 2-μερκαπτοαιθανόλη 0.3 M (ουδέτερο), pH 7.0
- EDTA 0.1M, pH 7.0
- AMP 0.1M, pH 7.0
- $(CH_3COO)_2Mg$ 1M, pH 7.0
- BES 10mM
- NaN_3 0.02%
- *β*-GP 50mM
- Na_2CO_3
- Απιοντισμένο νερό

Εργαστηριακά όργανα

- Φυγόκεντρος KUBOTA, μεγάλη κεφαλή GS-3 και μικρή κεφαλή SS-34
- Πεχάμετρο Metrohm 744
- Φασματοφωτόμετρο UV-Visible Spectrophotometer (CARY)
- Πιπέτες Gilson των 10μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL και 1000 μL
- Αναλυτικός ζυγός
- Vortex Autovortex Mixer SA2 Stuart Scientific
- Υδρόλουτρο

3.1 Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* από σκελετικούς μύες κουνελιού

Για την απομόνωση της φωσφορυλάσης *b* του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού ακολουθείται η τροποποιημένη μέθοδος Fisher & Krebs (Meth. In Enzymology Vol. V. 369-373, 1962) [34] κατά την οποία σε όλα τα στάδια καθαρισμού, ως αναγωγικός παράγοντας, αντί L- κυστεΐνης χρησιμοποιείται β-μερκαπτοαιθανόλη.

Συγκριμένα, η διαδικασία απομόνωσης της RMGP*b* διαρκεί συνολικά πέντε ημέρες και είναι η εξής:

Η **πρώτη μέρα** περιλαμβάνει:

- **παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος**: από 4 κουνέλια παραλαμβάνονται ο μυϊκός ιστός από τα πόδια και τη σπονδυλική στήλη και αφού αλέθονται σε κρεατομηχανή και ζυγίζονται πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με νερό, οι δυο πρώτες με τη χρήση ίσου όγκου νερού με τον πρωτεϊνικό όγκο και η τρίτη με τη χρήση μισού όγκου νερού σε σχέση με τον πρωτεϊνικό. Και οι τρεις αυτές εκχυλίσεις μαζί δεν πρέπει να ξεπερνούν τα 30 λεπτά. Στη συνέχεια το εκχύλισμα διηθείται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων και λιπαρών ουσιών.
- **Καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον**: Το pH του διηθήματος ρυθμίζεται στο 5.1 - 5.2 με την προσθήκη 1N CH_3COOH

και αφήνεται στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, με φυγοκέντρηση στα 5117 g στους 0-4 ^{o}C για 30 λεπτά, απομακρύνονται οι πρωτεΐνες που καταβυθίστηκαν. Το υπερκείμενο διηθείται υπό κενό για να απομακρυνθούν τα αιωρήματα. Ρυθμίζεται το pH του υπερκείμενου με κορεσμένο διάλυμα $KHCO_3$ σε 6.8

- **Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο (90% w/v)**: Το ένζυμο καταβυθίζεται με την προσθήκη θειϊκού αμμωνίου 90 % w/v ίσου με 0.837 του όγκου του εκχυλίσματος. Η προσθήκη του θειϊκού αμμωνίου 90% w/v γίνεται υπό συνεχή ανάδευση. Κατά την προσθήκη του θειϊκού αμμωνίου το εκχύλισμα θολώνει γεγονός που σημαίνει ότι έχει ξεκινήσει η καταβύθιση των πρωτεϊνών. Το μείγμα στη συνέχεια παραμένει στους 0-4 ^{o}C για 24h μέχρι να καταβυθιστούν όλες πρωτεΐνες και μεταξύ αυτών και η RMGP*b.*

Τη **δεύτερη μέρα,** το υπερκείμενο αποχύνεται με τη χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται και φυγοκεντρείται στα 5117 g στους 0-4^{o} C για 35 λεπτά. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου νερού (λιγότερο από 100 ml) σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001 M (pH 7.5) στους 0-4 ^{o}C για περίπου 16 h.

Η **τρίτη μέρα** περιλαμβάνει:

- **Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH:** Το πρωτεϊνικό διάλυμα συλλέγεται μετά τη διαπίδυση και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5117g για 30 λεπτά στους 0-4 ^{o}C. Ογκομετράται το υπερκείμενο και προστίθεται πρόσφατο διάλυμα 2-μερκαπτο-αιθανόλης (0.3 M, pH 7) τέτοιου όγκου ώστε η τελική συγκέντρωση της 2-μερκαπτο-αιθανόλης να είναι 0.03M. Σε αυτό το διάλυμα προστίθεται EDTA 0.1M pH 7.0 όγκου ίσου με 0.005 του όγκου του διαλύματος μετά την προσθήκη της 2-μερκαπτο-αιθανόλης και το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8.8 με την πορσθήκη διαλύματος Tris 2M. Το μείγμα επωάζεται για 1h στους 37 ^{o}C με ταυτόχρονη ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα και αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Το pH ρυθμίζεται στο 7.0 με τη χρήση CH_3COOH 1N και ακολουθεί διαύγαση με φυγοκέντρηση στα

29000g για 10 λεπτά στους 0-4 ^{o}C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και ογκομετράται.

- **Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β:** Στο υπερκείμενο προστίθεται AMP 0.1M (pH 7.0) όγκου ίσου με 0.01 του πρωτεϊνικού όγκου και $(CH_3COO_2)Mg$ 1M (pH 7.0) όγκου ίσου με 0.01 του πρωτεϊνικού όγκου. Το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε μικρά σωληνάρια φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και τοποθετείται στον ψυκτικό θάλαμο, σε πάγο, για 6h περίπου, μέχρι να ολοκληρωθεί η κρυστάλλωση. Μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, από 10 λεπτά ως 2 ώρες, η φωσφορυλάση αρχίζει να κρυσταλλώνεται. Μετά από 6 ώρες, συλλέγονται οι κρύσταλλοι με φυγοκέντρηση στα 27000g στους 0-4 ^{o}C για 10 λεπτά. Το κρυσταλλικό ίζημα αναδιαλυτοποείται με μικρό όγκο (τον ελάχιστο δυνατό) ρυθμιστικού διαλύματος β-GT/Merc/EDTA (50:50:1) σε pH 6.8, σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρείται ώστε να διαυγαστεί στα 37000g στους 25-30^{o} C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό ογκομετράται και προσθέτουμε AMP (0.1M pH 7.0) και $(CH_3COO_2)Mg$ (1M, pH 7.0) όγκου ίσου με 0.01 του πρωτεϊνικού όγκου. Το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται στα σωληνάρια φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και τοποθετείται στον ψυκτικό θάλαμο (4 ^{o}C) σε πάγο για 4h.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 4 φορές με τη μόνη διαφορά ότι η 4^{η} και η 5^{η} ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP και $(CH_3COO)_2Mg$.

Ο τετραμερισμός του ενζύμου και ο σχηματισμός κρυστάλλων προάγεται σταδιακά και μεγιστοποιείται στην τελευταία (πέμπτη) ανακρυστάλλωση.

Μετά και την τελευταία ανακρυστάλλωση προσδιορίζεται η συγκέντρωση του ενζύμου φωτομετρικά στα 280nm με τη βοήθεια του τύπου:

$$C = A / \varepsilon b \ (mg/ml)$$

όπου

ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης για την RMGPb είναι $\varepsilon^{1\%}_{280nm}$*=1.32 για κυψελίδα οπτικής διαδρομής b=1cm*

άρα

$$C = A_{280} / 1.32 \text{ (mg/ml)}$$ [35]

Η απορρόφηση που μετράται στα 280nm οφείλεται στα αρωματικά αμινοξέα τυροσίνης και τρυπτοφάνης και έτσι υπολογίζεται η πρωτεϊνική συγκέντρωση.[36]

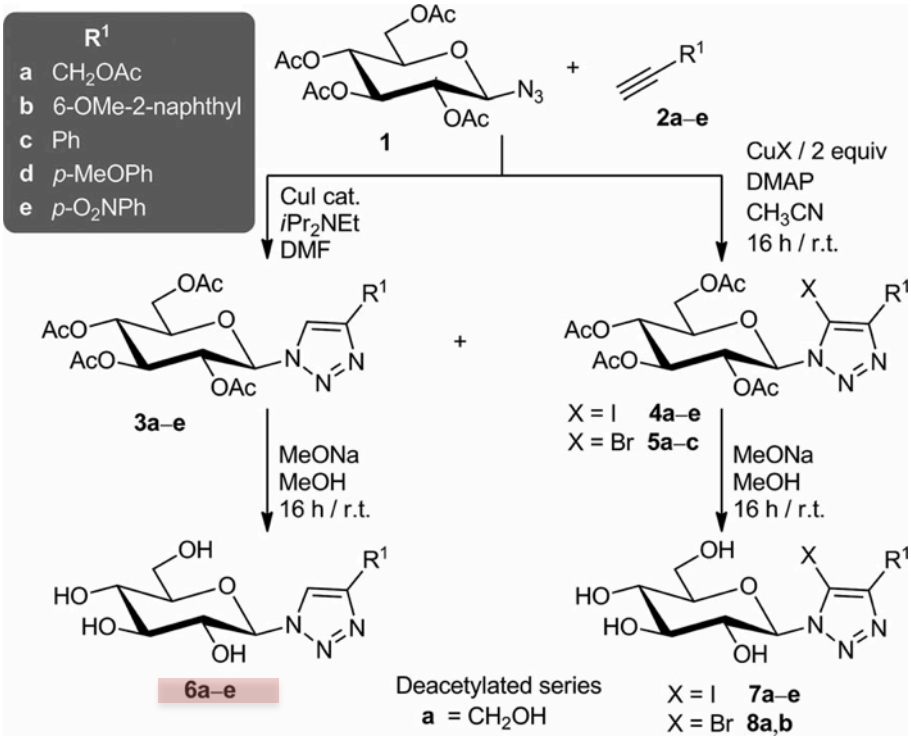
Στο ένζυμο προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης 100% (w/v), η οποία λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικό και το ένζυμο φυλάσσεται στους -20 ^{o}C.

3.2 Συνθετική πορεία

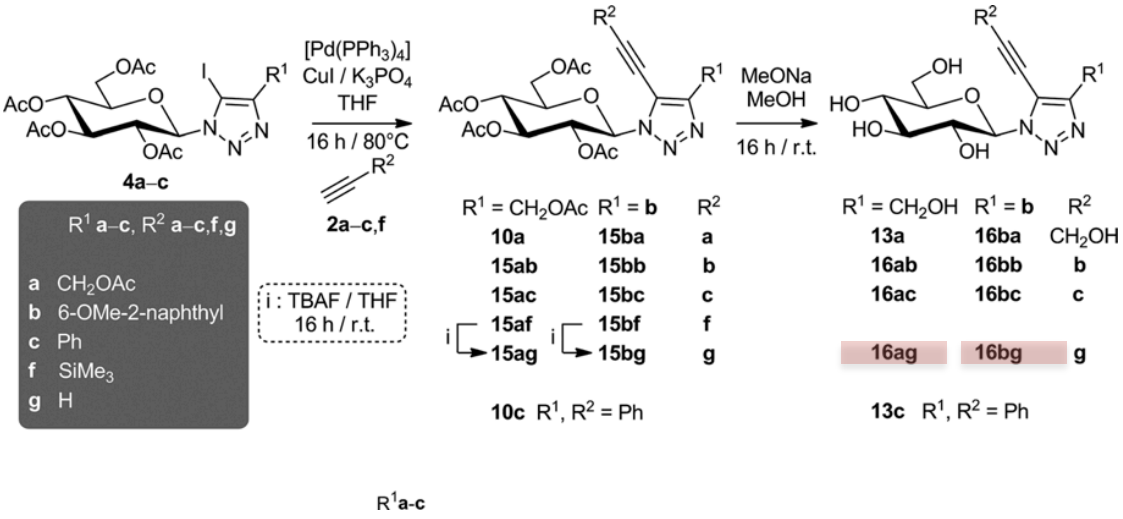
a) 1-γλυκοπυρανοζυλο-5-αλογονο-1,2,3-τριαζόλια (1-Glucosylated-5-Halogeno 1,2,3-Triazoles)

Η σύνθεση των τριαζολο-παραγώγων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Dr Jean-Pierre Praly στο Université Claude-Bernard Lyon 1 στη Γαλλία. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές μελέτες που αφορούν σε αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και ιδιαίτερα στα ανάλογα γλυκόζης που συνδέονται κυρίως στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Έτσι παρήχθηκαν και οι παρακάτω ενώσεις οι οποίες μελετήθηκαν με κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα (Πίνακας 3). [37]

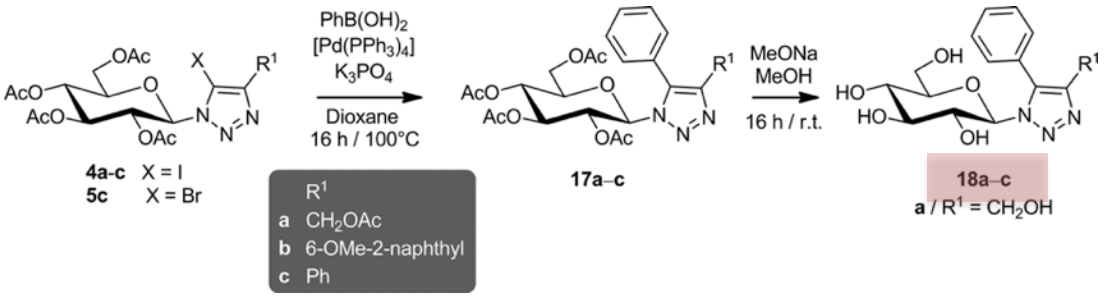
Η σύνθεση των 1-γλυκοπυρανοζυλο-5-αλογονο-1,2,3-τριαζολών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις παρακάτω πορείες (Σχήματα, 21, 22, 23):



Σχήμα 21.: Σύνθεση των 4-υποκατεστημένων N-γλυκοπυρανόζυλο-5-αλογονο-1,2,3 τριαζολίων.

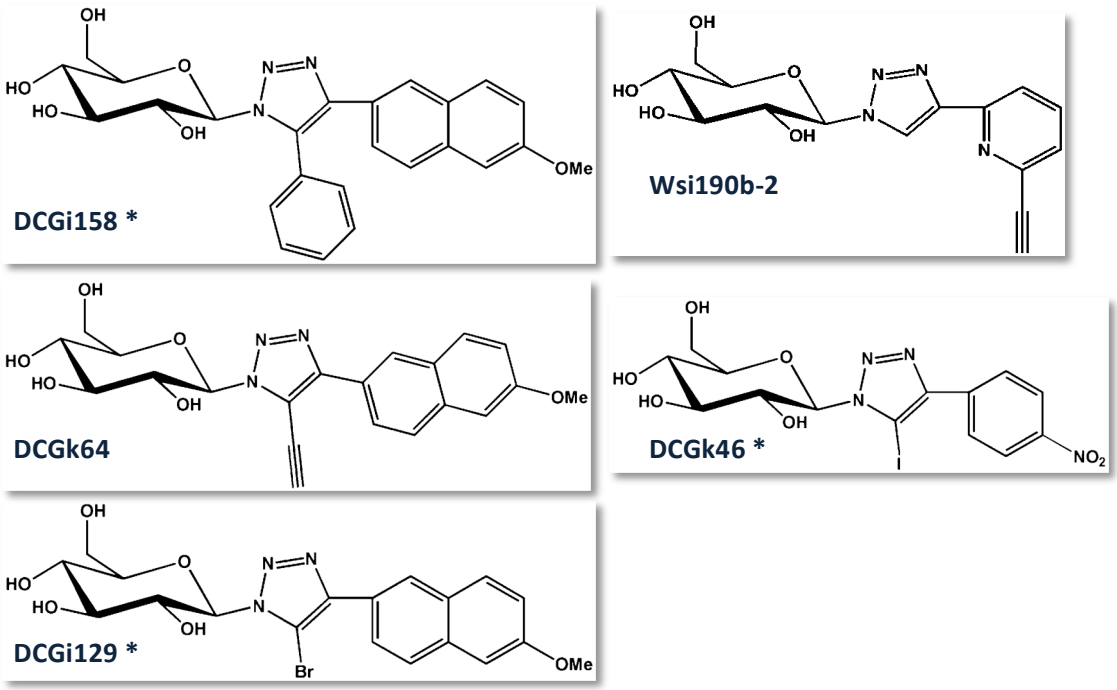


Σχήμα 22: Pb- καταλυόμενη αντίδραση Sonogashira με 5-ιωδό-1,2,3- τριαζολες.



Σχήμα 23: Pb- καταλυόμενη αντίδραση Suzuki με 5-αλογονο-1,2,3- τριαζολες.

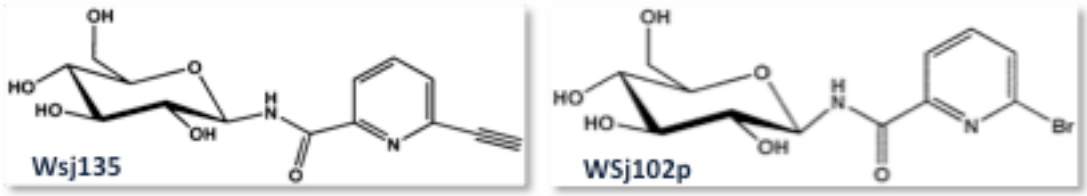
Η σύνθεση των 1-γλυκοπυρανοζυλο-5-αλογονο-1,2,3-τριαζολών πραγματοποιήθηκε είτε μέσω αντίδρασης Sonogashora είτε Suzuki, όπου τα 1-γλυκοζυλο-5-αλογονο 1,2,3 τριαζόλια μετατρέπονται σε υποκατεστημένα 1-γλυκοζυλο-5-αλογονο 1,2,3 τριαζόλια. Τα προϊόντα στη συνέχεια απομονώθηκαν με στήλη χρωματογραφίας silica gel.



Πίνακας 3: Τα παράγωγα των 1,2,3-τριαζολών που μελετήθηκαν είτε κινητικά είτε κρυσταλλογραφικά. Οι ενώσεις που υποδηλώνονται με αστερίσκο είναι δημοσιευμένες [37].

b) *N*-(*β*-D-γλυκοπυρανόζυλο) αμίδια

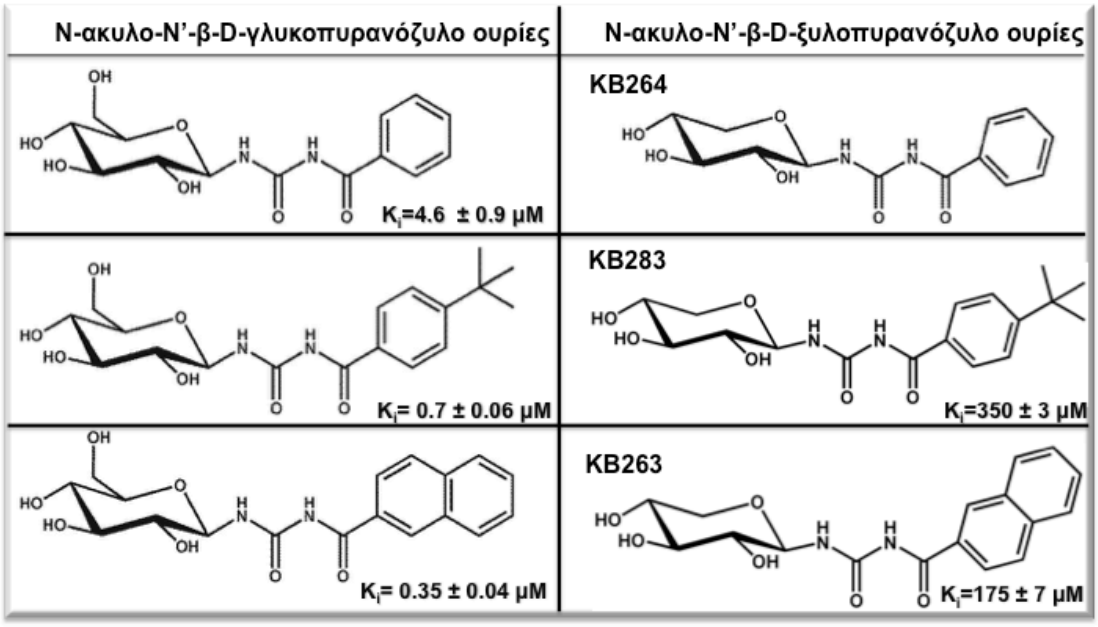
Τα *N*-*β*-D-γλυκοπυρανόζυλο παράγωγα συντέθηκαν στο εργαστήριο του Dr Jean-Pierre Praly στο Université Claude-Bernard Lyon 1 στη Γαλλία. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές μελέτες πάνω στους αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και ιδιαίτερα στα ανάλογα γλυκόζης που συνδέονται κυρίως στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.[38] Έτσι παρήχθηκαν και οι παρακάτω ενώσεις οι οποίες μελετήθηκαν κινητικά για την ανασταλτική τους δράση στο ένζυμο (Πίνακας 4).



Πίνακας 4 : Τα παράγωγα των N-*β*-D γλυκοπυρανοζυλο παραγώγων που μελετήθηκαν κινητικά.

c) N-ακυλο-*N'*-*β*-D-ξυλοπυρανόζυλο ουρίες

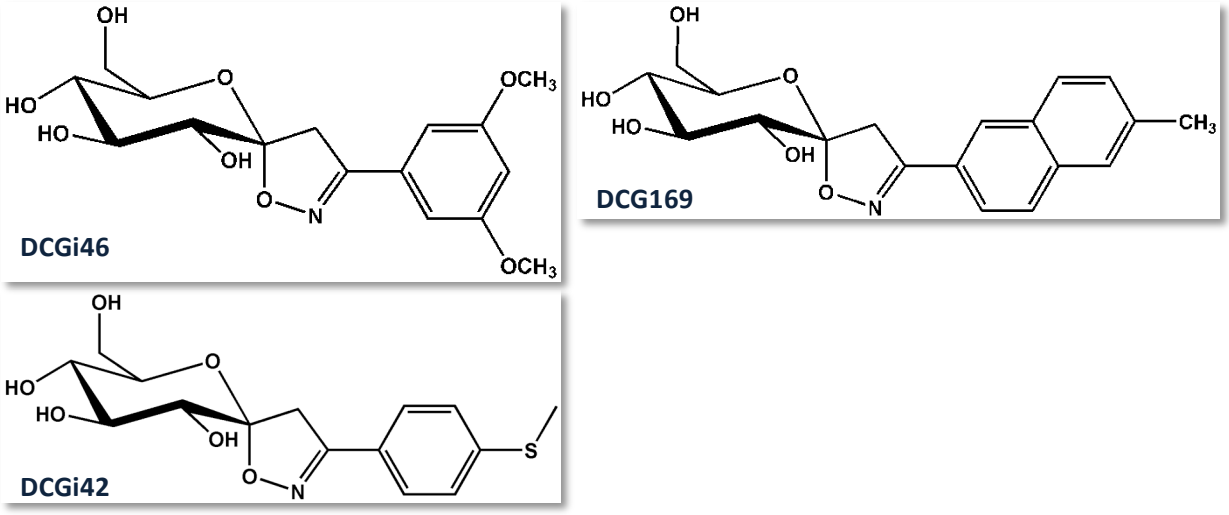
Η σύνθεση των παραγώγων ξυλόζης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Prof. Laszlo Somsak στο Department of Chemistry, University of Debrecen στην Ουγγαρία. Πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση αυτών το ξυλο-παραγώγων αποτέλεσαν πολύ καλά μελετημένα ανάλογα γλυκόζης τα οποία προσδένονται ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. (Πίνακας 5) Τα κινητικά πειράματα για τον προσδιορισμό των τιμών IC_{50} και K_i πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο των συνεργατών μας στην Ουγγαρία και τα κρυσταλλογραφικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.



Πίνακας 5: Στην αριστερή στήλη φαίνονται οι πρόδρομες ενώσεις (ανάλογα γλυκόζης) και στη δεξιά στήλη φαίνονται τα ανάλογα ξυλόζης που μελετήθηκαν.

d) D-γλυκοπυρανοζυλιδενο-σπειροισοξαζολινες

Τα παράγωγα των D-γλυκοπυρανοζυλιδενο-σπειροισοξαζολίνων συντέθηκαν στο εργαστήριο του Dr Jean-Pierre Praly στο Université Claude-Bernard Lyon 1 στη Γαλλία. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές μελέτες πάνω στους αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και ιδιαίτερα στα ανάλογα γλυκόζης που συνδέονται κυρίως στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Έτσι παρήχθησαν και οι παρακάτω ενώσεις, τα κινητικά πειράματα των οποίων πραγματοποιήθηκαν από την κα Κατερίνα Χατζησταματίου, MSc πριν την έναρξη της παρούσας εργασίας στο πλαίσιο της διπλωματικής της εργασίας για την απόκτηση διπλώματος ειδίκευσης υπό την επίβλεψη της Δρ Ευαγγελίας Χρυσίνα και συνοψίζονται στον Πίνακα 6.



Πίνακας 6: Οι D-γλυκοπυρανοζυλιδενο-σπειροισοξαζολινες που μελετήθηκαν.

Ο τρόπος σύνδεσης των παραπάνω παραγώγων μελετήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας και παρουσιάζεται στο κεφάλαιο 4.

3.3 Κινητικά Πειράματα

Διαλύματα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης του ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (2.5 mM *β*-GP, 2.5mM *β*-μερκαπτοαιθανόλη, 0.05mM EDTA)
- Διάλυμα γλυκογόνου 10% (w/v)
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (glucose-1-phosphate) 400mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου, αποτελούμενο από μείγμα ιμιδαζολίου:KCl:EDTA:DTT σε αναλογία 50:100:1:1 έτσι ώστε να προκύψουν τελικές συγκεντρώσεις ίσες με 200mM ιμιδαζόλιο, 400mM KCl, 4mM EDTA, 4mM DTT και pH διαλύματος 6.8
- Διάλυμα AMP 50mM pH 6.8
- Διάλυμα δωδεκυλο σουλφονικού νατρίου (SDS) 1%
- Διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου 15mM
- Διάλυμα οξικού ψευδαργύρου 100mM
- L–ασκορβικό οξύ
- Απιονισμένο νερό

Όργανα

- Υδρόλουτρο
- Αναλυτικός ζυγός
- Πεχάμετρο Metrohm 744
- Χρόνομετρο
- Φασματόμετρο UV-Visible Spectrophotometer (CARY)
- Φασματόμετρο ορατού Novaspec II
- Πιπέτες Gilson

Για τον υπολογισμό της ενζυμικής δραστικότητας πραγματοποιήθηκαν κινητικά πειράματα στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου.

$$\text{γλυκογόνο}_{n} + P_i \rightleftharpoons \text{G-1-P} + \text{γλυκογόνο}_{n-1}$$

Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 30 ^{o}C σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0.05 M *β*-γλυκερινοφωσφορικό νάτριο, 0.05 M 2-μερκαπτοαιθανόλη και 0.001 M EDTA σε αναλογία 50:50:1. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος ρυθμίζεται σε 6.8 με τη χρήση HCl 1N.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 900 μl. Τα υποστρώματα ετοιμάζονται σε σειρά δοκιμαστικών σωλήνων τελικού όγκου 720 μl. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας περιέχει 200 μl υποστρώματος G-1-P (σε συγκέντρωση τέτοια ώστε στον όγκο της αντίδρασης να έχει τελική συγκέντρωση 2 mM), 18 μl AMP (τελική συγκέντρωση 1 mM) και τον αναστολέα στις προς μελέτη συγκεντρώσεις. Στην περίπτωση που ο αναστολέας είναι διαλυτοποιημένος σε DMSO προστίθεται κατάλληλος όγκος του οργανικού διαλύτη στα υποστρώματα (τόσος ώστε η περιεκτικότητά τους (% v/v) σε DMSO να είναι ίδια με αυτή του διαλύτη και μην ξεπερνά το 1% (v/v) στην αντίδραση). Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με νερό. Επιπλέον, ετοιμάζονται τυφλά διαλύματα για τη G-1-P, το γλυκογόνο, τα πρότυπα φωσφορικά ιόντα και του νερού. Το ενζυμικό διάλυμα έχει όγκο 1500 μl και περιέχει:

- Ένζυμο ώστε η τελική συγκέντρωσή του στην αντίδραση να είναι 5 μg/ml

- Γλυκογόνο 10% (v/v) ώστε η τελική του συγκέντρωση στην αντίδραση να είναι 0.2% (v/v).
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (*β*-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8)
- Νερό μέχρι να συμπληρωθεί ο όγκος του ενζυμικού διαλύματος.

Το ενζυμικό διάλυμα επωάζεται για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 30 ^{o}C πριν αρχίσει η αντίδραση. Τα τελευταία 5 λεπτά, προκειμένου τα υποστρώματα, τα οποία περιείχαν τον προς μελέτη αναστολέα, να βρίσκονται στις ίδιες συνθήκες με το ένζυμο, επωάζονται και αυτά στους 30 ^{o}C. Η δραστικότητα του ενζύμου μελετάται μετά την πάροδο 2, 4, 6 και 8 λεπτών λαμβάνοντας δείγμα κάθε 20 δευτερόλεπτα. Η αντίδραση σταματά με τη χρήση SDS 1% στους αντίστοιχους χρόνους.[39] Στη συνέχεια, στα παραπάνω δείγματα καθώς και στα τυφλά που έχουν προετοιμαστεί, προστίθενται 2.5 ml όξινου διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου (κίτρινο διάλυμα που περιέχει μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM, οξικό ψευδάργυρο 100mM και ασκορβικό οξύ 10% (v/v) του οποίου το pH ρυθμίζεται στο 5) [40]. Μετά την προσθήκη του όξινου διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου τα δείγματα επωάζονται για 20 λεπτά στους 30 ^{o}C και στη συνέχεια τα ορθοφωσφορικά ιόντα που απελευθερώνονται προσδιορίζονται φασματομετρικά στα 850nm με τη μέθοδο των Fiske & Subbarow. [41]

Οι αναστολείς διαλυτοποιούνται σε νερό ή σε DMSO ανάλογα με την πολικότητά τους και αναμιγνύονται με το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (*β*-GP, EDTA, *β*-μερκαπτοαιθανόλη) ώστε η περιεκτικότητα του DMSO στην αντίδραση να μην ξεπερνά το 1%. Οι συγκεντρώσεις αυτού ποικίλλουν από 5μM-50μM-100μM-200μM-400μM.

Η τιμή της σταθεράς αναστολής K_i αποτελεί το μέτρο της χημικής συγγένειας του αναστολέα για το ένζυμο και εξάγεται από το διάγραμμα των φαινομένων K_m, $K_{m,app}$ συναρτήσει των συγκεντρώσεων του αναστολέα. Η τιμή της σταθεράς Michaelis-Menden, K_m ισούται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου η ταχύτητα λαμβάνει τιμή ίση με τη μισή της μέγιστης ταχύτητας και έχει διαστάσεις συγκέντρωσης.

Η τιμή του IC_{50} λαμβάνεται με τον ίδιο τρόπο και εκφράζει τη συγκέντρωση του αναστολέα για την οποία προκαλείται 50% αναστολή στην δράση του ενζύμου. Η διαφορά είναι ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση η συγκέντρωση του υποστρώματος παραμένει σταθερή και αυτό που αλλάζει είναι η συγκέντρωση του αναστολέα.

Η σχέση που συνδέει το K_M και το IC_{50} : $K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$ [42]

Η κινητική επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα GRAFIT (data analysis software).[43]

3.4 Κρυστάλλωση της RMGP*b* στην T διαμόρφωση

Για την ανάπτυξη κρυστάλλων φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στην T διαμόρφωση χρησιμοποιείται η μέθοδος batch. Δηλαδή, οι κρύσταλλοι αναπτύσσονται σε διάλυμα που περιέχει το ένζυμο (φωσφορυλάση του γλυκογόνου), ένα ρυθμιστικό διάλυμα και απαραίτητες για την κρυστάλλωση ουσίες σε σταθερή θερμοκρασία. [44]

Υλικά

- Φωσφορυλάση του γλυκογόνου *b*
- (BES:EDTA:DTT:NaN_3), (10:0.1:0.5:0.01%) pH 6.7
- Ζωάνθρακας
- Σπερμίνη $C_{10}H_{26}N_4$ 4HCl 200mM
- Μονοφωσφορική ινοσιτόλη (IMP) 200mM
- Διθειοθρεϊτόλη (DTT) $C_4H_{10}O_2S_2$ 200mM
- Πυρήνες κρυστάλλωσης (μικροκρύσταλλοι GP*b*)
- Κυψελίδες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1cm
- Μεμβράνες διαπίδυσης
- Φίλτρα προσαρμοσμένα σε σύριγγες Milex Millipore

Η διαδικασία ξεκινά με τη διαπίδυση του ενζύμου για τουλάχιστον 16 h στους 4 ^{o}C μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα BES:EDTA:DTT:NaN_3 σε αναλογία 10mM:0.1mM:0.5mM:0,01% και pH 6.7. Η διαπίδυση πραγματοποιείται προκειμένου να απομακρυνθεί η γλυκερόλη από το ένζυμο, η οποία χρησιμοποιείται ως κρυοπροστατευτικό για την αποθήκευση του ενζύμου στους -20 ^{o}C. Συγκεκριμένα, η προσθήκη του *EDTA* γίνεται καθώς αυτό σχηματίζει χηλικούς δεσμούς με τα μέταλλα και έτσι δεσμεύει τα μέταλλα που περιέχει το ένζυμο από την παρασκευή του π.χ. Mg λόγω του $(CH_3COO)_2Mg$ που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή του ενζύμου. Το *DTT* προστίθεται γιατί λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό, προστατεύοντας τις κυστεϊνες της φωσφορυλάσης οι οποίες περιέχουν θείο. Το NaN_3 λειτουργεί ως αντιβακτηριδιακό και τέλος το pH ρυθμίζεται στο 6,7 γιατί σε αυτό το περιβάλλον το ένζυμο είναι πιο δραστικό.

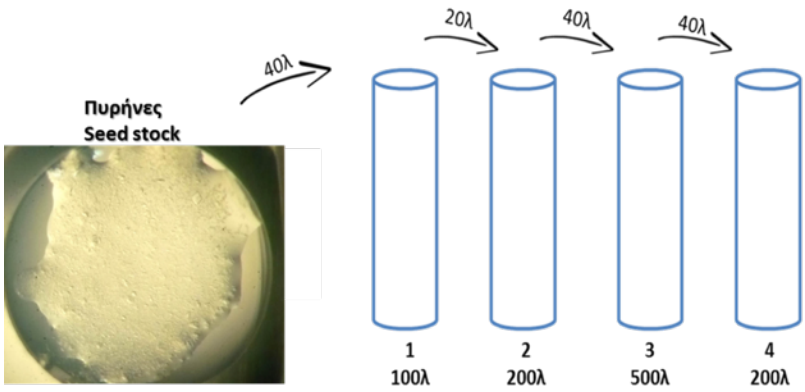
Μετά τη διαπίδυση ακολουθεί κατεργασία με ζωάνθρακα προς απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων, η περιεκτικότητα των οποίων υπολογίζεται από το λόγο των απορροφήσεων A_{260}/A_{280} σε μήκη κύματος 260nm και 280nm αντίστοιχα. Αν ο λόγος είναι ≤ 0.5 τότε θεωρείται ότι το ένζυμο έχει απαλλαγεί από το μεγαλύτερο μέρος των νουκλεοτιδίων. Αυτό είναι το επιθυμητό καθώς προκειμένου να διερευνηθεί ένας αναστολέας αν έχει προσδεθεί σε ένα από τα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου, θα πρέπει αυτά να μην είναι κατειλημμένα με νουκλεοτίδια.

Οι κρύσταλλοι της RMGP*b* στην T διαμόρφωση αναπτύσσονται παρουσία περίπου 20 mg συγκέντρωσης ενζύμου, συνεπώς μετά την κατεργασία με ζωάνθρακα και εφόσον ο λόγος A_{260}/A_{280}≤0.5 βρίσκουμε τη συγκέντρωση του ενζύμου από τον τύπο: C= $(A_{280}/1.32)$ x 50 και πραγματοποιείται είτε αραίωση είτε συμπύκνωση για την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης.

Με σκοπό την ελαχιστοποίηση του όγκου του ενζύμου που χρησιμποιείται για την κρυστάλλωση, στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν αρκετοί τρόποι κρυστάλλωσης πρωτεΐνων.

α) Κλασσική μέθοδος – μέθοδος Batch

Η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη κρυστάλλων του ενζύμου είναι η batch μέθοδος. Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης στην *T* διαμόρφωση αναπτύσσονται παρουσία ~20mg/ml ενζύμου απαλλαγμένου από γλυκερόλη και νουκλεοτίδια, παρουσία σπερμίνης (1 mM), DTT (3 mM), ρυθμιστικού διαλύματος BES:EDTA:DTT:NaN_3 σε αναλογία 10mM:0.1mM:0.5mM:0,01% και μικροκρυστάλλων φυσικής πρωτεΐνης, οι οποίοι δρουν ως πυρήνες κρυστάλλωσης. Το διάλυμα αυτό διανέμεται σε γυάλινους σωλήνες μικρής διαμέτρου οι οποίοι καλύπτονται με πάραφιλμ και φυλάσσονται στους 16 ^oC όπου και αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Αρχικά προστίθενται όλα τα συστατικά εκτός από τους πυρήνες και στη συνέχεια διαδοχικά προστίθενται οι πυρήνες. Στο σχήμα 24 παρουσιάζονται ενδεικτικές συνθήκες κρυστάλλωσης Σε περιπτώσεις συγκρυστάλλωσης, μαζί με τις παραπάνω ουσίες, προσθέτουμε και διάλυμα αναστολέα συγκεκριμένης συγκέντρωσης, δηλαδή θέλουμε να βρίσκεται σε περίσσεια ως προς το ένζυμο για να είμαστε σίγουροι ότι θα συνδεθεί.



Σχήμα 24: Σχηματική απεικόνιση της κλασικής μεθόδου κρυσταλλώσεων.

β) Άλλες τεχνικές κρυστάλλωσης

Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο όγκος της πρωτεΐνης που καταναλώνεται κατά την κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκαν δοκιμές κρυστάλλωσης μεταφέροντας τη batch μέθοδο από γυάλινους σωλήνες σε μικροπλάκες καθώς επίσης έγινε χρήση ρομπότ κρυστάλλωσης.

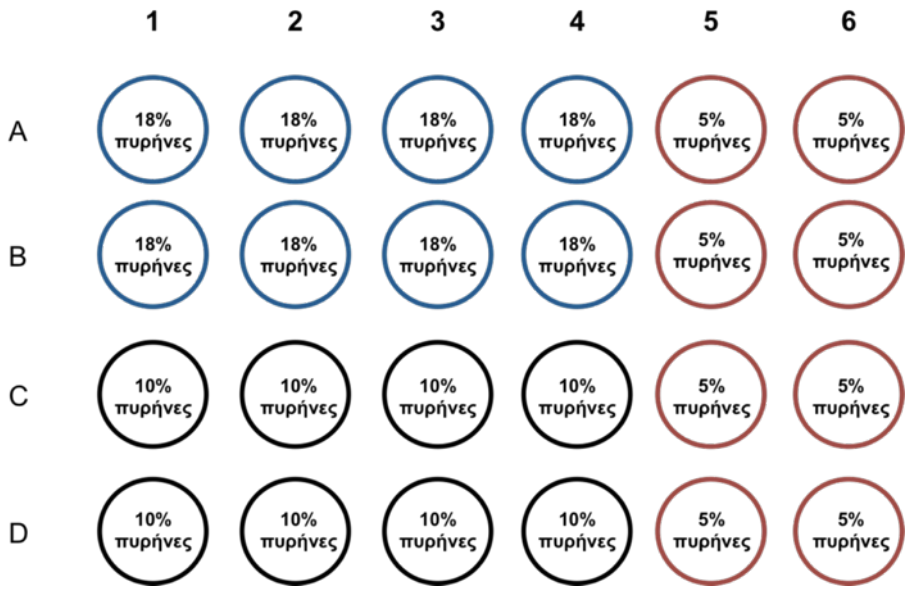
1. Η μέθοδος κρεμάμενης σταγόνας

Η μικροπλάκα που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη μέθοδο αποτελείται από 24 βοθρία.

Μικροπλάκα 1.

Σε κάθε βοθρίο προστίθεται 500 μl διαλύματος κρυστάλλωσης (reservoir) δηλαδή BES:EDTA:DTT:NaN_3 σε αναλογία 10mM:0.1mM:0.5mM:0,01%. Στη συνέχεια, σε μια καλυπτρίδα τοποθετούνται 2 σταγόνες όπου κάθε σταγόνα έχει τελικό όγκο 5μl. Διερευνήθηκαν 3 διαφορετικές συνθήκες όπου η μόνη διαφορά τους ήταν το ποσοστό των πυρήνων που χρησιμοποιήθηκε.

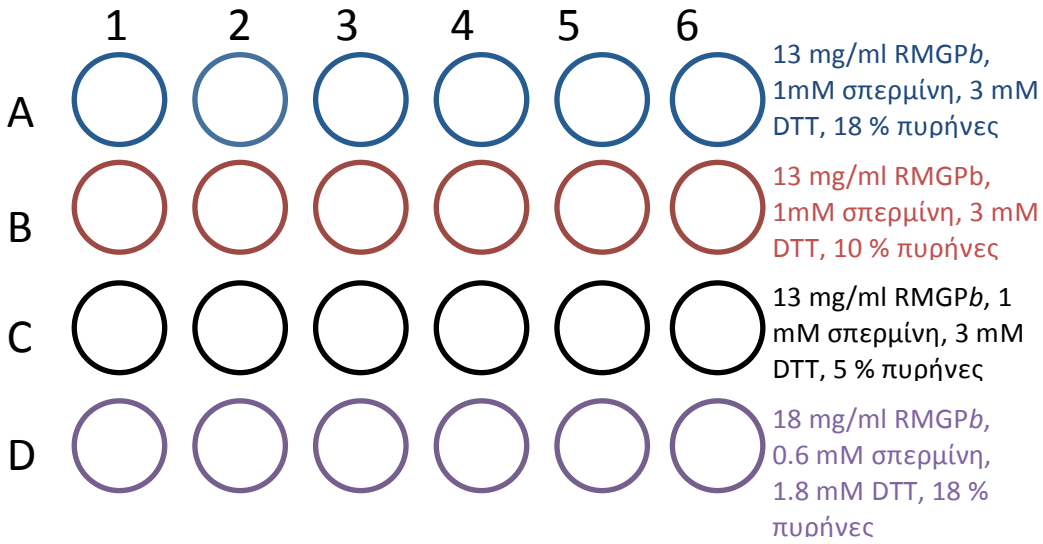
Κάθε σταγόνα περιέχει 17 mg/ml ενζύμου, σπερμίνη 1 mM, DTT 3 mM και BES:EDTA:DTT:NaN3 σε αναλογία 10mM:0.1mM:0.5mM:0,01%. Όσον αφορά στους πυρήνες στο σχήμα παρακάτω φαίνονται τα διαφορετικά ποσοστά. (Σχήμα 25).



Σχήμα 25: Σχηματική απεικόνιση της μικροπλάκας 1 και των συνθηκών που διερευνήθηκαν.

Μικροπλάκα 2. Σε κάθε βοθρίο προστίθεται 500μl διάλυμα κρυστάλλωσης δηλαδή BES:EDTA:DTT:NaN_3 σε αναλογία 10mM:0.1mM:0.5mM:0,01%. Στη συνέχεια, σε κάθε καλυπτρίδα τοποθετείται 1 σταγόνα όπου κάθε σταγόνα έχει τελικό όγκο 5μl. Διερευνήθηκαν 4 διαφορετικές συνθήκες.

Σε αυτό το πιάτο αναμείχθηκε το ένζυμο με το διάλυμα που περιέχει τις ενώσεις που απαιτούνται για την κρυστάλλωση. Στο σχήμα φαίνονται οι συνθήκες που μελετήθηκαν. (Σχήμα 26).



Σχήμα 26.: Σχηματική απεικόνιση της μικροπλάκας 2 και των συνθηκών που διερευνήθηκαν.

2. Αυτοποιημένη μέθοδος

Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η κρυστάλλωση με τη χρήση του **ρομπότ Oryx nano**. Το ρομπότ όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2, §2.2 έχει τη δυνατότητα μικροσποράς (microseeding), μπορεί δηλαδή να προσθέσει τους πυρήνες. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το ρομπότ κρυστάλλωσης 3^{ης} γενιάς του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Η πρώτη δοκιμή πραγματοποιήθηκε με χρήση έτοιμων συνθηκών από εμπορικό σκεύασμα για τη σάρωση τυχαίων συνθηκών. Συγκεκριμένα το kit που χρησιμοποιήθηκε ήταν το **JBScreen JCSG++HTS** της εταιρείας Jena Bioscience. Σε κάθε βοθρίο τοποθετήθηκαν 50 μl διαλύματος κρυστάλλωσης, από κάθε συνθήκη του kit. Ο όγκος της σταγόνας ήταν 0.6 μl και κάθε σταγόνα περιείχε 0.3 μl ενζύμου συγκέντρωσης 18.3 mg/ml, 0.2 μl reservoir και 0.1 μl πυρήνες κρυστάλλωσης (seed stock). Οι πυρήνες είναι θρυμματισμένοι κρύσταλλοι RMGP*b*, οι οποίοι βρίσκονται σε διάλυμα BES:EDTA:DTT:NaN_3 σε αναλογία 10mM:0.1mM:0.5mM:0,01%.

Επίσης, επιδιώχθηκε, η εύρεση κατάλληλου κρυοπροστατευτικού διαλύματος για τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων σε θερμοκρασία 100 K από κρυστάλλους της RMGP*b*. Η μέθοδος αυτή έχει τουλάχιστον δυο πλεονεκτήματα από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Καταρχήν μειώνεται σε πολύ μεγάλο βαθμό η καταστροφή του κρυστάλλου και κατά συνέπεια και του κρυσταλλικού πλέγματος, από τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών λόγω της έκθεσης σε ακτίνες Χ, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται συμβατικές πηγές που ο απαιτούμενος χρόνος έκθεσης των δειγμάτων είναι μεγάλος (της τάξης μερικών ωρών). Επίσης η χρήση αυτής της μεθόδου πλεονεκτεί ως προς την αποθήκευση και μεταφορά των κρυστάλλων όταν πρόκειται να γίνει συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων σε πηγές συγχροτρονικής ακτινοβολίας. [45] Τα πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενα κρυοπροστατευτικά είναι η γλυκερόλη, οι πολυαιθυλενογλυκόλες και τα σάκχαρα. [46]

3.5 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Για τη συλλογή των δεδομένων περίθλασης χρησιμοποιήθηκαν οι εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας στο EMBL, Hamburg Unit, στο Αμβούργο και του Diamond Light Source στην Οξφόρδη.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το σχηματισμό των συμπλόκων έχει ως εξής: διάλυμα αναστολέα κατάλληλης συγκέντρωσης τοποθετείται στο στόμιο τριχοειδούς σωλήνα, ο οποίος είναι σφραγισμένος από το ένα μέρος. Μονοκρύσταλλος της RMGP*b* εμβαπτίζεται στο διάλυμα του αναστολέα σε και αφήνεται για αρκετό χρόνο (ανάλογα με τη συγγένεια σύνδεσης που παρατηρήθηκε από τα κινητικά πειράματα) για να επιτευχθεί ο σχηματισμός του συμπλόκου. Ακολούθως απομακρύνεται το διάλυμα της ένωσης και ο κρύσταλλος εκτίθεται σε συγχροτρονική μονοχρωματική ακτινοβολία ακτίνων Χ σε θερμοκρασία δωματίου.

Η περιθλώμενη ακτινοβολία καταγράφεται σε έναν ανιχνευτή, ο οποίος με τη σειρά του ψηφιακά αποδίδει τις ανακλάσεις με τη μορφή περιθλασιγράμματος.

Η ένταση καθώς και η θέση των περιθλάσεων υπολογίζονται με τη βοήθεια λογισμικού, το οποίο λαμβάνει υπόψιν τον αριθμό των περιθλάσεων που συλλέχθηκαν, τον χρόνο έκθεσης, την απόσταση από τον ανιχνευτή, τη γωνία περιστροφής του κρυστάλλου και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

3.6 Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Για την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν το πρόγραμμα **XDS** [47], το πακέτο λογισμικού HKL-suite, το **CCP4** [48] και το πρόγραμμα μοριακών γραφικών **WinCoot**. [49] Τα συγκεκριμένα προγράμματα προσδιορίζουν τη σχετική θέση των αμαυρώσεων (κουκίδες) και την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας όπως αυτή φαίνεται στο περιθλασίγραμμα. Με το CCP4 γίνεται η συγχώνευση των περιθλασιγραμμάτων και η ολοκλήρωση των δεδομένων περίθλασης και με μετασχηματισμό Fourier υπολογίζεται το πλάτος των δομικών παραγόντων F. Συγκεκριμένα το CCP4 περιλαμβάνει μια σειρά προγραμμάτων όπως το **Scala**, με το οποίο πραγματοποιείται η συγχώνευση και ολοκλήρωση των δεδομένων περίθλασης, το **Phaser**, με το οποίο υπολογίζεται η ομάδα χώρου συμμετρίας της μοναδιαίας κυψελίδας στο πλέγμα του κρυστάλλου και το **Refmac**, με το οποίο γίνεται υπολογισμός των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o$-F_c και F_o-F_c, και πραγματοποιείται βελτιστοποίηση των πρωτεϊνικών μοντέλων έναντι των πειραματικών δεδομένων.

Οι κρύσταλλοι της RMGP*b* στην T διαμόρφωση που μελετήθηκαν με τη μορφή συμπλόκου με τους αναστολείς ανήκουν στο τετραγωνικό κρυσταλλικό πλέγμα και συγκεκριμένα στην ομάδα χώρου συμμετρίας $P4_32_12$.

3.7 Προσδιορισμός και ανάλυση της τρισδιάστατης δομής της RMGP*b* με τους αναστολείς.

Για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου πραγματοποιείται μοριακή αντικατάσταση, δηλαδή χρησιμοποιείται η ήδη γνωστή δομή του ενζύμου ως συμπλόκου με την α-D-γλυκόζη για τον προσδιορισμό των φάσεων. Με τη χρήση αυτού του μοντέλου υπολογίζεται ο

χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητα $2F_o$-F_c όπου F_o είναι ο δομικός παράγοντας των περιθλάσεων που καταγράφηκαν κατά τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος (F observed) και F_c ο αντίστοιχος παράγοντας όπως υπολογίζεται από το μοντέλο (F calculated). Οι χάρτες διαφοράς $2F_o$-F_c που υπολογίστηκαν για κάθε σύμπλοκο ξεχωριστά, υποδεικνύουν τη σύνδεση ή μη του αναστολέα με το ένζυμο καθώς επίσης και τις αλλαγές που προκλήθηκαν κατά τη σύνδεση.

Οι αναστολείς στη συνέχεια, σχεδιάζονται σε τρεις διαστάσεις με τη χρήση του προγράμματος **ChemDraw** [50] και ελαχιστοποιείται η ενέργειά τους με το **MacroModel Schrödinger** [46]. Μετά προσαρμόζονται στο χάρτη διαφοράς της ηλεκτρονιακής πυκνότητας με τροποποίηση των δίεδρων γωνιών τους.

Το νεό μοριακό μοντέλο του συμπλόκου, με το πρόγραμμα Refmac υποβάλλεται σε βελτιστοποίηση έναντι των πειραματικών δεδομένων. Για την καταγραφή των γεωμετρικών χαρακτηριστικών του αναστολέα με τη μορφή βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκε ο εξυπηρετητής **Dundee Server**.[51] Η απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου και των χαρτών ηλεκτρονιακής ακτινοβολίας πραγματοποιείται με το λογισμικό Coot. Οι ατομικές συντεταγμένες του συμπλόκου υποβάλλονται στη συνέχεια σε διαδοχικούς κύκλους βελτιστοποίησης και ελέγχονται τα μόρια νερού.

Με το πέρας όλων των κύκλων βελτιστοποίησης, ελέγχεται η γεωμετρία της δομής του συμπλόκου με το **MolProbity** [52], το οποίο είναι ένα διαδικτυακό εργαλείο ελέγχου της ορθότητας της δομής από πλευράς γεωμετρίας, μήκους δεσμών, γωνιών, δίεδρων γωνιών καθώς και γωνιών των πεπτιδικών δεσμών. Το συγκεκριμένο εργαλείο είναι βασισμένο σε ένα ευρύ φάσμα παγκόσμιων σταθερών προκειμένου να αξιολογήσει την ποιότητα του προς μελέτη μοντέλου.

Οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals και οι δεσμοί υδρογόνου καταγράφονται με το πρόγραμμα **Contact**. [48]

Τέλος για τη σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων και των αναστολέων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα οπτικοποίησης τρισδιάστατων δομών **Chimera** [53] και το **MolSoft** [54].

Κεφάλαιο 4ο
Αποτελέσματα

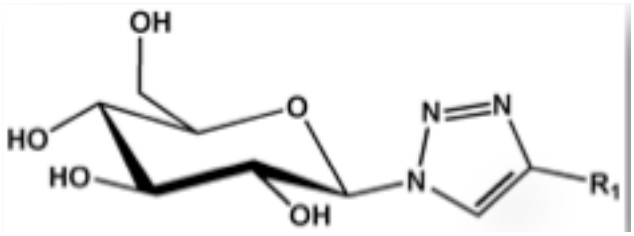
4.1 Μελέτη της ενζυμικής κινητικής της RMGP*b* παρουσία παραγώγων γλυκόζης

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας πραγματοποιήθηκε στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου (Κεφάλαιο 3). Μελετήθηκαν αρκετές ενώσεις ως δυνάμει αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Στη συνέχεια παρατίθενται οι ενώσεις που μελετήθηκαν κινητικά με τις συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το αν παρουσιάζουν αναστολή ή όχι. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε σταθερές συγκεντρώσεις AMP 1 mM, G-1-P 2 mM και γλυκογόνου 0,2 %. Οι ενώσεις διαλυτοποιήθηκαν σε 100% v/v DMSO και στη συνέχεια για την κινητική τους μελέτη αραιώθηκαν σε 20 % v/v DMSO.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δύο κατηγορίες ενώσεων, παράγωγα γλυκόζης, επτά γλυκοπυρανοζιτικά παράγωγα του 1,2,3-τριαζολίου και δύο *N*-*β*-D-γλυκοπυρανοζυλο-αμίδια. Για τις ενώσεις αυτές υπολογίσθηκαν οι τιμές IC_{50} οι οποίες παρουσιάζονται στους Πίνακες 7 και 8.

Ειδικότερα, οι ενώσεις που έχουν μελετηθεί έως σήμερα και χρησιμοποιούν ως στόχο το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου είναι παράγωγα γλυκόζης τα οποία αξιοποιούν ως επί το πλείστον το χώρο που εντοπίζεται το β-υποκέντρο του καταλυτικού καναλιού. Οι ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία και αφορούν τα παράγωγα του 1,2,3-τριαζολίου σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να διερευνηθεί αν η σύνδεση ενός προσδέτη ευνοείται εάν καταλαμβάνεται και ο χώρος του α-υποκέντρου. Έτσι, εξετάσθηκαν ενδεικτικά οι ενώσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Την ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι της RMGP*b* επέδειξε η ένωση DCGk58 με IC_{50}= 244.8 μM ενώ την ασθενέστερη οι ενώσεις DCGi165 και DCGj14a.

Ως πρόδρομος ένωση χρησιμοποιήθηκε το γλυκοπυρανοζιτικό παράγωγο του τριαζολίου, το οποίο έφερε μια ομάδα $–CH_2OH$ στην θέση 4 (Σχήμα 27). Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες η ένωση αυτή επέδειξε αναστολή της δράσης του ενζύμου IC_{50}= 26 μM. [37, 55]



$R_1= CH_2OH$

IC_{50}= 26 μM

Σχήμα 27. : Γλυκοπυρανοζιτικό παράγωγο που αποτέλεσε την πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση των παραγώγων των 1,2,3- τριαζολών

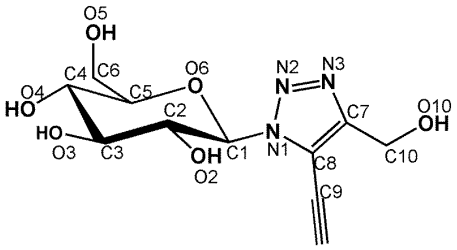
Εισαγωγή ενός αλκινίου στη θέση 5 του τριαζολικού δακτυλίου, ένωση DCGj143, οδήγησε σε απώλεια της ανασταλτικής δράσης της ένωσης (IC_{50} 20.1% σε 1 mM εξεταζόμενης ουσίας). Αντικατάσταση του αλκινίου με μια φαινυλομάδα, ένωση DCGi165, δεν παρουσίασε καμμία αναστολή. Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου του αλκινίου, διατηρήθηκε ως υποκαταστάτης του τριαζολικού δακτυλίου στη θέση 5 ενώ η –OH αντικαταστάθηκε με μια 6-OMe-2-ναφθυλομάδα (ένωση DCGk64). Η ένωση αυτή παρουσίασε κάποια αναστολή του ενζύμου, τιμή IC_{50}= 546 μM. Απομάκρυνση του αλκινίου από το τριαζόλιο (ένωση DCGk57) οδήγησε σε απώλεια της αναστολής. Λαμβάνοντας υπ’όψιν ότι η παρουσία του αλκινίου στάθηκε ευνοϊκή για τη σύνδεση, προστέθηκε μια ομάδα φαινυλίου προς την κατεύθυνση του α-υποκέντρου ενώ η 6-OMe-2-ναφθυλομάδα αντικαταστάθηκε με ένα ακόμα φαινύλιο (ένωση DCGj14a). Ούτε αυτή η τροποποίηση έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Αφού η υποκατάσταση του τριαζολίου προς το α-υποκέντρο δε φάνηκε να είναι ευνοϊκή παρά μόνο στην περίπτωση εισαγωγής του αλκινίου ως υποκαταστάτη, διερευνήθηκε περαιτέρω η σπουδαιότητα της εν λόγω ομάδας μετατοπίζοντας την κατά μήκος του καταλυτικού κέντρου προσθέτοντας στο δακτύλιο του τριαζολίου έναν υποκατεστημένο, με αυτή την ομάδα, δακτύλιο πυριδίνης (ένωση Wsi190b-2). Το Wsi190b-2 έδωσε βελτιωμένη αναστολή,

IC_{50}=342 μM έναντι της προδρόμου ένωσης που εξετάσθηκε για αυτήν την κατηγορία, DCGj143. Στη συνέχεια δοκιμάσθηκε επίσης η ένωση DCGk58 ως τροποποίηση της DCGk57, όπου 6-OMe-2-ναφθυλο ομάδα αντικαταστάθηκε με μια υποκατεστημάνη ομάδα νιτρο φαινυλίου στην θέση *para*. Η ένωση αυτή παρουσίασε καλή ανασταλτική δράση με τιμή IC_{50}=244.8 μM.

Συμπερασματικά, για αυτήν την κατηγορία ενώσεων, η προσθήκη ογκοδέστερων αρωματικών υποκαταστατών προς το α-υποκέντρο δεν προάγει τη σύνδεση των προς μελέτη ενώσεων (Πίνακας 7).

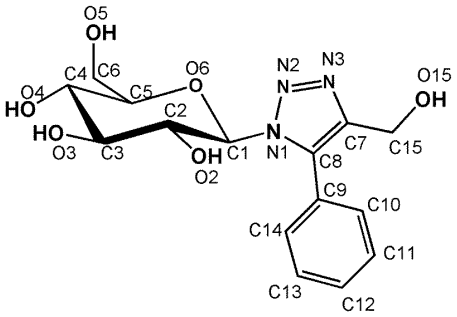
DCGj143



[I]:50-100-200-500-1000μM

IC_{50}: 20.1% in 1000 μM

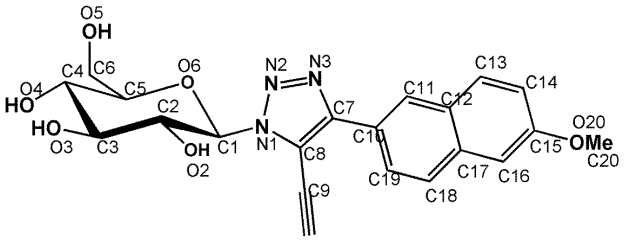
DCGi165



[I]:100-200-250-500-1000μM

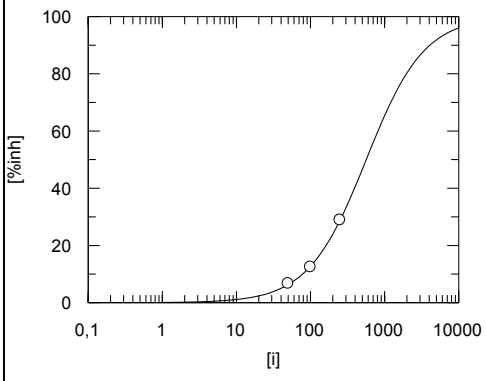
Δεν παρουσίασε αναστολή

DCGk64

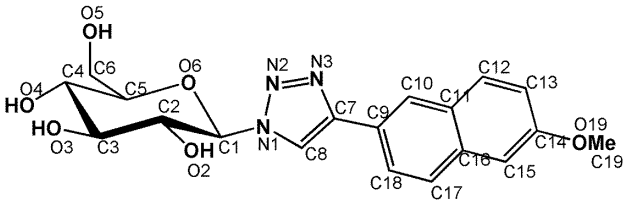


[I]:50-100-150-200-250μM

IC_{50}= 564,3 ± 24,4 μM



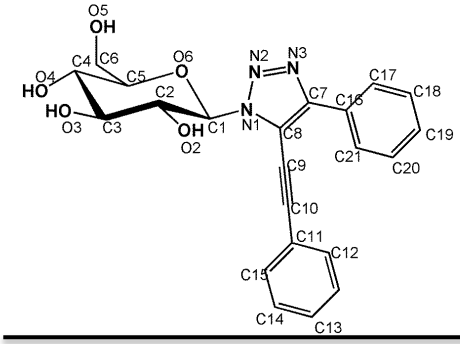
DCGk57



[I]:5-50-100-200-400 μM

10.3 % στα 200 μM

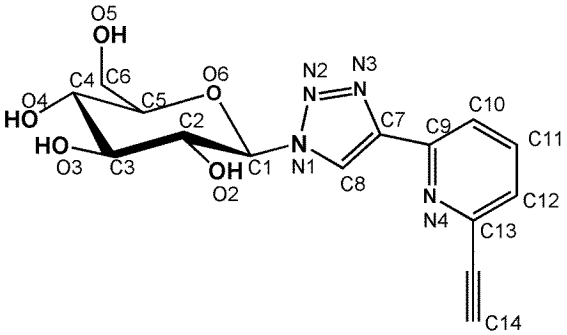
DCGj14a



[I]:50-100-200-500-1000μM

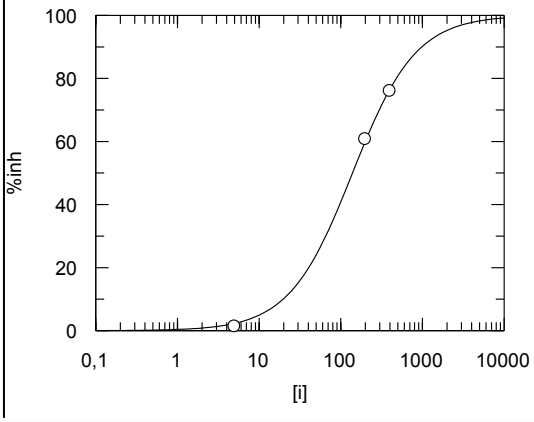
Δεν παρουσίασε αναστολή

Wsi190b-2

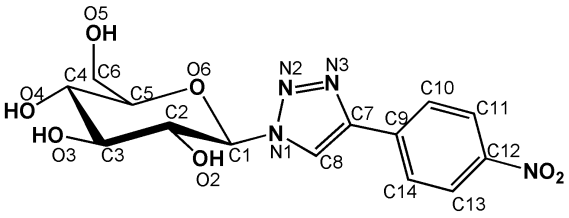


[I]:5-50-100-200-400 μM

IC_{50}= 342,2 ± 14,5 μM

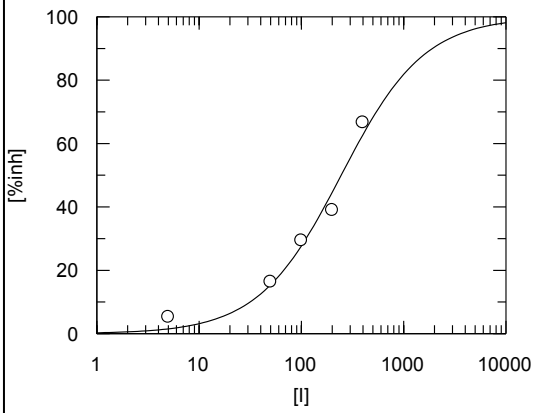


DCGk58



[I] : 5-50-100-200-400 μM

IC_{50} = 244.8 ± 27.6 μM



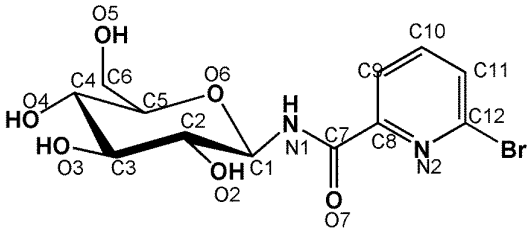
Πίνακας 7: Τα ανάλογα των 1,2,3-τριαζολίων που μελετήθηκαν κινητικά, οι τιμές IC_{50} αυτών και τα διαγράμματα της % αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα σε μM.

Όσον αφορά στη δεύτερη κατηγορία ενώσεων που μελετήθηκαν κινητικά και αφορούσε στα παράγωγα *N*-*β*-D-γλυκοπυρανόζυλο αμιδίων ισχυρότερη ανασταλτική δράση παρουσίασε η ένωση Wsj135 με IC_{50}=139 μM και ασθενέστερη η ένωση WSj102p.

Ειδικότερα, για τη σύνθεση αυτής της κατηγορίας ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η γνώση που προέκυψε από τη σύνδεση του γλυκοπυρανοζιτικού αναλόγου του φωσφοραμιδίου και του αζιδο- ακεταμιδίου για τα οποία είχαν πραγματοποιηθεί τόσο κινητικές όσο και κρυσταλλογραφικές μελέτες στο παρελθόν. Το μεν φωφοραμίδιο, παρά το γεγονός ότι ήταν ασθενής αναστολέας, συνδεόταν στον καταλυτικό κέντρο του ενζύμου όπως και το άζιδο- ακεταμίδιο, το οποίο όμως είχε επιδείξει ισχυρή αναστολή K_i = 48.7 ± 4 μM. [56,57]

Πιο συγκεκριμένα, παρεμβολή ενός δακτυλίου πυριδίνης μεταξύ του ακεταμιδίου και της ομάδας αλκινίου οδήγησε σε σχετικά ισχυρή αναστολή (IC_{50}=139 μM, ένωση Wsj135). Στη συνέχεια, αντικατάσταση της ομάδας αλκινίου από ένα άτομο βρωμίου δεν ήταν καθόλου ευνοϊκή (ένωση WSj102p). Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών για τις δύο αυτές ενώσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

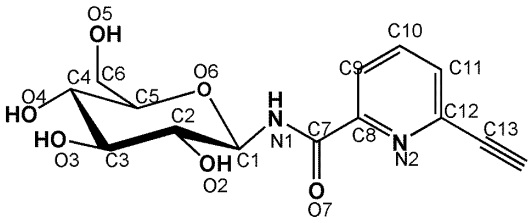
WSj102p



[I]:5-50-100-200-400μM

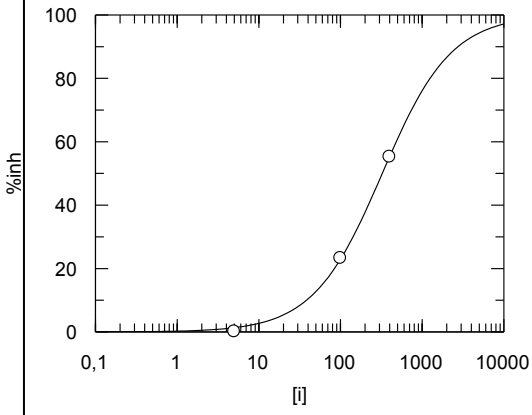
33.4 % στα 400 μM

WSj135



[I]:50-100-150-200-250μM

IC_{50}= 139 ± 9,7 μM



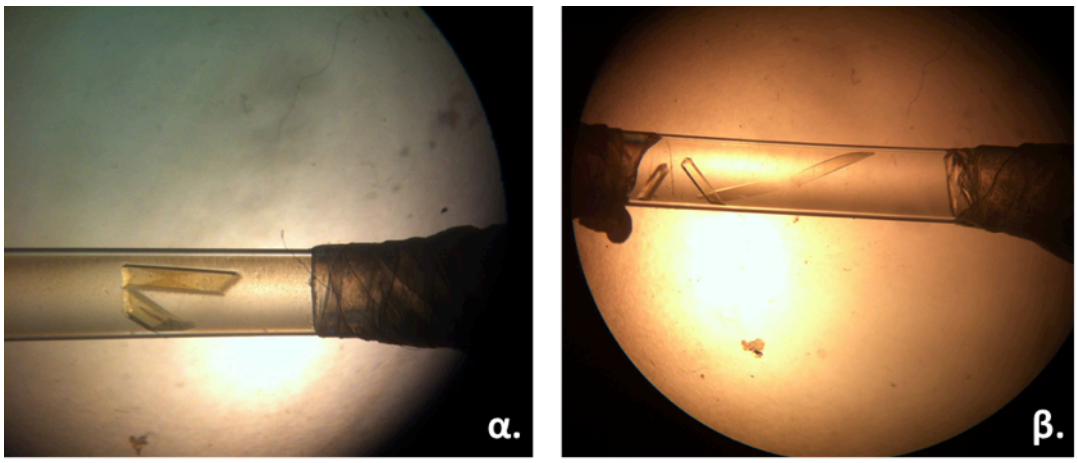
Πίνακας 8: Τα ανάλογα των *N*-D-γλυκοπυρανοζυλο-αμίδια που μελετήθηκαν κινητικά, οι τιμές IC_{50} αυτών και τα διαγράμματα της % αναστολής συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναστολέα σε μM..

4.2 Δοκιμές βελτίωσης των συνθηκών κρυστάλλωσης της RMGP*b*

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν δοκιμές βελτίωσης των συνθηκών κρυστάλλωσης της RMGP*b* προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο όγκος ενζύμου που χρησιμοποιείται αλλά και να διευρευνηθούν νέες συνθήκες κατάλληλες για τη συλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων-Χ σε θερμοκρασία 100 K. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόσθηκαν διάφορες μέθοδοι κρυστάλλωσης και διερευνήθηκαν ποικίλες συνθήκες κρυστάλλωσης του ενζύμου (βλ. §3.1).

Η κλασσική μέθοδος περιελάμβανε ανάπτυξη κρυστάλλων με τη **batch μέθοδο** με την προσθήκη σπερμίνης (1 mM), DTT (3 mM), ρυθμιστικού διαλύματος BES:EDTA:DTT:NaN_3 σε αναλογία 10mM:0.1mM:0.5mM:0,01% και μικροκρυστάλλων πρωτεΐνης οι οποίοι δρουν ως πυρήνες κρυστάλλωσης, παρουσία ή απουσία IMP (1 mM) ανάλογα με το είδος της μελέτης που επιδιώκεται.

Μετά από μια μέρα σχηματίστηκαν κρύσταλλοι και στα σωληνάκια που προσθέσαμε IMP και σε αυτά που δεν προσθέσαμε. (Φωτογραφία 5)



Φωτογραφία 5: Κρύσταλλοι της RMGP*b* που αναπτύχθηκαν με τη batch μέθοδο, α. με την προσθήκη IMP, β. χωρίς την προσθήκη IMP.

Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν χωρίς την προσθήκη του IMP είναι πιο μικροί όπως αναμενόταν καθώς το IMP υποβοηθά την ανάπτυξη των κρυστάλλων.

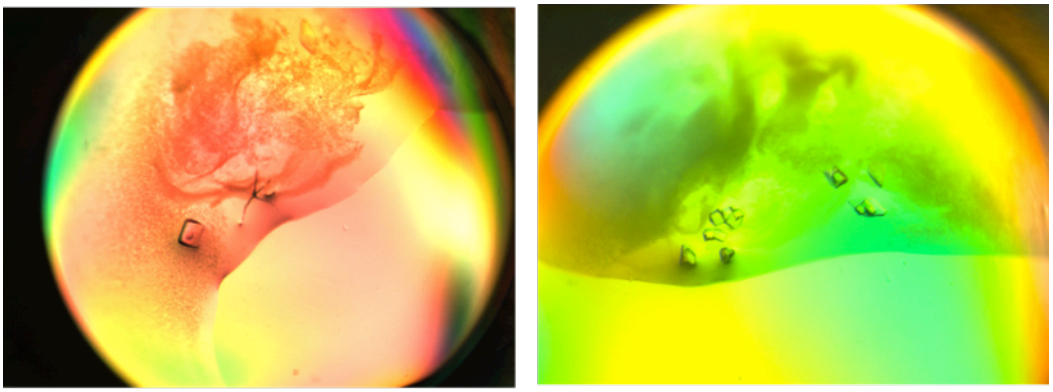
Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η **μέθοδος κρεμάμενης σταγόνας** (βλ. §3.1). Στη **μικροπλάκα 1** (βλ. §3.1) όπου δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές συνθήκες με διαφορετικό ποσοστό πυρηνών κάθε φορά, παρατηρήθηκαν την επόμενη μέρα κρύσταλλοι σε όλα τα βοθρία. Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν στη συνθήκη που περιείχε πυρήνες κρυστάλλωσης σε ποσοστό 5%, δηλαδή σε υψηλότερη αραίωση, ήταν πολύ καλύτεροι ως προς το μέγεθος, ενώ αυτοί που αναπτύχθηκαν με χρήση πυρήνων σε ποσοστό 18% ήταν πολύ μικρότεροι.

Στη **μικροπλάκα 2** όπου δοκιμάστηκαν τέσσερις διαφορετικές συνθήκες, παρατηρήθηκαν την επόμενη μέρα κρύσταλλοι σε όλες τις συνθήκες. Παρατηρήθηκε ότι όταν χρησιμοποιήθηκε αραιώτερο διάλυμα πυρήνων αναπτύχθηκαν καλύτερης ποιότητας κρύσταλλοι (τρεις πρώτες συνθήκες). Αντίστοιχα στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε αραιό διάλυμα πυρηνών και μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμου αναπτύχθηκαν εξίσου καλοί κρύσταλλοι.

Επαναλήφθηκαν οι συνθήκες που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσμα για λόγους επαναληψιμότητας. Την επόμενη μέρα παρατηρήθηκαν υψηλής ποιότητας κρύσταλλοι ως προς τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά.

Στην αυτοματοποιημένη κρυστάλλωση με τη χρήση του **ρομπότ Oryx nano**, δοκιμάστηκε το εμπορικό σκεύασμα **JBScreen JCSG++HTS**. Μετά το πέρας δυο μηνών παρατηρήθηκε ότι σε κάποιες συνθήκες αναπτύχθηκαν πολύ καλοί κρύσταλλοι, συγκεκριμένα, στα βοθρία G6 και G8 (Φωτογραφία 6).

Ακολούθησε περαιτέρω μελέτη της συνθήκης που αναπτύχθηκαν οι κρύσταλλοι στο βοθρίο G6. Η συνθήκη αυτή περιείχε 20% PEG3350 και 200 mM μηλονικό νάτριο με pH 7.0.



α β

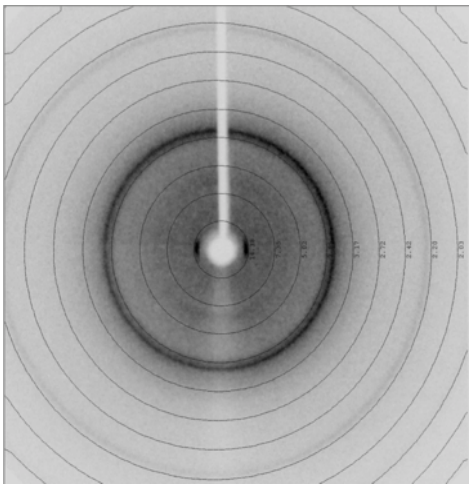
Φωτογραφία 6: Κρύσταλλοι φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που αναπτύχθηκαν με το oryxnano με μικροσπορά στο JBScreen JCSG++HTS kit. α. Το κελί G6 όπου το διάλυμα κρυστάλλωσης περιέχει 20 %w/v PEG 3350 , 200 mM Μηλονικό νάτριο και το pH είναι 7.0. β. Το κελί G8 όπου το διάλυμα κρυστάλλωσης περιέχει 20 %w/v PEG 3350, 150 mM D,L- Μηλικό οξύ και το pH είναι 7.0.

Προκειμένου να βελτιωθεί η εν λόγω συνθήκη, ετοιμάσθηκαν διαλύματα με τροποποίηση της συγκέντρωσης είτε του μηλονικού νατρίου είτε του PEG3350 είτε και των δύο. Οι παραπάνω εκδοχές διερευνήθηκαν και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων πυρήνων. Παρατηρήθηκε ότι οι βέλτιστοι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν με τροποποίηση των αρχικών συνθηκών όπου η συγκέντρωση του άλατος μηλικού νατρίου ήταν αυξημένη σε 250 mM.

Για τη συλλογή δεδομένων σε θερμοκρασία 100 K (κρυογενείς συνθήκες) διευρευνήθηκε η χρήση κρυοπροστατευτικών ουσιών στις συνθήκες αυτές που οδήγησαν σε σχηματισμό της βέλτιστης ποιότητας κρυστάλλων. Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν πιθανά κρυοπροστατευτικά, αρχικά ως πρόσθετα στις συνθήκες κρυστάλλωσης. Εφόσον δεν παρατηρούνταν οι χαρακτηριστικοί δακτύλιοι του πάγου τότε ακολουθούσε εμβάπτιση του κρυστάλλου στο κρυοπροστατευτικό για περίπου 30 sec πριν την έκθεσή του στις ακτίνες X. Ειδικότερα, δοκιμάσθηκαν τα εξής:

- *50% γλυκερόλη,* η οποία λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικό μια και δεν παγώνει το διάλυμα που προκύπτει στο ρεύμα αζώτου, όμως καταστρέφει την περιθλαστική ικανότητα του κρυστάλλου λόγω της μη ειδικής σύνδεσής της σε όλα τα μόρια του ενζύμου που συνθέτουν το κρυσταλλικό πλέγμα με αποτέλεσμα την καταστροφή αυτού.

- *30% paratone* το οποίο σχημάτισε πάγο, γεγονός που αποτυπώνεται με τους χαρακτηριστικούς ομόκεντρους δακτυλίους στο περιθλασίγραμμα (εικόνα 7) .
- *40% PEG4000* το οποίο επίσης κρίθηκε ακατάλληλο γιατί καταστρέφει το κρυσταλλικό πλέγμα
- *40% PEG4000 με 15% γλυκερόλη* όπου η γλυκερόλη φαίνεται να συνδέεται μη ειδικά στο ένζυμο και να καταστρέφει και σε αυτήν την περίπτωση το κρυσταλλικό πλέγμα.
- *50% PEG8000* χωρίς κανένα αποτέλεσμα,
- *100% ισοοκτάνιο,* οδήγησε σε σχηματισμό πάγου
- *15% PEG400,* σχηματισμός πάγου
- *25% αιθυλενο-γλυκόλη*, σχηματισμός πάγου



Εικόνα 7: Περιθλασίγραμμα όπου φαίνονται οι δακτύλιοι του πάγου.

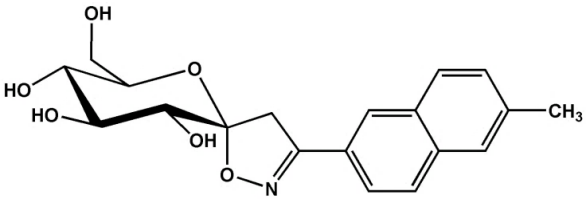
Όσον αφορά στους κρυστάλλους που παρατηρήθηκαν στα βοθρία G6 και G8 κελιά του JBScreen JCSG++HTS, δοκιμάστηκαν με κάποια κρυοπροστατευτικά, 20%, 30% και 35% γλυκερόλη, όπου ο κρύσταλλος του G6 με 30% γλυκερόλη ως κρυοπροστατευτικό είχε ασθενή περίθλαση και ο κρύσταλλος που αναπτύχθηκε στο G8 με 35% γλυκερόλη δεν είχε καθόλου περίθλαση.

Για το λόγο αυτό περαιτέρω διερεύνηση για την εύρεση του καταλληλότερου κρυοπροστατευτικού είναι σε εξέλιξη.

4.3 Δομικές μελέτες για τις D-γλυκοπυρανοζυλιδενο-σπειροισοξαζολινες

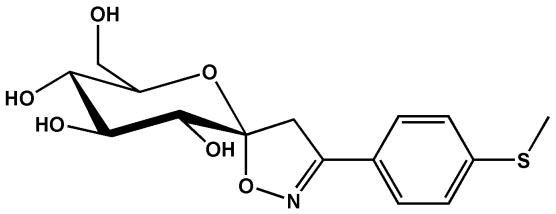
Μια άλλη κατηγορία ενώσεων που μελετήθηκε κρυσταλλογραφικά είναι ανάλογα σπειρο-ισοξαζολών (πίνακας 9), η σύνθεση των οποίων πραγματοποιήθηκε από τους συνεργάτες μας στο Université Claude-Bernard Lyon 1 στη Γαλλία και συγκεκριμένα στο εργαστήριο οργανικής σύνθεσης του Dr Jean Pierre Praly. Τα κινητικά πειράματα αυτών των αναλόγων γλυκόζης πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών από την Κατερίνα Χατζησταματίου υπό την επίβλεψη της Δρ Ε. Χρυσίνα στο πλαίσιο της ερευνητικής της εργασίας για την απόκτηση μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης με υπεύθυνη την καθ. Α. Σιαφάκα-Καπάδαη.[60] Για την ερμηνεία του τρόπου δράσης των ενώσεων πραγματοποιήθηκαν κρυσταλλογραφικές μελέτες με τη χρήση ακτίνων Χ συγχροτρονικής ακτινοβολίας. Για τις ενώσεις DCG169 και DCGi46 τα δεδομένα συλλέχθηκαν στο PETRA III, σταθμός εργασίας P14 στο EMBL-Hamburg-Unit, στο Αμβούργο της Γερμανίας υπό συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου, ενώ για την ένωση DCGi42 η συλλογή έγινε στον σταθμό I04 στο Diamond Light Source στην Οξφόρδη, Αγγλία, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

DCG169



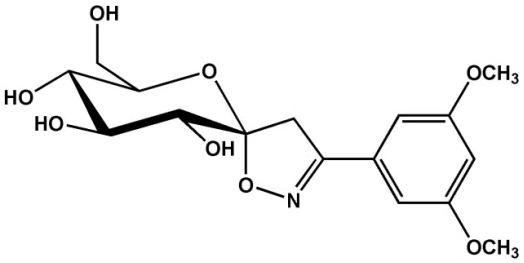
[I]: 5-10-20-50-100 μM
IC_{50}= 27,7 ± 1,7 μM

DCGi42



[I]: 0.5-1-5μM
IC_{50}= 5,6 ± 0,7 μM

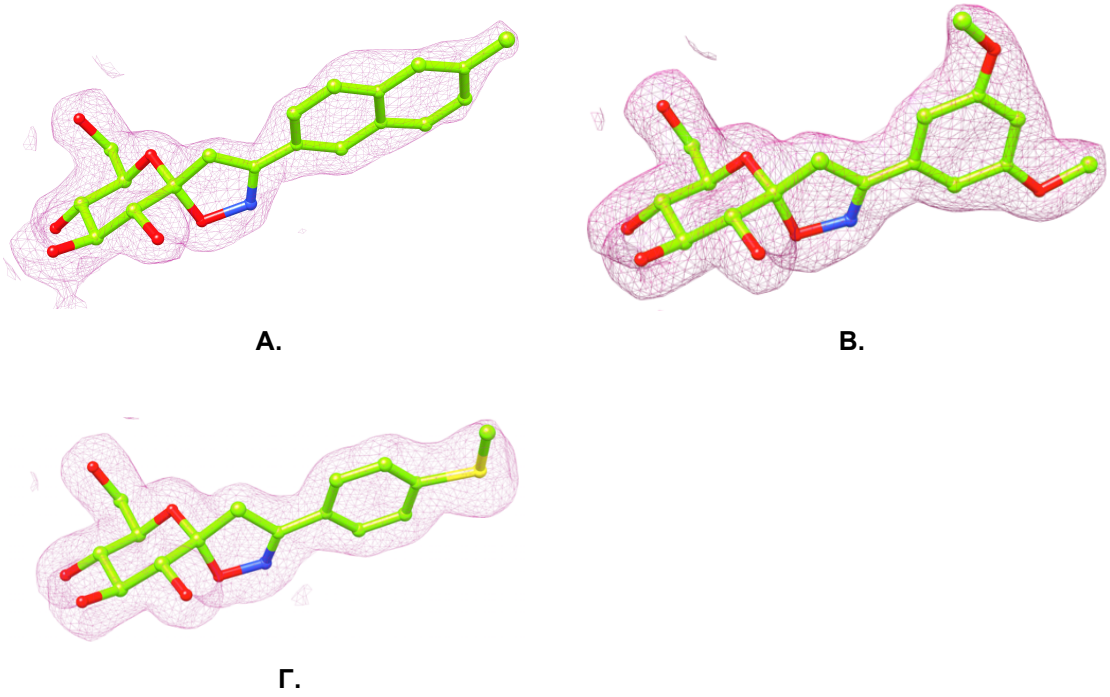
DCGi46



[I]: 5-50-100-150-500 μM
IC_{50}= 324,7 ± 24,1 μM

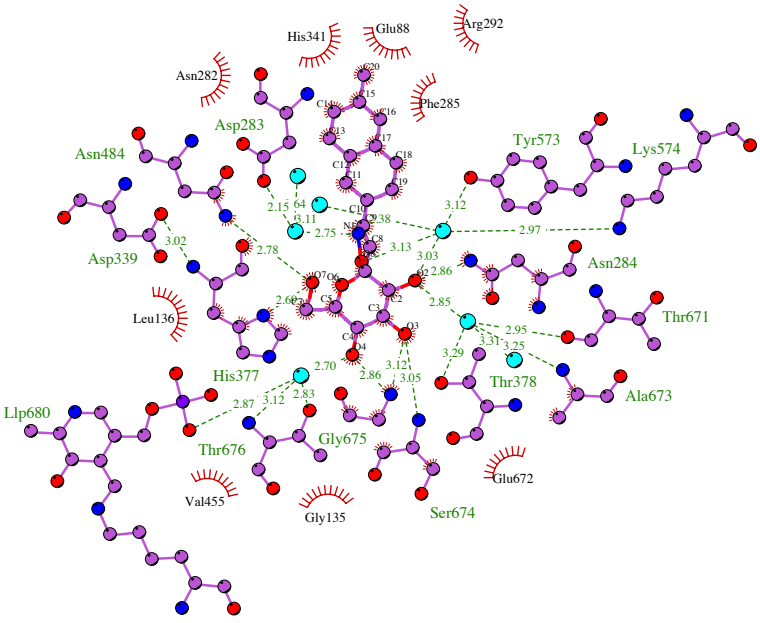
Πίνακας 9.: Τα ανάλογα γλυκόζης των σπειροισοξαζολών που μελετήθηκαν κρυσταλλογραφικά.

Ο σχηματισμός των συμπλόκων και των τριών αναλόγων γλυκόζης που μελετήθηκαν (DCG169, DCGi46 και DCGi42) με την RMGP*b* πραγματοποιήθηκε με εμποτισμό μονοκρυστάλλου του ενζύμου στην T διαμόρφωση με διάλυμα 5 έως 10 mM της κάθε ένωσης παρουσία 20% DMSO. Τα στατιστικά στοιχεία συλλογής δεδομένων για όλα τα σύμπλοκα παρουσιάζονται στους πίνακες Π1 έως Π3 του παραρτήματος. Υπολογισμός των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o$-F_c των ενώσεων αυτών έδειξε ότι όλες συνδέονται ικανοποιητικά στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (Σχήμα 28).

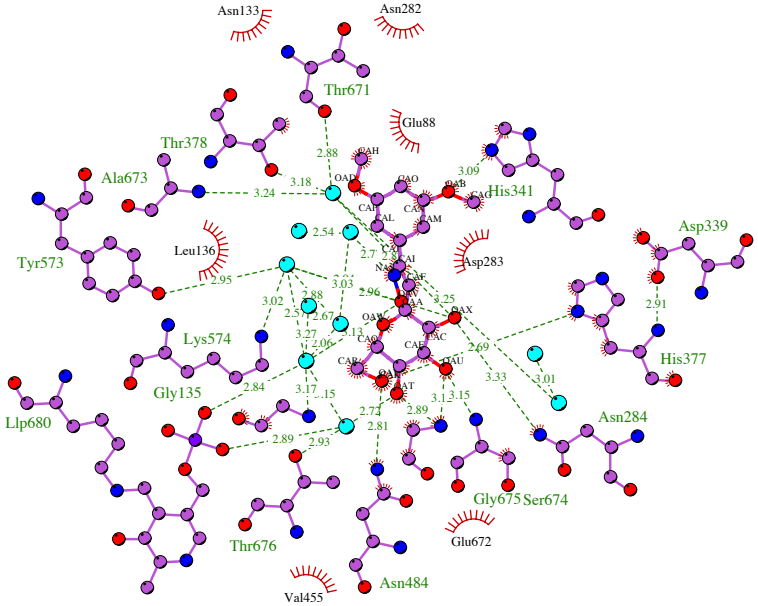


Σχήμα 28: Σχηματική αναπαράσταση του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας 2Fo-Fc της ένωσης DCG169 (A), DCGi46 (B) και DCGi42 (Γ) στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*.

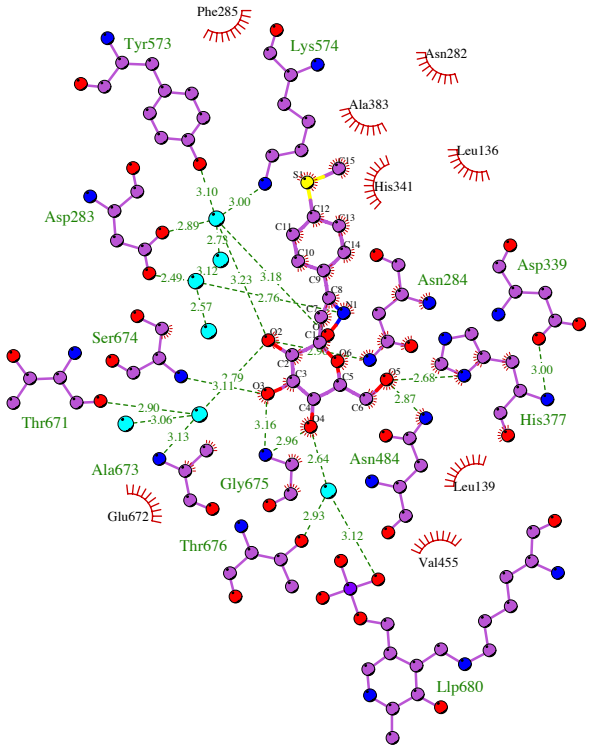
Όλες οι ενώσεις βρίσκονται στο στάδιο της βελτιστοποίησης και γι' αυτό παρατίθενται τα τρέχοντα στατιστικά στοιχεία που αφορούν την ποιότητα του μοντέλου καθώς και οι αλληλεπιδράσεις των προσδετών όπως αυτές αποτυπώνονται σε αυτό το στάδιο (Σχήμα 29).



A.



B.

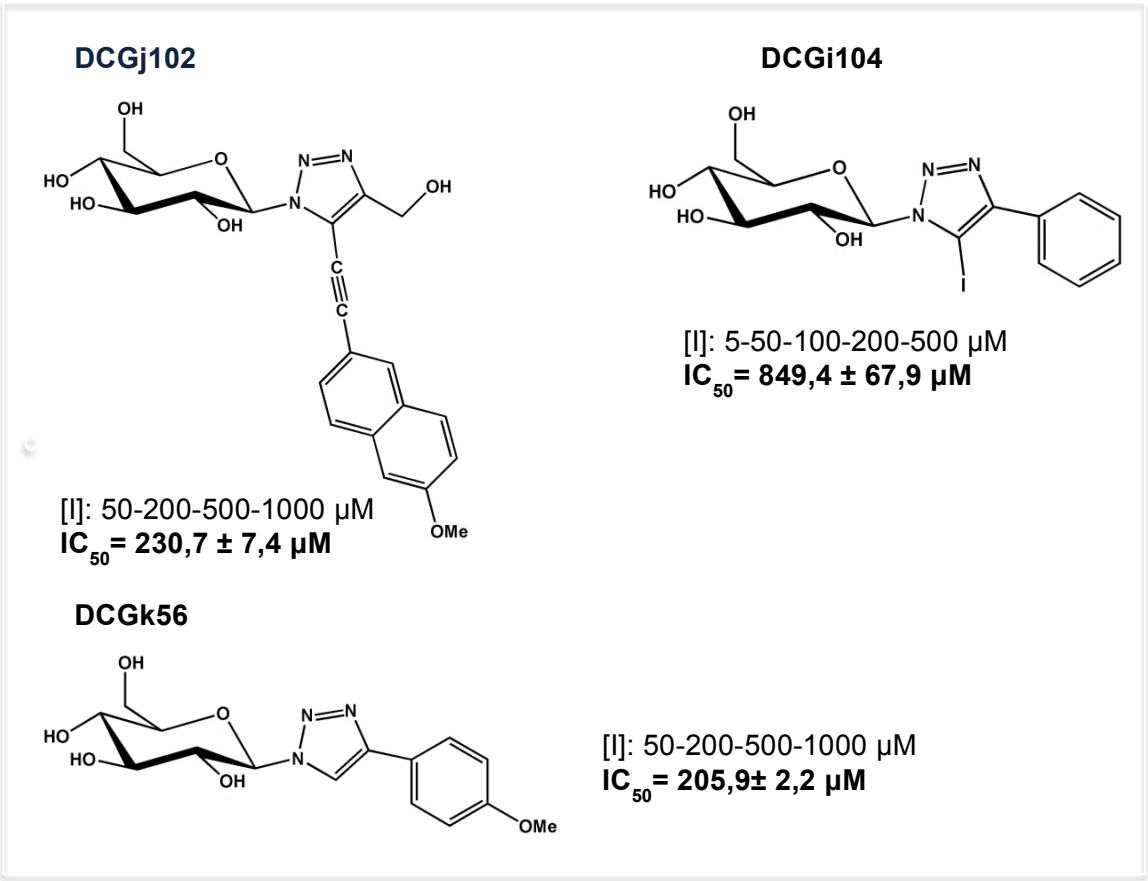


Γ.

Σχήμα 29 : Διδιάστατη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων των ενώσεων DCG169 (A), DCGi46 (B) και DCGi42 (Γ) της RMGP*b* με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου.

4.4 Δομικές μελέτες για τις 1-γλυκοπυρανοζυλο-5-αλογονο-1,2,3-τριαζόλια

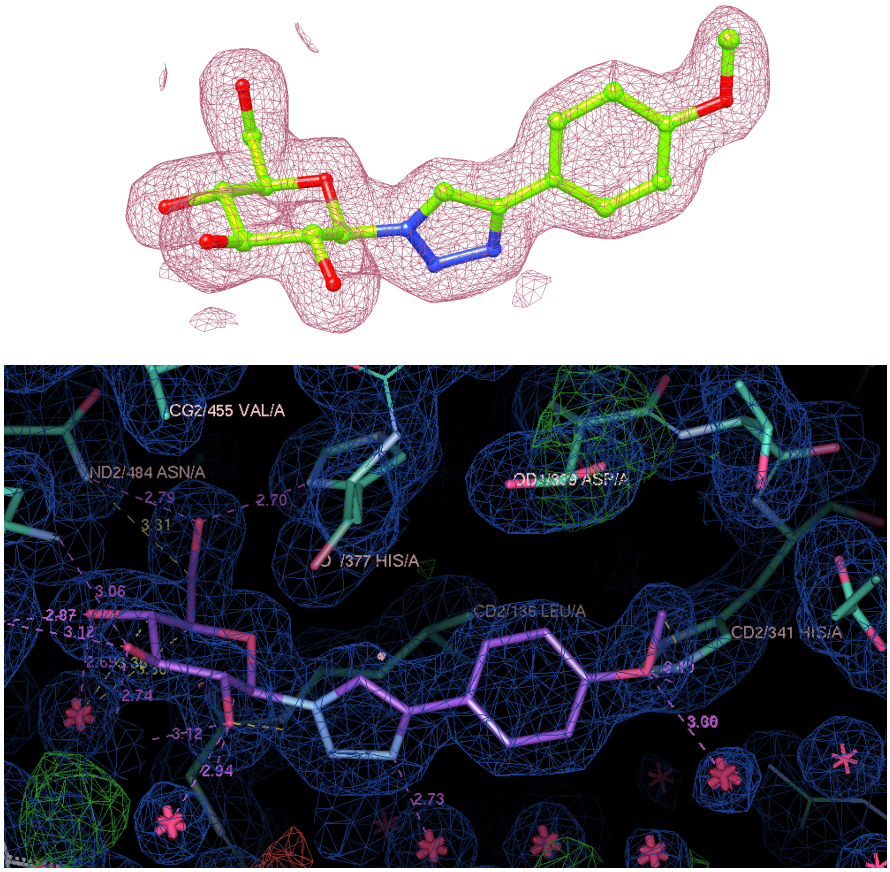
Μια άλλη κατηγορία ενώσεων που μελετήθηκε κρυσταλλογραφικά είναι ανάλογα 5,5'-δις-1,2,3- τριαζολίων (πίνακας 10), η σύνθεση των οποίων πραγματοποιήθηκε επίσης από τον Dr. Jean-Pierre Praly και τους συνεργάτες του. Όπως και στην προηγούμενη κατηγορία, τα κινητικά πειράματα αυτών των παραγώγων γλυκόζης πραγματοποιήθηκαν από την κα Χατζησταματίου στο πλαίσιο της ερευνητικής της εργασίας για την απόκτηση μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης.[37] Ο τρόπος σύνδεσης των ενώσεων διερευνήθηκε με πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ συγχροτρονικής ακτινοβολίας. Τα δεδομένα περίθλασης συλλέχθηκαν στο PETRA III, σταθμός εργασίας P14 στο EMBL-Hamburg-Unit, στο Αμβούργο υπό συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου.



Πίνακας 10. : Τα ανάλογα γλυκόζης των 5,5'-δις-1,2,3- τριαζολίων που μελετήθηκαν κρυσταλλογραφικά.

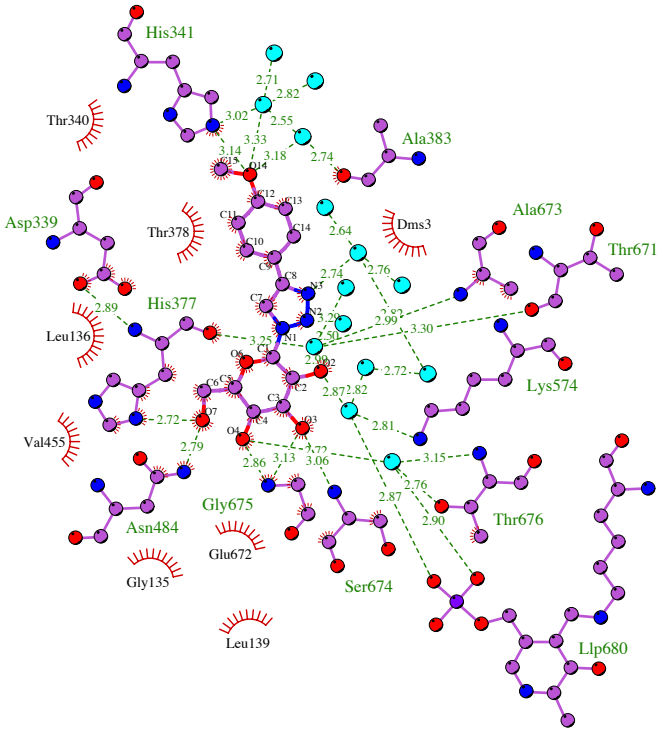
Ο σχηματισμός του συμπλόκου των ενώσεων που μελετήθηκαν με το ένζυμο έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε και προηγούμενα με χρήση διαλύματος 10 mM της κάθε ένωσης παρουσία 20% DMSO. Τα αποτελέσματα επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων παρουσιάζονται στους πίνακες Π4 έως Π6 του παραρτήματος. Οι δε δομές των συμπλόκων για την μεν ένωση **DCGk56** είναι στο στάδιο βελτιστοποίησης ενώ για τις άλλες δύο παρατηρήθηκε ανακολουθία του στερεοχημικού τους τύπου με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα αυτών όπως υπολογίσθηκε από το χάρτη διαφοράς 2Fo-Fc.

Ειδικότερα, η ένωση DCGk56 συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*, όπως μας έδειξε ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o$-F_c. Παράλληλα, παρουσιάζεται και ο τρόπος σύνδεσης του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. (Σχήμα 30)



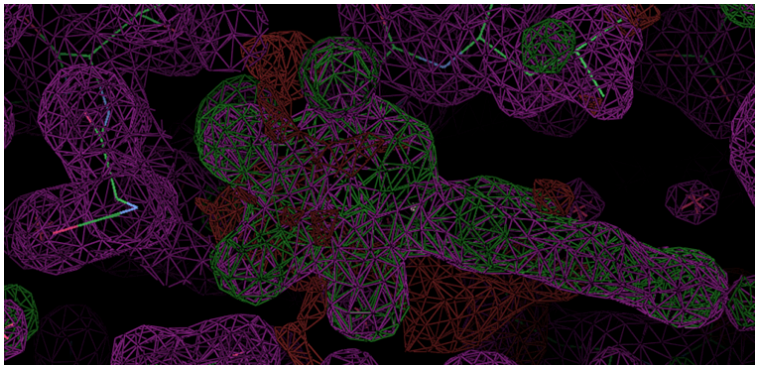
Σχήμα 30: Σχηματική αναπαράσταση του 2Fo-Fc χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης DCGk56 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*.

Επίσης παρατίθενται οι αλληλεπιδράσεις της ένωσης με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου (Σχήμα 31) .



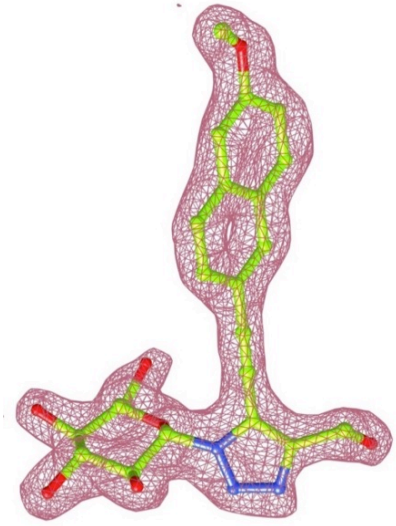
Σχήμα 31: Διδιάστατη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης DCGk56 της RMGP*b* με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου.

Για την ένωση **DCGj102** ο υπολογισμός χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o$-F_c έδειξε ότι παρατηρήθηκε μεν πρόσθετη πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, ωστόσο, η προσπάθεια προσαρμογής αυτού στην πυκνότητα δεν ήταν επιτυχής, αφού δεν αντιστοιχούσε στη χημική ένωση που υπέδειξαν οι οργανικοί συνθετικοί χημικοί. (Σχήμα 32)



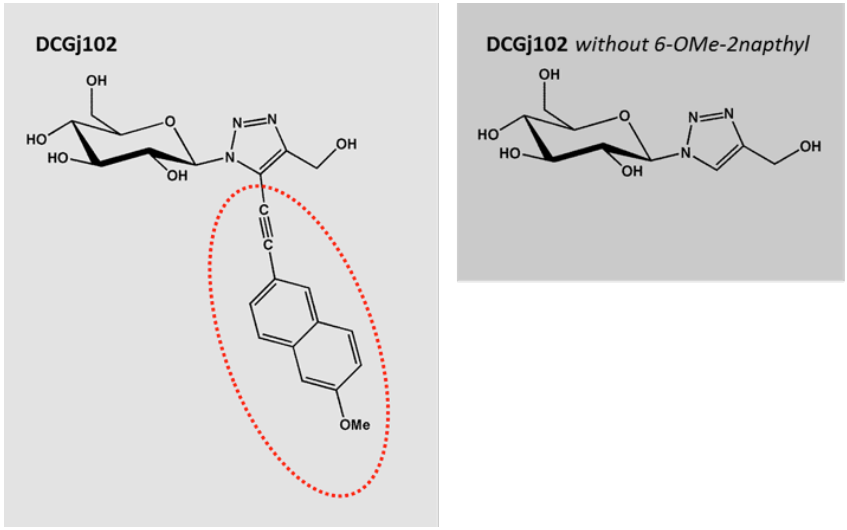
Σχήμα 32: Η πρόσθετη πυκνότητα που υπάρχει στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου όπως αυτή φαίνεται μέσω του προγράμματος WinCoot.

Επιπρόσθετα, ο υπολογισμός χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o$-F_c έδειξε ότι η ένωση προσδένεται στο νεό αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου (Σχήμα 33).



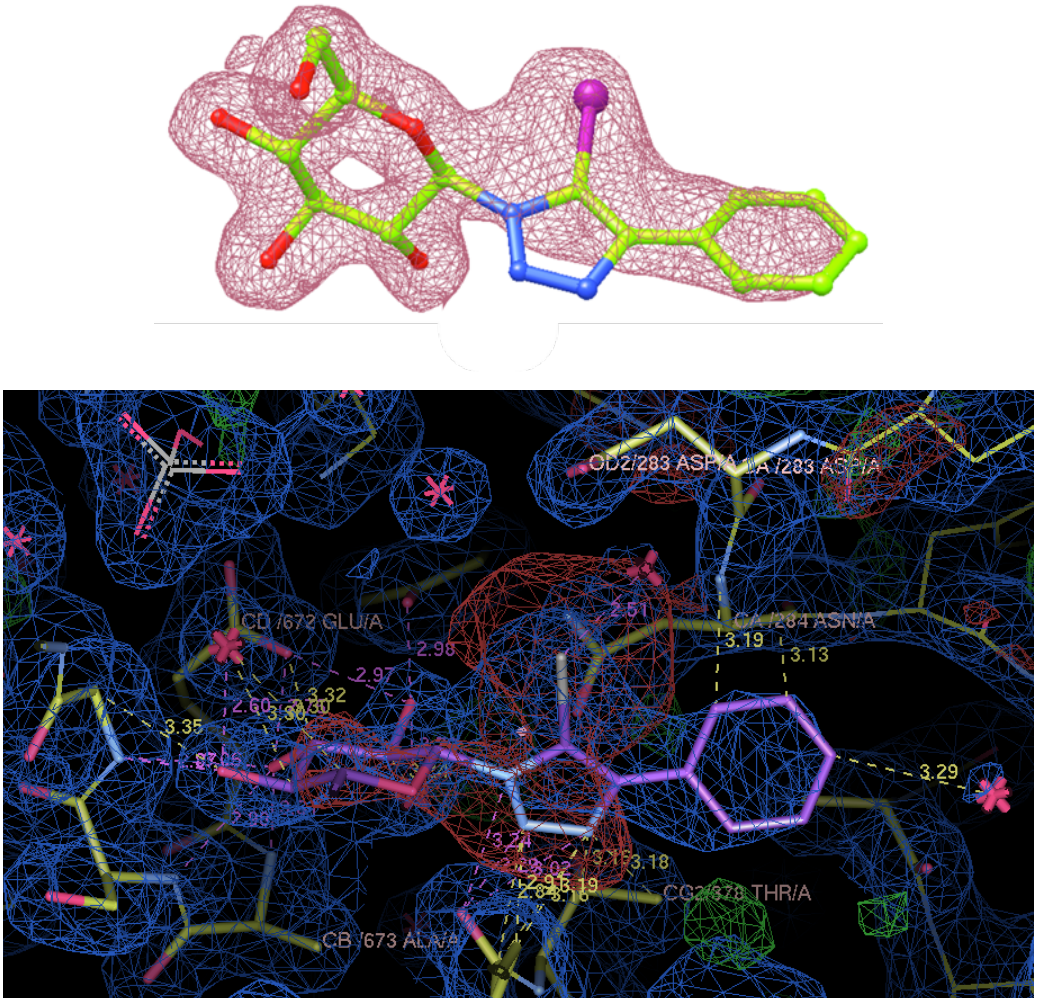
Σχήμα 33: Σχηματική αναπαράσταση του 2Fo-Fc χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης DCGj102 στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP*b*.

Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η ένωση που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου μοιάζει με την DCGj102 που προσδένεται στο νεό αλλοστερικό με τη διαφορά ότι λείπει η ομάδα 6-OMe-2naphthyl. (Σχήμα 34).



Σχήμα 34.: Δεξιά. Παρουσιάζεται η ένωση DCGj102 που έχει προσδεθεί στο νέο αλλοστερικό κέντρο και υποδεικνύεται η ομάδα 6-OMe-2naphthyl. Αριστερά. Η ένωση που φαίνεται να έχει προσδεθεί στο καταλυτικό κέντρο η οποία μοιάζει με την DCGj102, χωρίς την ομάδα 6-OMe-2naphthyl.

Αντίστοιχα προβλήματα παρατηρήθηκαν και για την ένωση **DCGi104.** Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πρόσθετη πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου η οποία φαίνεται ότι δεν ανταποκρίνεται στη χημική δομή της ένωσης DCGi104 (Σχήμα 35).



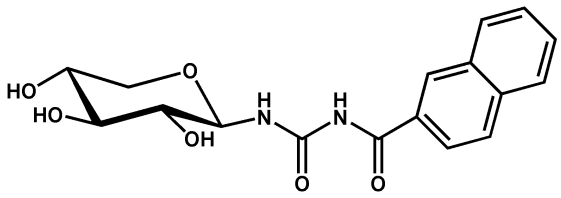
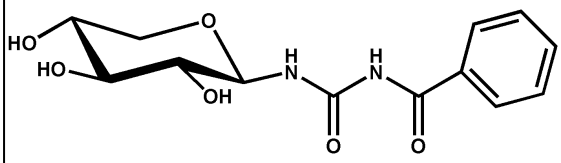
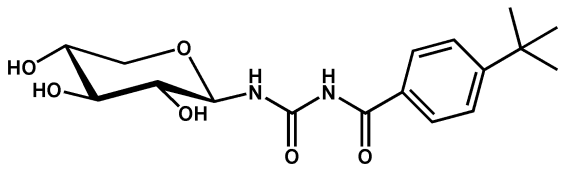
Σχήμα 35: Σχηματική αναπαράσταση του 2Fo-Fc χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης DCGi104 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*.

4.5 Δομικές μελέτες για τα N-ακυλο-*N'*-*β*-D-ξυλοπυρανόζυλο ουρίες

Τα κέντρα σύνδεσης της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου όπως αναφέρθηκε είναι διακριτά και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το σχεδιασμό ενώσεων, ικανών να αναστείλουν τη λειτουργία του ενζύμου. Οι πρώτες ενώσεις που μελετήθηκαν ήταν παράγωγα γλυκόζης καθώς αυτά

συνδέονται ειδικά στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου λόγω της παρουσίας του δακτυλίου της γλυκοπυρανόζης. Αυτά τα παράγωγα φέρουν υποκασταστάτες τόσο στην α- όσο και στην β- θέση του C1 και όπως έχει αποδειχθεί από τις μέχρι σήμερα μελέτες κατά μήκος του β καναλιού του ενζύμου.

Με βάση τις *N*-ακυλο-*β*-D- γλυκοπυρανοζυλο ουρίες που εμφάνισαν υψηλή αναστολή του ενζύμου και οι κρυσταλλογραφικές μελέτες αυτών έδειξαν ότι προσδένονται ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*, ο Prof. Laszlo Somsak και οι συνεργάτες του από το Τμήμα Οργανικής Χημεία του Πανεπιστημίου Debrecen, της Ουγγαρίας συνέθεσαν ανάλογα ξυλόζης με σκοπό να διερευνηθούν ως πιθανοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. (Πίνακας 11). Τα κινητικά πειράματα αυτών των αναλόγων πραγματοποιήθηκαν από τους συνεργάτες του Prof. Somsak επίσης στην Ουγγαρία.[58] Αν και παλαιότερα είχαν μελετηθεί παράγωγα ξυλόζης ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, δεν είχε δείξει καμμία από τις ενώσεις ικανοποιητική αναστολή [59].

KB263  **K_i= 175 ± 7μM**	**KB264** 
KB283  **K_i= 350 ± 3μM**	

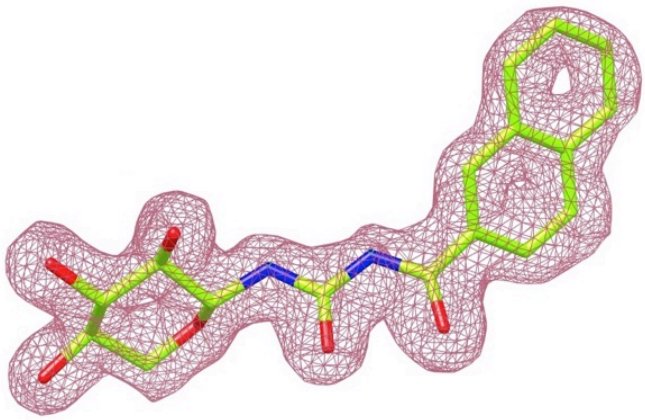
Πίνακας 11: Τα ανάλογα ξυλόζης που μελετήθηκαν κρυσταλλογραφικά ως αναστολείς της RMGP*b* και οι τιμές K_i αυτών.

Είναι η πρώτη φορά που ανάλογα ξυλόζης που χρησιμοποιήθηκαν ως αναστολείς της RMGP*b* προσδέθηκαν σε κάποιο από τα κέντρα της. Για την

ερμηνεία του τρόπου σύνδεσης και δράσης των παραγώγων ξυλόζης πραγματοποιήθηκαν κρυσταλλογραφικές μελέτες με τη χρήση ακτίνων-Χ συγχροτρονικής ακτινοβολίας στο σταθμό PETRA III, στην πηγή P14 στο EMBL-Hamburg Unit, στο Αμβούργο υπό συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου. Ο σχηματισμός των συμπλόκων και των τριών αναλόγων γλυκόζης που μελετήθηκαν (KB263, KB283 και KB264) με την RMGP*b* πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση μονοκρυστάλλου της RMGP*b* στην T διαμόρφωση σε διάλυμα 5 mM της κάθε ένωσης παρουσία 20 % DMSO.

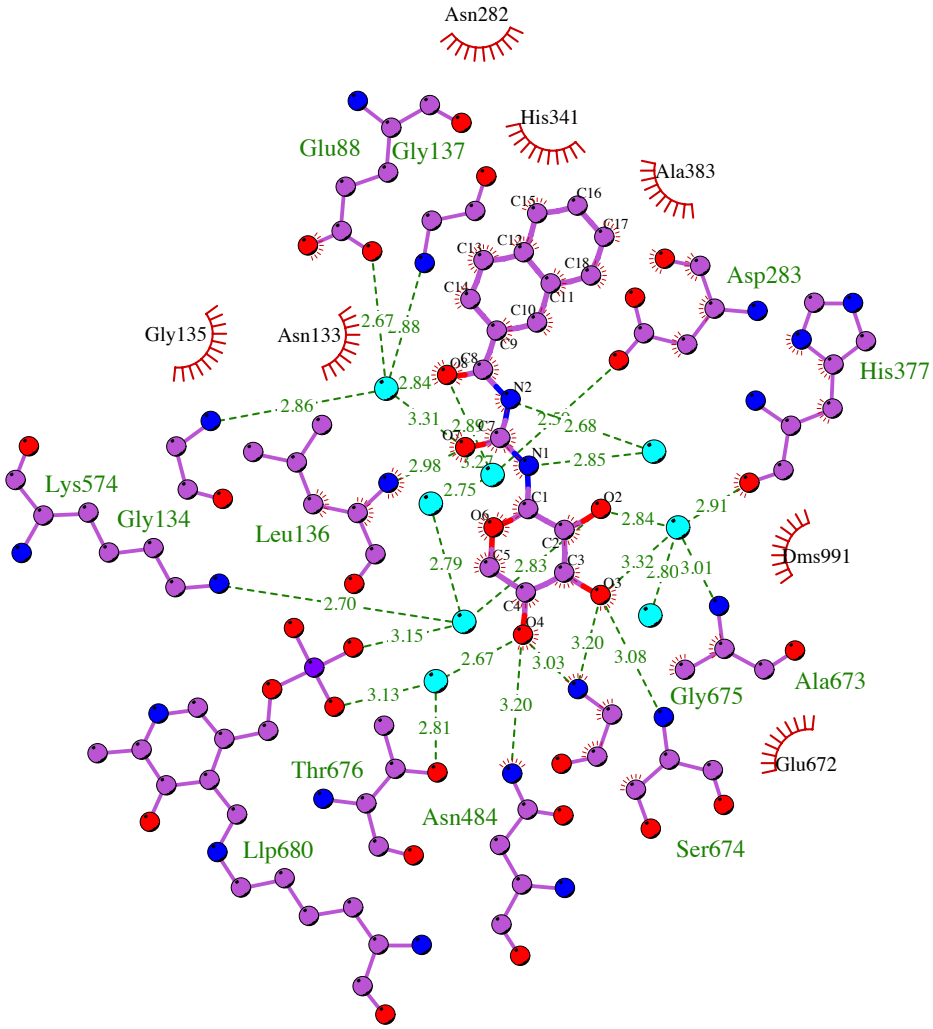
Συγκεκριμένα για την ένωση **KB263** πραγματοποιήθηκε εμποτισμός μονοκρυστάλλου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στην T διαμόρφωση με διάλυμα 5 mM για 11 μέρες και 8 ώρες. Τα αποτελέσματα επεξεργασίας και βελτιστοποίησης των κρυσταλλογραφικών δεδομένων παρουσιάζονται στον πίνακα Π7.

Η τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου RMGP*b*:KB263 αποκάλυψε ότι η ένωση συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου όπως υπέδειξε ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o$-F_c. (Σχήμα 36)



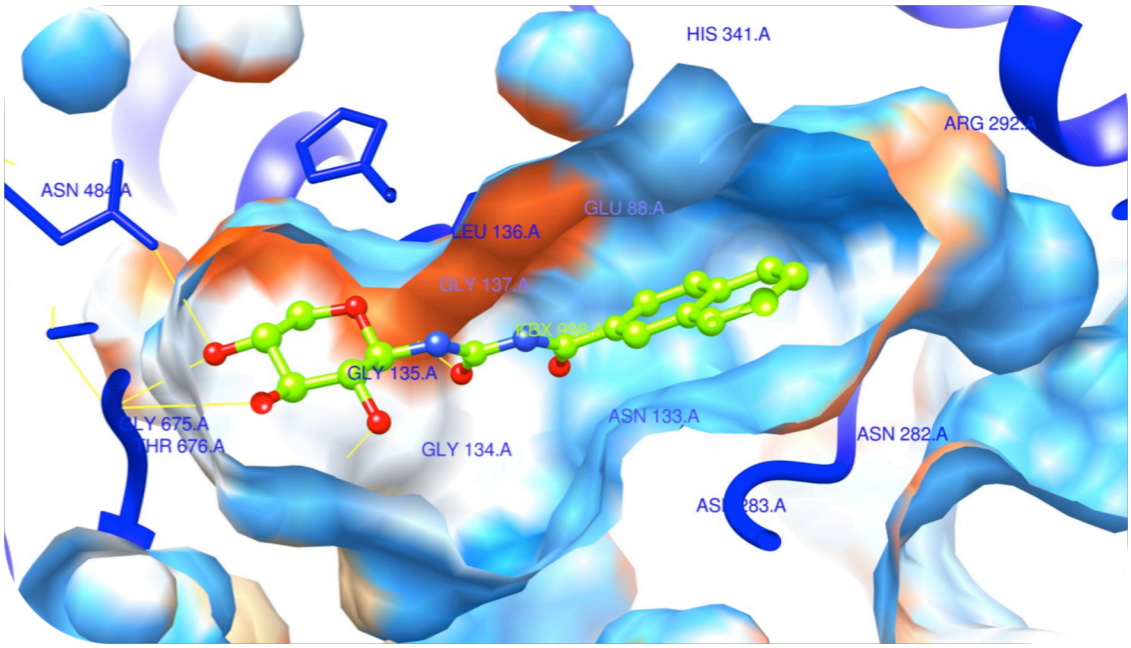
Σχήμα 36: Σχηματική αναπαράσταση του 2Fo-Fc χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης KB263 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*.

Η ένωση KB263 σταθεροποιεί τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο σχηματίζοντας ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων με το περιβάλλον (18 δεσμοί υδρογόνου και 101 Van der Waals αλληλεπιδράσεις) (Πίνακες Π8 έως Π10 και Σχήμα 37).

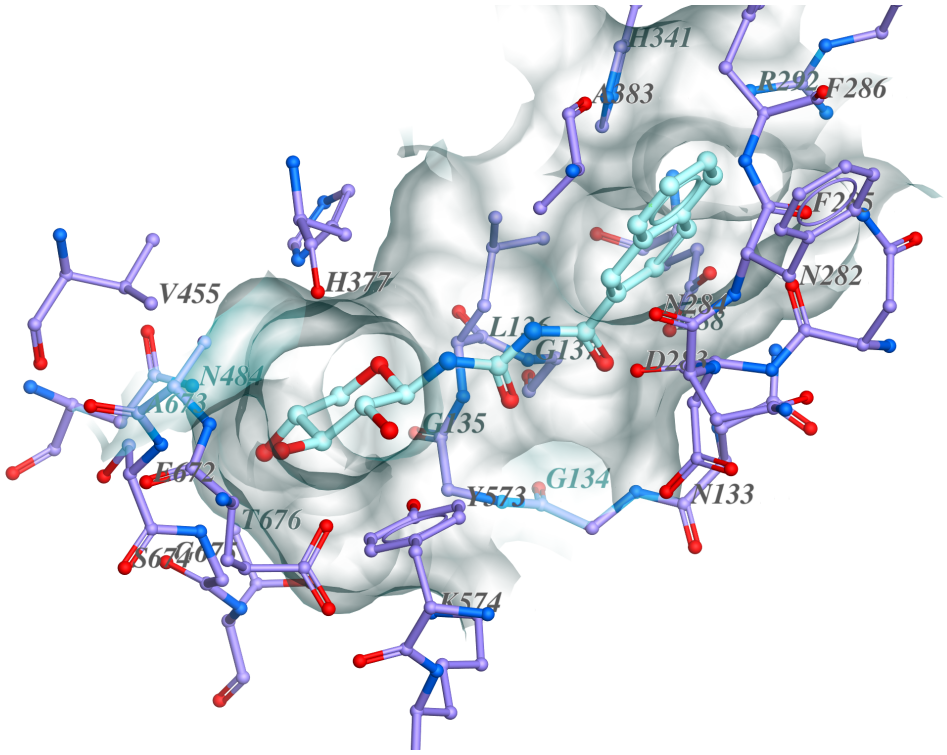


Σχήμα 37: Διδιάστατη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης KB263 με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b*.

Παρατηρείται ότι το αρωματικό τμήμα της ένωσης εντοπίζεται στην περιοχή του β-υποκέντρου όπως ακριβώς και στην αντίστοιχη ένωση του γλυκοπυρανοζιτικού παραγώγου (Σχήματα 38, 39). Τα αμινοξέα που συνθέτουν το καταλυτικό κέντρο δεν παρουσιάζουν μεταβολές πέραν της His377 όπου η πλευρική της αλυσίδα στρέφεται (δίεδρη γωνία χ2 στρέφεται κατά ~20^{o}) μια και απουσιάζει η ομάδα –CH_2-CH_2OH.



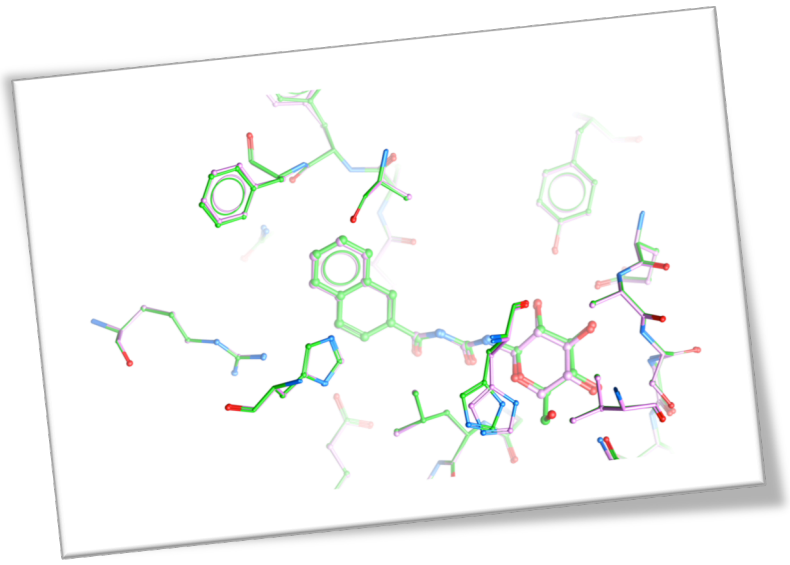
A



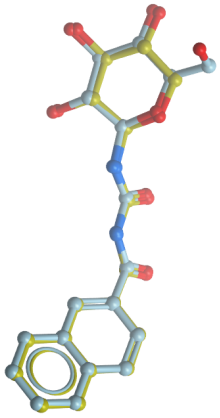
B.

Σχήμα 38. Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης της KB263 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Α. Μοριακή επιφάνεια του ενζύμου στην οποία αποτυπώνονται οι θετικά (με κόκκινο χρώμα), οι αρνητικά (με μπλέ) και οι ουδέτερα (με λευκό) φορτισμένες περιοχές του καταλυτικού καναλιού. Β. Άλλη όψη του καταλυτικού καναλιού. Έμφαση δίδεται στη διαμόρφωση που λαμβάνει ο βρόχος 280s (πορτοκαλί) ως προς τη ναφθυλομάδα του ξυλοπυρανοζιτικού παραγώγου.

Κατά τη σύνδεση της ένωσης στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου παρατηρούνται μικρές μόνο διαφορές σε σχέση με το αντίστοιχο ανάλογο γλυκόζης (Σχήματα 39, 40).



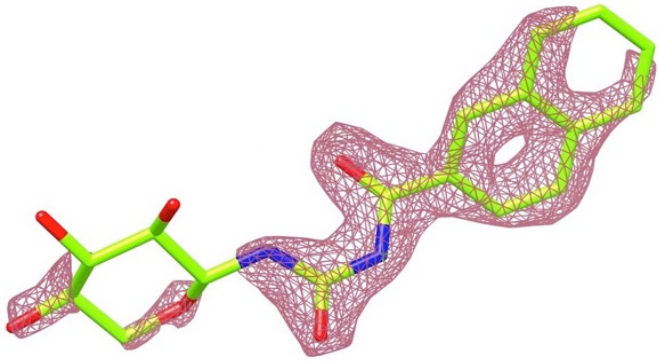
Σχήμα 39.: Υπέρθεση της ένωσης KB263 (πράσινο) με το αντίστοιχο γλυκοπυρανοζιτικό ανάλογο (ροζ) κατά τη σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*.



Σχήμα 40.: Υπέρθεση του ένωσης KB263 (κίτρινο) με το αντίστοιχο γλυκοπυρανοζιτικό ανάλογο (κυανό) στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*.

Για την ένωση KB263 παρατηρήθηκε πρόσθετη πυκνότητα στο νέο αλλοστερικό κέντρο (σχήμα 28) η οποία όμως ήταν αρκετή να φιλοξενήσει μέρος μόνο της ένωσης όπου τα άτομα της ουρίας βρίσκονται σε *cis*

διαμόρφωση. Η πυκνότητα στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου είναι αρκετά ασθενής και εντοπίζεται κυρίως στο αρωματικό τμήμα της ένωσης. (Σχήμα 41)

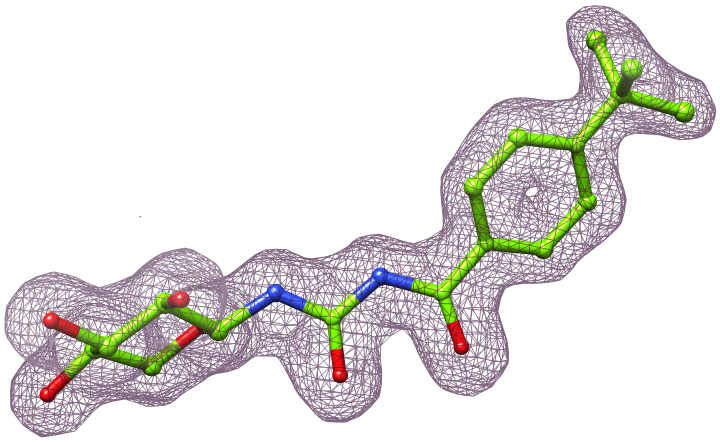


Σχήμα 41.: Σχηματική αναπαράσταση του 2Fo-Fc χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης KB263 στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP*b*.

Κατά τη σύνδεσή της στο νέο αλλοστερικό κέντρο, η ένωση σχηματίζει περιορισμένο αριθμό δεσμών υδρογόνου, ενώ οι Van der Walls αλληλεπιδράσεις είναι εκτεταμένες. Οι αλληλεπιδράσεις συνοψίζονται στους πίνακες Π11 έως Π13.

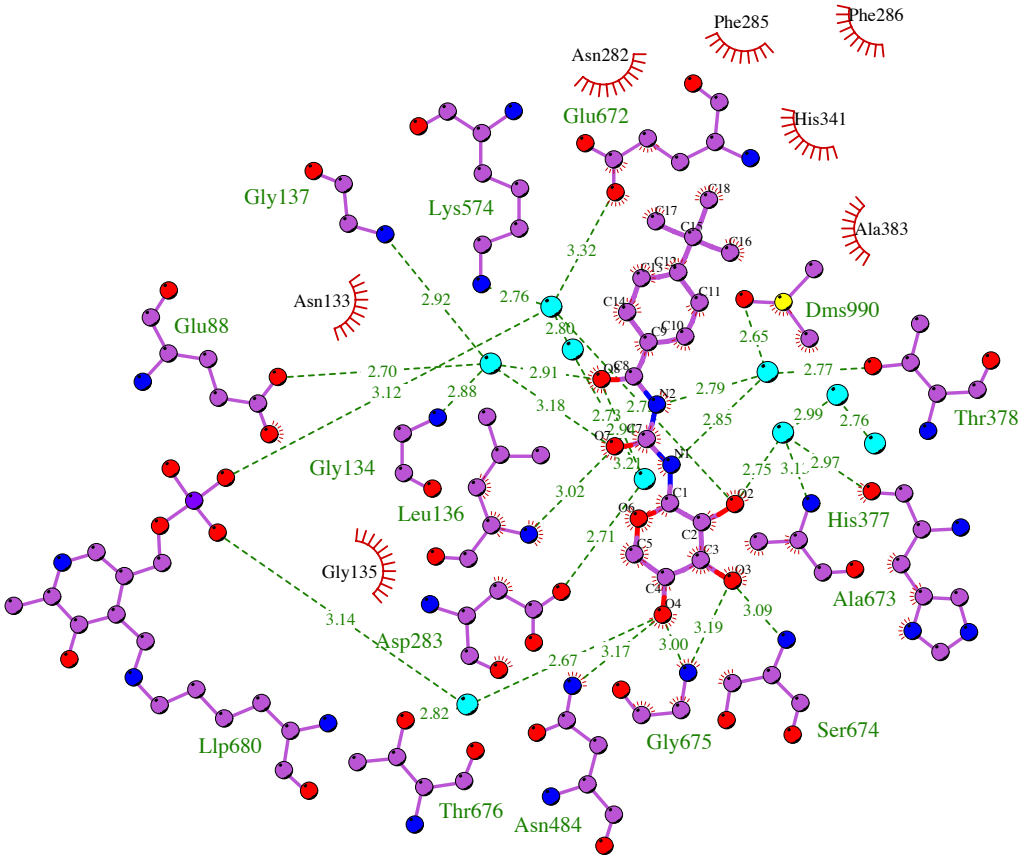
Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα για την ένωση KB283. Η εμβάπτιση του κρυστάλλου σε διάλυμα 5 mM της ένωσης παρουσία 20% DMSO διήρκεσε 12 μέρες. Τα αποτελέσματα επεξεργασίας και βελτιστοποίησης των κρυσταλλογραφικών δεδομένων παρουσιάζονται στον πίνακα Π14.

Ειδικότερα, υπολογισμός του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o$-F_c έδειξε πρόσθετη πυκνότητα στο β κανάλι, ικανή να φιλοξενήσει την ένωση KB283 (Σχήμα 42).



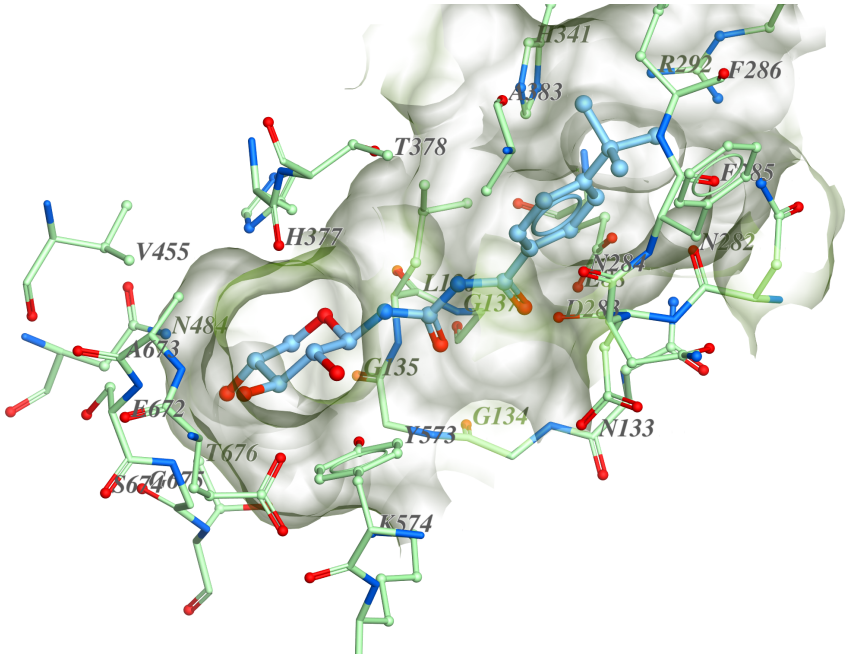
Σχήμα 42: Σχηματική αναπαράσταση του 2Fo-Fc χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης KB283 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*.

Συνολικά σχηματίζονται 17 δεσμοί υδρογόνου και 88 αλληλεπιδράσεις Van der Waals αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα που συνθέτουν το καταλυτικό κέντρο. (πίνακες Π15 έως Π17, Σχήμα 43)



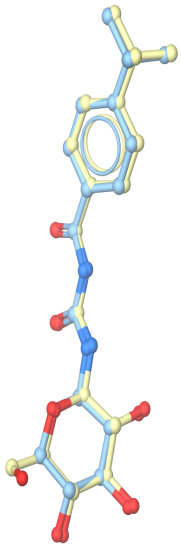
Σχήμα 43: Διδιάστατη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης KB283 με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b*.

Η τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου RMGP*b*:KB283 αποκάλυψε ότι η ένωση συνδέεται κατά μήκος του ενεργού κέντρο και εκτείνεται μέχρι την περιοχή του β-υποκέντρου με το αρωματικό τμήμα αυτής να προσανατολίζεται στην πιο απομακρυσμένη από το διαλύτη περιοχή (Σχήμα 44).



Σχήμα 44.: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης της KB283 στο καταλυτικό κέντρο τα ενζύμου

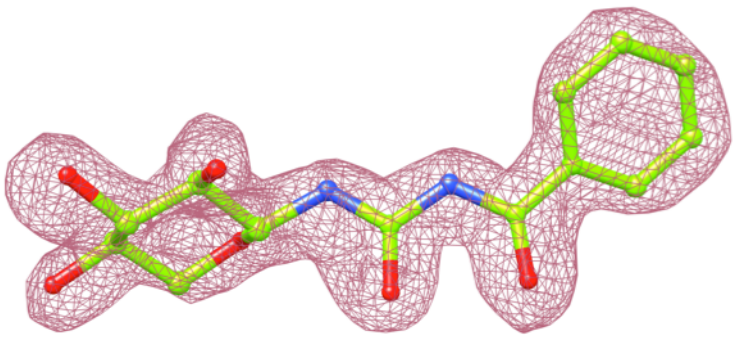
Κατά τη σύνδεση της ένωσης στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου παρατηρούνται μικρές μόνο διαφορές σε σχέση με το αντίστοιχο ανάλογο γλυκόζης, τόσο στη θέση που προσδένονται οι δύο αναστολείς όσο και στο περιβάλλον αυτών, αντίστοιχες με την ένωση KB263. Πιο συγκεκριμένα οι αλλαγές εντοπίζονται στην ιστιδίνη 377 η πλευρική αλυσίδα της οποίας αλλάζει διαμόρφωση λόγω της απουσίας της ομάδας $–CH_2-CHOH$ (Σχήμα 45).



Σχήμα 45.: Υπέρθεση του ένωσης KB283 (κυανό) με το αντίστοιχο γλυκοπυρανοζιτικό ανάλογο (υποκίτρινο) κατά τη σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*.

Για την ένωση **KB264** ο σχηματισμός του συμπλόκου έγινε με εμβάπτιση του αναστολέα σε διάλυμα περιεκτικότητας 5mM ένωσης για 5 μέρες, 17 ώρες και 40 λεπτά. Η ένωση, αντίστοιχα με το γλυκοπυρανοζιτικό ανάλογο συνδέεται ισχυρά όπως υποδεικνύει ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Τα αποτελέσματα επεξεργασίας και βελτιστοποίησης των κρυσταλλογραφικών δεδομένων παρουσιάζονται στον πίνακα Π18.

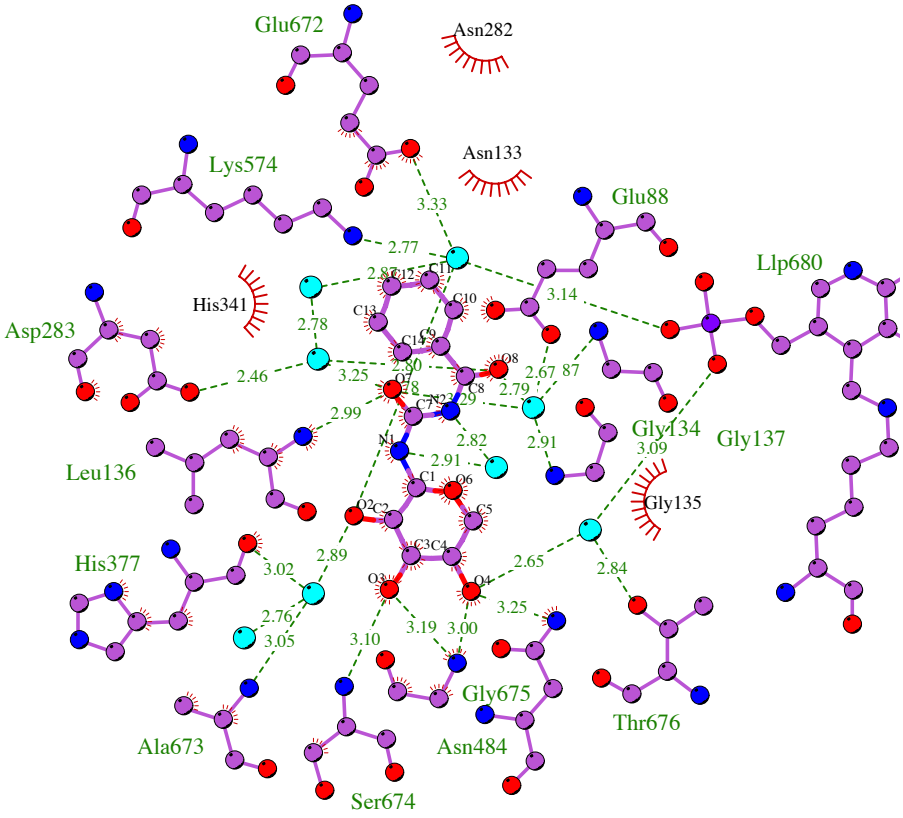
Η τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου RMGP*b*:KB264 αποκάλυψε ότι η ένωση συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου όπως έδειξε ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o$-F_c. (Σχήμα 46)



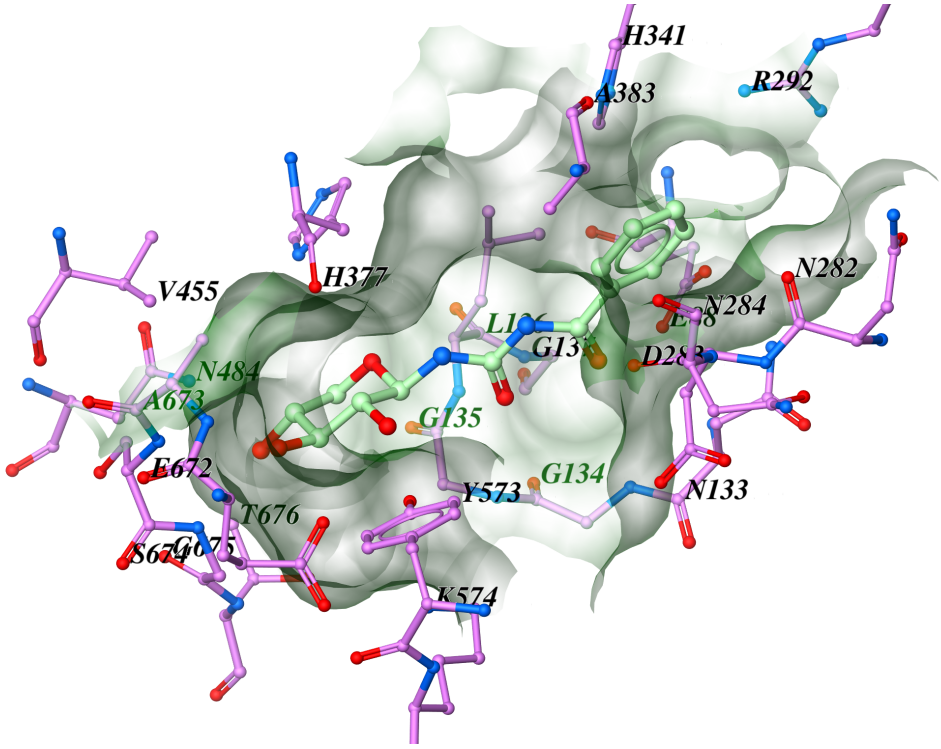
Σχήμα 46: Σχηματική αναπαράσταση του 2Fo-Fc χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της ένωσης KB264 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*

Συνολικά σχηματίζονται 15 δεσμοί υδρογόνου και 100 αλληλεπιδράσεις Van der Wals αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα που συνθέτουν το καταλυτικό κέντρο. (πίνακες Π19, 20 , 21, Σχήμα 47) .

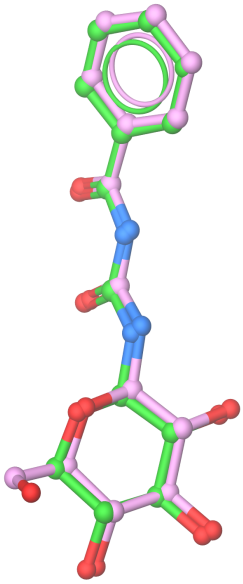
Και αυτή η ένωση συνδέεται με παρεμφερή τρόπο όπως και οι προηγούμενες εκμεταλλευόμενη το μικτό περιβάλλον του καταλυτικού κέντρου (Σχήμα 48). Υπέρθεση της ένωσης KB264 ως συμπλόκου με την RMGPb με την αντίστοιχη δομή του γλυκοπυρανοζιτικού παραγώγου έδειξε ότι οι διαφορές εντοπίζονται και πάλι στην περιοχή που φέρει ως προσδέτη το γλυκοπουρανοζιτικό δακτύλιο έδειξε ότι οι διαφορές εντοπίζονται και σε αυτήν την περίπτωση στην πλευρική αλυσίδα της His377 και τη Thr378 (Σχήμα 49).



Σχήμα 47.: Διδιάστατη σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης KB264 με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b*.



Σχήμα 48. Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης της KB264 στο καταλυτικό κέντρο τα ενζύμου



Σχήμα 49.: Υπέρθεση του ένωσης KB264 (πράσινο) με το αντίστοιχο γλυκοπυρανοζιτικό ανάλογο (μωβ) κατά τη σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*

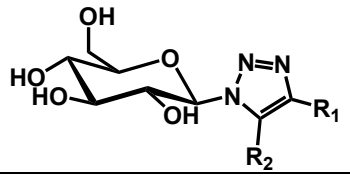
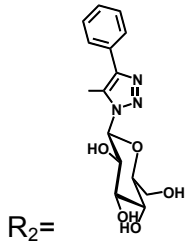
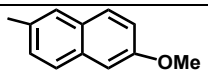
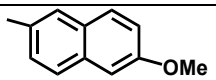
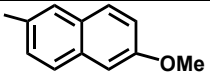
Συμπεράσματα

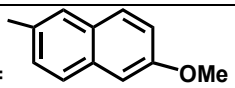
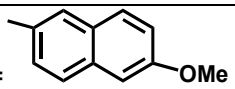
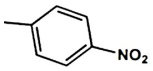
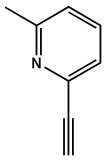
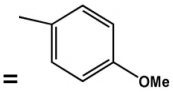
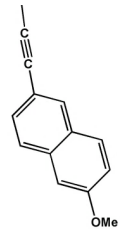
Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας διεξήχθησαν κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα παραγώγων γλυκόζης αλλά και ξυλόζης ανάλογα με το στάδιο στο οποίο βρισκόνταν η έρευνα που αφορούσε τις ενώσεις που εξετάσθηκαν εφαρμόζοντας στάδια της μεθόδου του κατευθυνόμενου-από τη δομή-σχεδιασμού δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων.

Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες παραγώγων του 1,2,3-τριαζολίου, τα οποία σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να διερευνηθεί αν η σύνδεση ενός προσδέτη ευνοείται και εάν καταλαμβάνεται και ο χώρος του α-υποκέντρου. Από αυτές, την ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι της RMGP*b* επέδειξε η ένωση DCGk58 με IC_{50}= 244.8 μM, η οποία έφερε μια υποκατεστημένη ομάδα νιτροφαινυλίου στη θέση *para* ενώ είχε απαλοιφθεί η ομάδα αλκινίου προς το α-υποκέντρο. Αντικατάσταση της νιτρο- ομάδας με ομάδα μεθυλίου, ένωση DCGk56, ευνόησε ελαφρώς την ανασταλτική δράση του ενζύμου με IC_{50}=205.9μM. Παρεμφερής ήταν και η αναστολή που επέδειξε η ένωση Wsj190b-2 όπου ο δακτύλιος του τριαζολίου έφερε έναν υποκατεστημένο με ομάδα αλκινίου δακτύλιο πυριδίνης. Οι υπόλοιπες ενώσεις δεν ανέστειλαν καθόλου τη δράση του ενζύμου. (Πίνακας 12)

Ακόμη, μελετήθηκαν κρυσταλλογραφικά τα 1-γλυκοπυρανοζυλο-5-αλογονο-1,2,3-τριαζόλια εκ των οποίων ένα μόνο βρέθηκε να συνδέεται ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο με IC_{50}= 206 μM. Τα υπόλοιπα χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης σε συνεργασία με τους οργανικούς συνθετικούς χημικούς προκειμένου για τον επανέλεγχο της ποιότητας των ενώσεων με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR) και φασματομετρία μάζας (MS). Στον πίνακα 12 παρουσιάζονται τα παράγωγα τριαζολίου για τα οποία έχουν πραγματοποιηθεί κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες, τόσο στην παρούσα εργασία, όσο και στην διπλωματική εργασία της Κατερίνας Χατζησταματίου. Συγκεκριμένα, από τα γλυκοπυρανοζυλοτριαζόλια που μελετήθηκαν από την Κατερίνα Χατζησταματίου, ισχυρότερη αναστολή επέδειξε το DCGi126 που έφερε ιώδιο

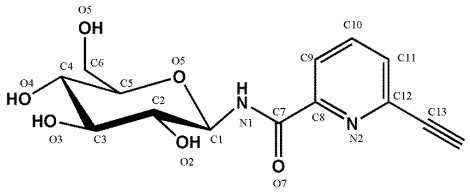
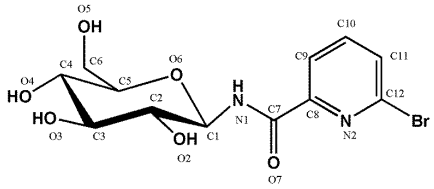
στην 5- θέση του τριαζολικού δακτυλίου και μια μεθοξυ-ναφθυλομάδα στην 4-θέση του δακτυλίου (IC_{50} 102.8 μM). (Πίνακας 12)

Όνομα Ένωσης	**Τύπος Ένωσης** 	**IC_{50} Σύνδεση στο RMGP*b***
DCGj25	R_1= −CH_2OH R_2= −Cl	475.6 ± 15.1 μM
DCGi110	R_1= −CH_2OH R_2= −I	714.4 ± 15.6 μM
DCGi160	R_1= −CH_2OH R_2= −Br	Δεν παρουσίασε αναστολή
DCGi122	R_1, R_2= −CO_2Me	Δεν παρουσίασε αναστολή
DCGj24	R_1= −C_6H_5 R_2= 	797.3 ± 7.7 μM
DCGi158	R_1=  R_2= −C_6H_5	811.7 ± 37.5 μM
DCGi156	R_1, R_2 = −C_6H_5	25.2 % στο 1 mM
DCGi129	R_1=  R_2= −Br	1037.8 ± 56.0 μM
DCGi126	R_1=  R_2= −I	102.8 ± 3.9 μM
DCGj143	R_1= −CH_2OH R_2= -C≡CH	20,1 % στο 1 mM
DCGi165	R_1= −CH_2OH R_2= Ar	Δεν παρουσίασε αναστολή

DCGk64	R_1=  R_2= -C≡CH	564,3 ± 24,4 μM
DCGk57	R_1=  R_2= H	10,3 % στα 200 μM
DCGj14a	R_1= Ar R_2= -C≡C- Ar	Δεν παρουσίασε αναστολή
DCGk58	R_1=  R_2= H	244.8 ± 27,6 μM
Wsi190b-2	 R_1= R_2= H	342,2 ± 14,5 μM
DCGk56	R_1=  R_2= H	205.9 ± 2.2 μM Σύνδεση στο Καταλυτικό κέντρο
DCGj102	R_1= -CH_2OH R_2=  *Εκκρεμεί η πιστοποίηση της ποιότητας του δείγματος με NMR*	230,7 ± 7,4 μM Σύνδεση στο Νέο αλλοστερικό κέντρο
DCGi104	R_1= Ar R_2= -I *Εκκρεμεί η πιστοποίηση της ποιότητας του δείγματος με NMR*	849,4 ± 67,9 μM

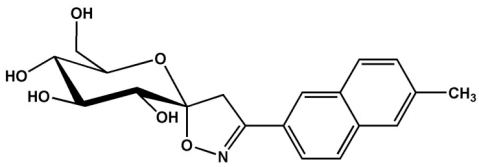
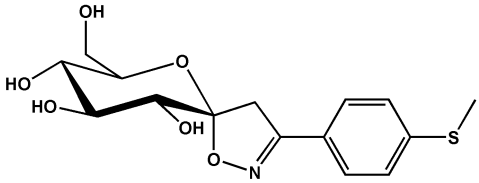
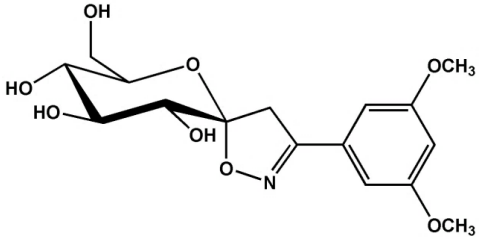
Πίνακας 12.: Συνολικός πίνακας των 1-γλυκοπυρανοζυλο-1,2,3-τριαζολίων που έχουν μελετηθεί κινητικά ή/και κρυσταλλογραφικά.

Η επόμενη κατηγορία ενώσεων που μελετήθηκε ήταν τα *N-β*-D-γλυκοπυρανοζυλαμίδια. Την ισχυρότερη ανασταλτική δράση παρουσίασε η ένωση Wsj135 με IC_{50}=139 μM, η οποία έφερε δακτύλιο πυριδίνης μεταξύ του ακεταμιδίου και της ομάδας αλκινίου. Αντικατάσταση της ομάδας αλκινίου από Br δεν ήταν καθόλου ευνοϊκή (ένωση Wsj102p). (Πίνακας 13)

Όνομα Ένωσης	**Τύπος Ένωσης**	**IC_{50}**
Wsj135		139 ± 9,7 μM
Wsj102p		33.4 % στα 400 μM

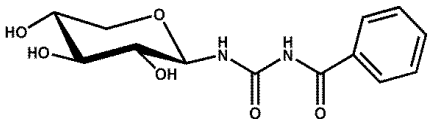
Πίνακας 13.: Συνολικός πίνακας των *N*-β-D-γλυκοπυρανόζυλο αμιδίων που μελετήθηκαν κινητικά.

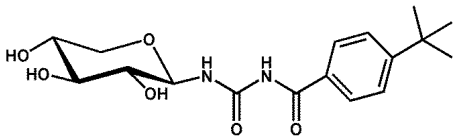
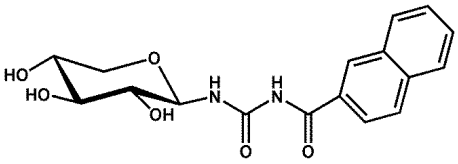
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δομικές μελέτες των γλυκοπυρανοζυλιδενο-σπειροισοξαζολινων έδειξαν ότι και οι τρεις ενώσεις που μελετήθηκαν προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά τις αρχικές επανειλημένες μη επιτυχείς προσπάθειες να μελετηθεί κρυσταλλογραφικά ο ισχυρότερος αναστολέας αυτής της κατηγορίας ενώσεων (DCGi42), ο οποίος φέρει ομάδα $–SH-CH_3$ ως υποκαταστάτη στην *para* θέση του βενζολικού δακτυλίου, επετεύχθη τελικά η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων από έναν μονοκρύσταλλο RMGP*b* χωρίς να καταστραφεί το κρυσταλλικό πλέγμα κατά τη διάρκεια της εμβάπτισής του στο διάλυμα του αναστολέα. Η βελτιστοποίηση του πρωτεϊνικού συμπλόκου είναι σε εξέλιξη. (Πίνακας 14)

Όνομα Ένωσης	Τύπος Ένωσης	IC_{50}
DCG 169		27,7 ± 1,7 μM
DCG i42		5,6 ± 0,7 μM
DCG i46		324,7 ± 24,1 μM

Πίνακας 14.: Συνολικός πίνακας των γλυκοπυρανοζυλιδενο-σπειροισοξαζολινων που μελετήθηκαν κινητικά.

Επίσης, μελετήθηκαν παράγωγα *β*-D-ξυλοπυρανόζης, για τον προσδιορισμό των δομικών χαρακτηριστικών που συνεισφέρουν στην υψηλή συγγένεια σύνδεσης που επιδεικνύει μια ένωση κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου πέραν της εξειδίκευσης που προσδίδει ο δακτύλιος της γλυκόζης. (Πίνακας 15)

Όνομα Ένωσης	Τύπος Ένωσης	Ki Σύνδεση στο RMGP*b*
KB264		Καταλυτικό κέντρο

KB283		350 ± 3 μM Καταλυτικό κέντρο
KB263		175 ± 3 μM Καταλυτικό & νέο αλλοστερικό κέντρο

Πίνακας 15.: Συνολικός πίνακας των *N*-ακυλο-N΄-β-D-ξυλοπυρανοζυλο ουρίων που μελετήθηκαν κρυσταλλογραφικά.

Τα αποτελέσματα έδειξαν για πρώτη φορά ότι θα μπορούσε να αποφευχθεί η χρήση της γλυκόζης σαν βάση για το σχεδιασμό ενώσεων που έχουν ως στόχο το καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*. Μια τέτοια προσέγγιση θα είχε αφενός πλεονεκτήματα για περαιτέρω *in vivo* μελέτες μια και η γλυκόζη εμπλέκεται σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια και η ομοιόσταση αυτής είναι σπουδαία για τον ανθρώπινο οργανισμό. Προς αυτήν την κατεύθυνση πραγματοποιούνται ήδη μελέτες από την Δρ Ε. Χρυσίνα και τους συνεργάτες της καθηγητές Α. Γκιμήσης και Γ. Εμίρης του τμήματος Χημείας και Πληροφορικής του ΕΚΠΑ προκειμένου να διερευνηθούν α) αν άλλα σάκχαρα πλην της γλυκόζης συνδέδονται στο ενεργό κέντρο, β) να διαλευκανθεί ποιά από τα περιφερικά υδροξύλια του σακχάρου είναι απαραίτητα για τη σύνδεση ενός προσδέτη στο κέντρο αυτό και γ) να γίνει χαρτογράφηση της κοιλότητας του β-καναλιού με γεωμετρικούς αλγορίθμους και εξειδικευμένες μαθηματικές μοντελοποιήσεις. Με τον τρόπο αυτό θα ταυτοποιηθούν τα καθοριστικά δομικά χαρακτηριστικά των επιμέρους προσδετών λαμβάνοντας υπ’ όψιν τόσο τις διαμορφώσεις που λαμβάνουν τα αμινοξέα που συνθέτουν το καταλυτικό κέντρο όσο και τους στερεοχημικούς και χωροταξικούς περιορισμούς. Η μελέτη των παραγώγων ξυλόζης ανοίγει νέους δρόμους.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AMP	Μονοφωσφορική αδενοσίνη
Wat	Μόριο ύδατος
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
β-GP	β-γλυκεροφωσφορικό οξύ
cAMP	Κυκλικό AMP
BES	N,N-δισ (2-υδροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθανοσουλφονικό οξύ
DMSO	Διμεθυλο σουλφοξίδιο
DTT	Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
GTP	Τριφωσφορική γουανοσίνη
CH_3COOH	Οξικό οξύ
$(CH_3COO)_2Mg$	Οξικό μαγνήσιο
GLUT	Μεταφορέας της γλυκόζης
G-1-P	1-φωσφορική γλυκόζη
GP	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου
IMP	Inosine Monophosphate
$KHCO_3$	Όξινο ανθρακικό κάλιο
Merc	Μερκαπτοαιθανόλη
$(NH_3)_2SO_4$	Θειικό αμώνιο
Na_2CO_3	Ανθρακικό νάτριο
NaN_3	Νατραζίδιο
PhK	Κινάση της φωσφορυλάσης
Pi	Ορθοφωσφορικό ιόν
PKA	Πρωτεϊνική Κινάση Α
PLP	Φωσφορική Πυριδοξάλη 5’
PDB	Πρωτεϊνική Βάση δεδομένων
RMGP*b*	Φωσφορυλάση *b* του γλυκογόνου από σκελετικούς μυες κουνελιού
r.m.s.d	Μέση τετραγωνική απόκλιση των τετραγώνων των αποκλίσεων από τη μέση τιμή
R	*R* διαμόρφωση

T	*T* διαμόρφωση
Ala (A)	Αλανίνη
Arg (R)	Αργινίνη
Asn (N)	Ασπαραγίνη
Asp (D)	Ασπαραγινικό οξύ
Cys (C)	Κυστεϊνη
Gln (Q)	Γλουταμίνη
Glu (E)	Γλουταμικό οξύ
Gly (G)	Γλυκίνη
His (H)	Ιστιδίνη
Ile (I)	Ισολευκίνη
Leu (L)	Λευκίνη
Lys (K)	Λυσίνη
Met (M)	Μεθειονίνη
Phe (F)	Φαινυλαλανίνη
Pro (P)	Προλίνη
Ser (S)	Σερίνη
Thr (T)	Θρεονίνη
Trp (W)	Τρυπτοφάνη
Tyr (Y)	Τυροσίνη
Val (V)	Βαλίνη
ACY	Οξικό οξύ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π1: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCG169

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης εβαπτίστηκαν σε διάλυμα 10mM DCG169 (20% DMSO) για 5 μέρες και 21 ώρες
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινβολίας	P14
Μήκος κύματος (Å)	1.239530
Απόσταση (mm)	249.592
Εύρος ταλάντωσης (^{o})	0.980
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (^{o})	900
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P 43 21 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.72 c=116.17 a=b=c=90^o
Αριθμός μορίων/ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	2.01
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	371410
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ.στοιβάδα)	65103(9395)
R_{merge} [a] (εξωτερική στοιβάδα)	0.579 (0.051)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) %	99.3
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.12-2.01
<I/σ(I)> (εξωτερική στοιβάδα)	3.4
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	5.8
Τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) (Wilson plot)	35.740

Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου	
Ευκρίνεια (Å)	2.01
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 50%)	61773
Αμινοξέα που συμπεριλήφθηκαν	12-251, 260-314, 324-836
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6854
Αριθμός ατόμων ύδατος	238
Αριθμός ετεροατόμων	66, 15(PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R(R_{free})$	0.17183 (0.17021)
$R(R_{free})$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.254 (0.283)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)μήκους δεσμών (Å)	0.006
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)γωνίας δεσμών (^{o})	1.027
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B ($Å^2$) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα: Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O): Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	*Εν εξελίξει*
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B ($Å^2$) για τα ετεροάτομα	
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B ($Å^2$) για τα μόρια ύδατος	

*Ο συντελεστής Rm ορίζεται ως $\Sigma_i\Sigma_h| <I_h> / \Sigma_i\Sigma_h I_h$ όπου $<I_\eta>$ είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h.

Πίνακας Π2: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCGi46

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης εβαπτίστηκαν σε διάλυμα 10mM DCGi46 (20% DMSO) για 5 μέρες, 20 ώρες και 40 λεπτά
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινβολίας	P14
Μήκος κύματος (Å)	1.239530
Απόσταση (mm)	228.716
Εύρος ταλάντωσης (^{o})	0.980
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (^{o})	900
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P 43 21 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.47 c=116.41 a=b=c=90^o
Αριθμός μορίων/ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	1.90
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	499214
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ.στοιβάδα)	75342 (10770)
R_{merge} [a] (εξωτερική στοιβάδα)	0.523 (0.057)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) %	97.5
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.00-1.90
<I/σ(I)> (εξωτερική στοιβάδα)	3.7
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	6.8
Τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) (Wilson plot)	28.368
Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου	

Ευκρίνεια (Å)	1.90
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 50%)	71512
Αμινοξέα που συμπεριλήφθηκαν	12-251, 260-314, 325-836
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6955
Αριθμός ατόμων ύδατος	329
Αριθμός ετεροατόμων	66, 15(PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R(R_{free})$	0.16495 (0.16357)
$R(R_{free})$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.246 (0.267)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)γωνίας δεσμών (^{o})	1.003
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B ($Å^2$) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα: Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O): Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	*Εν εξελίξει*
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B ($Å^2$) για τα ετεροάτομα	
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B ($Å^2$) για τα μόρια ύδατος	

*Ο συντελεστής Rm ορίζεται ως $\Sigma_i\Sigma_h| <I_h> / \Sigma_i\Sigma_h I_h$ όπου $<I_\eta>$ είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h.

Πίνακας Π3: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCGi42

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης εβαπτίστηκαν σε διάλυμα 5mM DCGi42 (20%DMSO) για 1 μέρα, 8 ώρες και 5 λεπτά
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινβολίας	DLS
Μήκος κύματος (Å)	0.9795
Απόσταση (mm)	297.669
Εύρος ταλάντωσης (^{o})	0.999
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (^{o})	1000
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P 43 21 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.83 c=116.38 a=b=c=90^o
Αριθμός μορίων/ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	1.91
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	847324
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ.στοιβάδα)	76285 (5511)
R_{merge} [a] (εξωτερική στοιβάδα)	0.883(0.063)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) %	99.4
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.96-1.91
<I/σ(I)> (εξωτερική στοιβάδα)	3.2
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	11.1
Τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) (Wilson plot)	41.203
Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου	
Ευκρίνεια (Å)	1.74

Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 50%)	95232
Αμινοξέα που συμπεριλήφθηκαν	12-251, 260-314, 325-836
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6945
Αριθμός ατόμων ύδατος	300
Αριθμός ετεροατόμων	66, 15(PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R(R_{free})$	0.17621 (0.17506)
$R(R_{free})$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.350 (0.357)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)γωνίας δεσμών (^{o})	1.009
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα: Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O): Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	*Εν εξελίξει*
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) για τα ετεροάτομα	
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) για τα μόρια ύδατος	

*Ο συντελεστής Rm ορίζεται ως $\Sigma_i\Sigma_h| <I_h> / \Sigma_i\Sigma_h I_h$ όπου $<I_\eta>$ είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h.

Πίνακας Π4: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCGk56

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης εβαπτίστηκαν σε διάλυμα 10mM DCGk56 (20%DMSO) για 8 μέρες και 5 ώρες
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινβολίας	P14
Μήκος κύματος (Å)	1.239530
Απόσταση (mm)	230.682
Εύρος ταλάντωσης (^{o})	0.980
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (^{o})	900
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P 43 21 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.403 c=116.38 a=b=c=90^o
Αριθμός μορίων/ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	1.71
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	690344
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ.στοιβάδα)	105117 (15155)
R_{merge} [a] (εξωτερική στοιβάδα)	0.583(0.047)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) %	99.8
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.80-1.71
<I/σ(I)> (εξωτερική στοιβάδα)	3.0
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	6.5
Τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) (Wilson plot)	25.051
Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου	
Ευκρίνεια (Å)	1.80
Αριθμός ανακλάσεων που	86014

χρησιμοποιούνται (free, 50%)	
Αμινοξέα που συμπεριλήφθηκαν	12-251, 261-314, 324-836
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6850
Αριθμός ατόμων ύδατος	238
Αριθμός ετεροατόμων	66, 15(PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R(R_{free})$	0.17826 (0.17728)
$R(R_{free})$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.275 (0.279)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)γωνίας δεσμών (^{o})	1.018
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα: Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O): Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	*Εν εξελίξει*
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) για τα ετεροάτομα	
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) για τα μόρια ύδατος	

*Ο συντελεστής Rm ορίζεται ως $\Sigma_i\Sigma_h| <I_h> / \Sigma_i\Sigma_h I_h$ όπου $<I_\eta>$ είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h.

Πίνακας Π5: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCGj102

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης εβαπτίστηκαν σε διάλυμα 10mM DCGk56 (20%DMSO) για 8 μέρες, 5 ώρες και 3 λεπτά
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινβολίας	P14
Μήκος κύματος (Å)	1.239530
Απόσταση (mm)	230.786
Εύρος ταλάντωσης (^{o})	0.980
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (^{o})	900
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P 43 21 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.392 c=116.38 a=b=c=90^o
Αριθμός μορίων/ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	1.75
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	643699
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ.στοιβάδα)	96763 (13797)
R_{merge} [a] (εξωτερική στοιβάδα)	0.510(0.060)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) %	97.3
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.84-1.75
<I/σ(I)> (εξωτερική στοιβάδα)	3.4
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	6.7
Τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) (Wilson plot)	23.687
Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου	

Ευκρίνεια (Å)	1.75
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 50%)	91875
Αμινοξέα που συμπεριλήφθηκαν	12-254, 261-314, 324-836
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	7017
Αριθμός ατόμων ύδατος	349
Αριθμός ετεροατόμων	66, 15(PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R(R_{free})$	0.17650 (0.17525)
$R(R_{free})$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.256 (0.282)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)μήκους δεσμών (Å)	0.006
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)γωνίας δεσμών (^{o})	1.048
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B ($Å^2$) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα: Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O): Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	*Εν εξελίξει*
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B ($Å^2$) για τα ετεροάτομα	
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B ($Å^2$) για τα μόρια ύδατος	

*Ο συντελεστής Rm ορίζεται ως $\Sigma_i\Sigma_h| <I_h> / \Sigma_i\Sigma_h I_h$ όπου $<I_\eta>$ είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h.

Πίνακας Π6: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:DCGi104

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης εβαπτίστηκαν σε διάλυμα 10mM DCGi104 (20%DMSO) για 8 μέρες, 4 ώρες και 10 λεπτά
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινβολίας	P14
Μήκος κύματος (Å)	1.239530
Απόσταση (mm)	230.551
Εύρος ταλάντωσης (^{o})	0.980
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (^{o})	900
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P 43 21 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.092 c=116.287 a=b=c=90^o
Αριθμός μορίων/ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	1.77
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	595251
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ.στοιβάδα)	93132 (13565)
R_{merge} [a] (εξωτερική στοιβάδα)	0.577 (0.052)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) %	99.5
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.87-1.77
<I/σ(I)> (εξωτερική στοιβάδα)	3.0
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	6.0
Τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) (Wilson plot)	26.712

Πίνακας Π7: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης της ένωσης KB263 ως συμπλόκου με την RMGP*b*.

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Κρύσταλλοι RMGP*b* T διαμόρφωσης εμβαπτίζονται σε διάλυμα 5 mM KB263 (20%DMSO) για 11 μέρες, 8ώρες και 14 λεπτά
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	P14
Μήκος κύματος (Å)	1.239530
Απόσταση (mm)	230.654
Εύρος ταλάντωσης (^{o})	0.980
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (^{o})	893
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P 43 21 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.16 c=116.44 a=b=c=90^o
Αριθμός μορίων/ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	1.77
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	617555
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ.στοιβάδα)	90564 (3147)
R_{merge}* (εξωτερική στοιβάδα)	0.516 (0.038)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) %	94.2
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.87-1.77
<I/σ(I)> (εξωτερική στοιβάδα)	4.4
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	7.0
Τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) (Wilson plot)	25.3
Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου	

Ευκρίνεια (Å)	1.77
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 50%)	85967
Αμινοξέα που συμπεριλήφθηκαν στη δομή	12-251, 261-314, 324-836
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6562
Αριθμός ατόμων ύδατος	273
Αριθμός ετεροατόμων	66, 15(PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R(R_{free})	0.17169 (0.19287)
R(R_{free}) (εξωτερική στοιβάδα)	0.255 (0.267)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (^{o})	0.991
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) για Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα: Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O): Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	 32.881 31.251 34.457
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) για τα ετεροάτομα	28.332 (κατ.) 46.293 (ν. αλ) 71.920 (DMSO) 63.060 (DMSO) 59.945 (ανθρακικά) 74.492 (φωσφορικά)
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) για τα μόρια ύδατος	37.496

*Ο συντελεστής Rm ορίζεται ως $\Sigma_i\Sigma_h| <I_h> / \Sigma_i\Sigma_h I_h$ όπου $<I_\eta>$ είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h.

Πίνακας Π8: Δεσμοί Υδρογόνου μεταξύ της ένωσης KB263 και των αμινοξέων και των μόριων νερού στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
O2	Tyr573 OH	3.12	151.3
	Glu672 OE1	3.10	173.5
	Wat126 O	2.84	-
	Wat193 O	2.83	-
O3	Glu672 OE1	2.84	123.5
	Ser674 N	3.08	171.2
	Gly675 N	3.20	143.9
	Wat126 O	3.32	-
O4	Asn484 ND2	3.20	127.7
	Gly675 N	3.03	134.4
	Wat62 O	2.67	-
O7	Leu136 N	2.98	161.2
	Wat64 O	3.31	-
	Wat268 O	3.27	-
O8	Wat44 O	2.84	-
	Wat268 O	2.89	-
N1	Wat189 O	2.85	-
N2	Wat189 O	2.68	-
Total		**18**	

Πίνακας Π9: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση KB263 μέσω μορίων νερού με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b*.

Άτομο αναστολέα			
O2	**… Wat126 O**	…Ala673 N	
		…Wat190 O	…Thr671 O
			…Wat126 O
			…Thr378 OG1
		…His377 O	
	…Wat193 O	…Lys574 NZ	
		…PLP680 OP2	
		…Wat184 O	…Gly135 N
			…Wat63 O
			…Wat268 O
O4	**... Wat62 O**	…Thr676 OG1	
		…PLP680 OP3	
O7	**…Wat268 O**	…Wat184 O	
		…Asp283 OD2	
O8	**…Wat64 O**	…Gly134 N	
		…Gly137 N	
		…Glu88 OE2	

Πίνακας Π10: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ της ένωσης KB263 και των αμινοξέων και των νερών του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b*

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχου	Αριθμός αλληλεπι-δράσεων
C1	Leu136 N; Wat193 O	2
C2	His377 O; Glu672 OE1; Wat126 O; Wat193 O	4
C3	Glu672 OE1; Gly675 N; Wat62 O; Wat126 O ; Wat193 O	5
C4	Asn484 ND2; Gly675 N; Wat62 O	3
C5	Gly135 C; Leu136 N; His377 ND1; Wat62 O	4
C7	Leu136 N; Leu136 CB; Dms991 O; Wat268 O; Wat189 O	5
C8	Asp283 CB; Wat64 O; Wat189 O; Wat268 O	4
C9	Asp283 CA; Asp283 CB; Wat189 O	3
C10	Asp283 CA; Asp283 CB; Asp283 O; Asp283 C; Wat189 O	5
C11	Asn282 A; Asp283 CA; Asp283 O; Asp283 C	4
C12	Asn282 O; His341 NE2; Wat207 O	3
C13	Glu88 OE1;Asn282 O; His341 CE1; His341 NE2; Wat65 O; Wat207 O	6
C14	Glu88 OE1; His 341CE1; Wat65 O	3
C15	Asn282 O; His341 NE2; Wat37 O; Wat207 O	4
C16	Asn282 O; Wat36 O; Wat37 O	3
C17	Phe286 N; Ala383 O; Ala383 CA; Wat186 O	4
C18	Asp283 O; Asp283 C; Ala383 O; Wat186 O	4
O2	Dms991 O	1
O3	Glu672 CG; Glu672 CD; Ala673 CA; Ala673 CB; Ala673 C; Ala673 N; Ser674 CA; Ser674 C; Wat126 O	9
O4	Ser674 CB;Gly675 CA; Gly675 C; Gly675 O	4
O6	Gly135 C; Leu136 CA; Ley136 CB;Leu136 N; His377 ND1; His377 CB; His377 CG	7

O7	Gly135 N; Gly135 CA; Gly135 C; Leu136 CA; Leu136 CB; Wat184 O; Wat64 O	7
O8	Asn133 CB; Asp283 CB	2
N1	Leu136 CB; Dms991 O	2
N2	Leu136 CB; Leu136 CD1; Dms991 O	3
	Σύνολο	**101**

Πίνακας Π11: Δεσμοί Υδρογόνου μεταξύ της ένωσης KB263 και των αμινοξέων και των μόριων νερού στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP*b*

Άτομο αναστολέα	**Άτομο στόχος**	**Απόσταση (Å)**	**Γωνία (°)**
O2	Wat100 O	2.59	-
O4	Asn187' N	3.30	123.1
	Asn187' O	3.21	95.6
	Wat99' O	3.14	-
	Wat101' O	3.07	-
O8	Thr38' O	3.26	120.0
	Thr38' O	3.26	120.0
N2	Thr38' O	2.73	149.8
	Σύνολο	**8**	

Πίνακας Π12.: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση KB263 μέσω μορίων νερού με αμινοξέα του νέου αλλοστερικού κέντρου της RMGP*b*

Άτομο Αναστολέα		
O2	**…Wat100 O**	…Ala192 N
O4	**… Wat99 O**	…Glu190 OE1
		…Asn187' N
O9	**…Wat101 O**	…Glu190 O
		…Asn187 O
		…KBA920'4

Πίνακας Π13: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ της ένωσης KB263 και των αμινοξέων και των νερών του νέου αλλοστερικού κέντρου της RMGP*b*

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχου	Αριθμός αλληλεπι-δράσεων
C4	Wat101’ O	1
C8	Thr38’ O	1
C9	Lys191 CD	1
C10	Arg60 CZ, NH1, NH2,	3
C11	Arg60 CZ, NH1 ; Glu190 O	3
C12	Arg60 CD	1
C13	Pro188 O; Trp184 C; Trp189 O	3
C14	Trp189 O	1
C15	Arg60 CG	1
C16	Arg60 CG, CD	2
C17	Arg60 CG, CD, NE	3
C18	Arg60 NE, CZ; Phe37 O; Val40’ CG2	4
C19	Arg60 NE, CZ, NH2; Phe17’ O; Thr38’ O	5
O4	Asn187’ C	1
O8	Thr38’ CG2	1
O9	Wat100’ O	1
N2	Lys191 CD	1
	Σύνολο	**33**

Πίνακας Π14: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:KB283

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης εβαπτίστηκαν σε διάλυμα 5mM KB283 (20%DMSO) για 11 μέρες, 7h and 42 min
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινβολίας	P14
Μήκος κύματος (Å)	1.239530
Απόσταση (mm)	230.464
Εύρος ταλάντωσης (^{o})	0.980
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (^{o})	900
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P 43 21 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.24 c=116.61 a=b=c=90^o
Αριθμός μορίων/ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	1.63
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	741726
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ.στοιβάδα)	115341
R_{merge} [a] (εξωτερική στοιβάδα)	0.557 (0.045)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) %	85.9
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.72- 1.63
<I/σ(I)> (εξωτερική στοιβάδα)	2.4
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	4.7
Τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) (Wilson plot)	23.7
Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου	
Ευκρίνεια (Å)	1.63
Αριθμός ανακλάσεων που	109497

χρησιμοποιούνται (free, 50%)	
Αμινοξέα που συμπεριλήφθηκαν	12-251, 261-314, 324-836
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6820
Αριθμός ατόμων ύδατος	211
Αριθμός ετεροατόμων	52
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R(R_{free})	0.17897 (0.19540)
R(R_{free}) (εξωτερική στοιβάδα)	0.289 (0.292)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.004
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (^{o})	0.957
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα: Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O): Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	 33.08 31.547 34.582
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) για τα ετεροάτομα	24.544 (KB263) 41.980 (DMSO)
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) για τα μόρια ύδατος	34.627

*Ο συντελεστής Rm ορίζεται ως $\Sigma_i\Sigma_h| <I_h> / \Sigma_i\Sigma_h I_h$ όπου $<I_\eta>$ είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h.

Πίνακας Π15: Δεσμοί Υδρογόνου μεταξύ της ένωσης KB283 και των αμινοξέων και των μόριων νερού στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb.

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
O2	Tyr573 OH	3.19	149.8
	Glu672 OE1	3.16	170.9
	Wat185 O	2.75	-
	Wat125 O	2.77	-
O3	Ser674 N	3.08	176.1
	Gly675 N	3.20	146.0
	Glu672 OE1	2.77	123.5
O4	Gly675 N	3.01	132.5
	Asn484 ND2	3.18	129.5
	Wat61 O	2.68	-
O7	Leu136 N	3.03	163.2
	Wat184 O	3.22	-
	Wat211 O	3.19	-
O8	Wat184 O	2.95	-
	Wat211 O	2.89	-
N1	Wat189 O	2.84	-
N2	Wat189 O	2.8	-
	Σύνολο	**17**	

Πίνακας Π16: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση KB283 μέσω μορίων νερού με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b*

Άτομο αναστολέα				
O2	**… Wat125 O**	…Ala673 N		
		…Wat188 O	…Thr671 O	
			…Wat125 O	
			…Wat209 O	…Val379 N
				…Leu380N
		…His377 O		
	…Wat185 O	…Lys574 NZ		
		…PLP680 OP2		
		…Wat178 O	…Gly135 N	
			…Wat62 O	…PLP680 OP2
				…Arg569 N
			…Wat184O	
			…Wat185 O	
O4	**... Wat61 O**	…Thr676 OG1		
		…PLP680 OP3		
O7	**…Wat184 O**	…Wat178 O		
		…Asp283 OD2		
O8	**…Wat211 O**	…Gly134 N		
		…Gly137 N		
		…Glu88 OE2		
		…Ala673 N		

Πίνακας Π17: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ της ένωσης KB283 και των αμινοξέων και των νερών του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b*

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχου	Αριθμός αλληλεπι-δράσεων
C1	Leu136 N; Wat185 O	2
C2	His377 O; Glu672 OE1; Wat125 O; Wat185 O	4
C3	Glu672 OE1; Gly675 N; Wat61 O; Wat125 O; Wat185 O	5
C4	Asn484 ND2; Gly675 N; Wat61 O	3
C5	Gly135 C; Leu136 N; His377 ND1; Wat61 O	4
C7	Leu136 N; Leu136 CB; Wat184 O; Wat189 O	4
C8	Asp283 CB; Wat184 O; Wat189 O; Wat211 O	4
C9	Asp283 CA; Asp283 CB	2
C10	Asp283 CA; Asp283 CB	2
C11	Asp283 O; Wat180 O	2
C12	Asn282 O	1
C13	Asn282 CA; Asn282 O; His341 CE1; Wat169 O	4
C14	Glu88 OE1; Asp283 CA; Asp283 CB; His341CE1	4
C15	Asn282 O	1
C16	His341 NE2; Ala383 O; Glu385 CG ; Wat37 O; Wat180 O	5
C17	Asp282 ND2;Asp282 O; Wat36 O; Wat37 O; Wat169 O	5
C18	Asp282 O; Phe285 C; Phe285 O; Phe286 N; Phe286 CA	5
O3	Glu672 CG; Glu672CD; Ala673 CA; Ala673 CB; Ala673 N; Ala673 C; Ser674 CA; Ser674 C; Wat125 O	9
O4	Ser674 CB; Ser674 C; Gly675 CA; Gly675 C;	5

	Gly675 O	
O6	Gly135 C; Leu136 CA; Ley136 CB; Leu136 N; His377 ND1; His377 CB; His377 CG	7
O7	Gly135 N; Gly135 CA; Gly135 C; Leu136 CA; Leu136 CB; Wat178 O	6
O8	Asn133 CB; Asp283 CB	2
N1	Leu136 CB	1
N2	Leu136 CB	1
	Σύνολο	**88**

Πίνακας Π18: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:KB264

Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων	
Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης εβαπτίστηκαν σε διάλυμα 5mM KB264 (20%DMSO) για 5 μέρες 17ώρες και 40λεπτά
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	P14
Μήκος κύματος (Å)	0.97552
Απόσταση (mm)	300.533
Εύρος ταλάντωσης (^{o})	0.980
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (^{o})	900
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P 43 21 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.626 c=116.793 a=b=c=90^o
Αριθμός μορίων/ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	1.80
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	603222
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ.στοιβάδα)	90589(3104)
R_{merge} [a] (εξωτερική στοιβάδα)	0.535 (0.028)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) %	99.9
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.90-1.80
<I/σ(I)> (εξωτερική στοιβάδα)	4.0
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	6.8
Τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) (Wilson plot)	32.399
Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου	
Ευκρίνεια (Å)	1.80

Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 50%)	85967
Αμινοξέα που συμπεριλήφθηκαν	12-251, 261-314, 324-836
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6851
Αριθμός ατόμων ύδατος	250
Αριθμός ετεροατόμων	66, 15(PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R(R_{free})$	0.1964 (0.1851)
$R(R_{free})$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.2159 (0.2050)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.)γωνίας δεσμών (^{o})	0.991
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα: Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O): Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	 42.154 39.975 44.363
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) για τα ετεροάτομα	39.943 (KB264) 89.625 (DMSO) 83.540 (DMSO)
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å^2) για τα μόρια ύδατος	44.216

*Ο συντελεστής Rm ορίζεται ως $\Sigma_i\Sigma_h| <I_h> / \Sigma_i\Sigma_h I_h$ όπου $<I_\eta>$ είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περίθλαση h.

Πίνακας Π19: Δεσμοί Υδρογόνου μεταξύ της ένωσης KB264 και των αμινοξέων και των μόριων νερού στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*.

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
O2	Tyr573 OH	3.25	152.4
	Glu672 OE1	3.30	172.5
	Wat250 O	2.79	-
	Wat467 O	2.94	-
O3	Ser674 N	3.18	171.5
	Gly672 OE1	2.86	126.5
	Wat467 O	3.12	-
O4	Gly675 N	2.88	137.6
	Asn484 ND2	3.28	128.7
	Wat14 O	2.83	-
O7	Leu136 N	2.94	162.4
	Wat5 O	3.29	-
O8	Wat5 O	2.76	-
N1	Wat281 O	2.9	-
N2	Wat281 O	2.8	-
	Σύνολο	**15**	

Πίνακας Π20: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση KB264 μέσω μορίων νερού με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b*.

Άτομο αναστολέα				
O2	**… Wat250 O**	…Lys574 NZ		
		…PLP680 OP2		
		…Wat181 O	…Gly135 N	
			…**Wat38 O**	…Arg569 N
				…PLP680 OP2
	…Wat467 O	…His377 O		
		…Ala673 N		
		…Wat525 O	…Thr 671 O	
			…Wat62 O	…Val379 N
				…Leu380 N
			…Wat467 O	
			…Dms O	
O4	**... Wat14 O**	…Thr676 OG1		
		…PLP680 OP3		
O7	**…Wat5 O**	…Glu88 OE2		
		…Gly134 N		
		…Gly137 N		
N1	**…Wat281 O**	…Thr378 OG1		

Πίνακας Π21: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals μεταξύ της ένωσης KB264 και των αμινοξέων και των νερών του καταλυτικού κέντρου της RMGPb.

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχου	Αριθμός αλληλεπι-δράσεων
C1	Leu136 N; Wat250 O	2
C2	His377 O; Wat250 O; Wat467 O	3
C3	Glu672 OE1; Gly675 N; Wat14 O; Wat250 O ; Wat467 O	5
C4	Asn484 ND2; Gly675 N; Wat14 O	3
C5	Gly135 C; Gly135 CA; Leu136 N; His377 ND1; Wat14 O	5
C7	Leu136 N; Leu136 CB; Wat281 O; Dms C	4
C8	Asp283 CB; Wat5 O; Wat281 O	3
C9	Asp283 CA; Asp283 CB	2
C10	Glu88 OE1; Asp283 CB	2
C11	Glu88 OE1; Asp282 O; His341 CE1; Wat147 O; Wat515 O	5
C12	Asn282 O ; Asp 283 CA; His 341 CE1; Wat258 O; Wat550 O	5
C13	Asp283 O;,Asp283 CA; Asp283 C; Dms C; Wat258 O; Wat550 O	6
C14	Asp283 CA; Asp283 CB; Asp283 O; Dms C; Wat281 O	5
O2	Tyr573 O; Glu672 OE1; Dms S; Dms C; Wat250 O; Wat 467 O	6
O3	Glu672 OE1; Glu672 CG; Glu672 CD; Ala673 N; Ala673 C; Ala673 CA; Ala673 CB; Ser674 N; Gly675 N	9
O4	Asn484 ND2; Ser674 CB; Ser674 C; Ser674 CA; Ser674 N; Gly675 N; Gly675 CA; Gly675 O; Gly675 C; Wat14 O	10

O6	Gly135 C; Leu136 CA; Ley136 CB; Leu136 N; His377 ND1; His377 CB; His377 CG	7
O7	Gly135 N; Gly135 CA; Gly135 C; Leu136 CA; Leu136 CB; Wat5 O; Wat181 O	7
O8	Asn133 CB; Asp283 CB	2
N1	Leu136 N; Leu136 CB; Dms C; Wat281 O	4
N2	Leu136 CB; Leu136 CB; Dms C1; Dms C2; Wat281 O	5
	Σύνολο	**100**

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Κατσίκη Ν., Ζαντίδης Α., Διδάγγελος Τ., Σακχαρώδης Διαβήτης: Διάγνωση και ταξινόμηση. *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* **2010,** 78-86.
2. Norman J. Normal Regulation of Blood Glusoce : The Important Roles of Insulin and Glucagon: Diabetes and Hypoglycemia. http://www.endocrineweb.com/conditions/diabetes/normal-regulation-blood-glucose - The_Role_of_Glucagon_in_Blood_Glucose_Control.
3. Bowen, R. Physiologic Effects of Insulin. http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/pancreas/insulin_phys.html.
4. Γλυκαγόνη. http://panacea.med.uoa.gr/topic.aspx?id=219.
5. Internation Diabetes Federation. http://www.idf.org.
6. WHO (World Health Organization). http://www.who.int/diabetes/en/.
7. Blonde, L., Current antihyperglycemic treatment strategies for patients with type 2 diabetes mellitus. *Cleveland Clinic journal of medicine* **2009,** *76 Suppl 5*, S4-11.
8. Maritim, A. C.; Sanders, R. A.; Watkins, J. B., 3rd, Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology* **2003,** *17* , 24-38.
9. Μπουγαλιά Μ., Οξειδωτικό Στρες και σακχαρώδης διαβήτης. *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* **2006,** *19*, 43-54.
10. Surwit, R. S.; van Tilburg, M. A.; Zucker, N.; McCaskill, C. C.; Parekh, P.; Feinglos, M. N.; Edwards, C. L.; Williams, P.; Lane, J. D., Stress management improves long-term glycemic control in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2002,** *25*, 30-4.
11. Newgard, C. B.; Hwang, P. K.; Fletterick, R. J., The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **1989,** *24*, 69-99.
12. Ignacio, P. C.; Baldwin, B. A.; Vijayan, V. K.; Tait, R. C.; Gorin, F. A., Brain Isozyme of Glycogen-Phosphorylase - Immunohistological Localization within the Central-Nervous-System. *Brain Res* **1990,** *529*, 42-49.

13. Vasatova, M.; Pudil, R.; Buchler, T.; Karesova, I.; Safka, V.; Fejfar, T.; Hulek, P., Glycogen phosphorylase BB levels are associated with haemodynamic parameters in cirrhotic patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt insertion. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **2014**.
14. Illingworth, B.; Jansz, H. S.; Brown, D. H.; Cori, C. F., Observations on the Function of Pyridoxal-5-Phosphate in Phosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1958,** *44*, 1180-91.
15. Green, A. A.; Cori, G. T.; Oncley, J. L., Crystalline muscle phosphorylase I. Preparation, properties, and molecular weight. *J Biol Chem* **1943,** *151*, 21-29.
16. Barford, D.; Johnson, L. N., The allosteric transition of glycogen phosphorylase. *Nature* **1989,** *340*, 609-16.
17. Osz, E.; Somsak, L.; Szilagyi, L.; Kovacs, L.; Docsa, T.; Toth, B.; Gergely, P., Efficient inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by a new glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin. *Bioorg Med Chem Lett* **1999,** *9*, 1385-1390.
18. Chrysina, E. D.; Kosmopoulou, M. N.; Tiraidis, C.; Kardakaris, R.; Bischler, N.; Leonidas, D. D.; Hadady, Z.; Somsak, L.; Docsa, T.; Gergely, P.; Oikonomakos, N. G., Kinetic and crystallographic studies on 2-(beta-D-glucopyranosyl)-5-methyl-1, 3, 4-oxadiazole, -benzothiazole, and -benzimidazole, inhibitors of muscle glycogen phosphorylase b. Evidence for a new binding site. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2005,** *14*, 873-88.
19. Chrysina, E. D.; Chajistamatiou, A.; Chegkazi, M., From structure--based to knowledge--based drug design through x-ray protein crystallography: sketching glycogen phosphorylase binding sites. *Current medicinal chemistry* **2011,** *18*, 2620-9.
20. Berg J.M. ; Tymoczko J.L.; Stryer L., *Biochemistry* 5th ed.; 2002.
21. Oikonomakos, N. G.; Skamnaki, V. T.; Tsitsanou, K. E.; Gavalas, N. G.; Johnson, L. N., A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* **2000,** *8*, 575-84.

22. Fuess H., W. T. H., Müller U., Shmueli U., Prince E., Authier A., Kopský V. , Litvin D., Rossmann M., *International Tables of Crystallography*. Springer publications: **2005**; Vol. 606.
23. Blundell T. , J. L., *Protein crystallography*. Academic Press: London, **1976**.
24. Rupp, B., *Biomolecular crystallography*. **2010**.
25. Dewolff, P. M.; Belov, N. V.; Bertaut, E. F.; Buerger, M. J.; Donnay, J. D. H.; Fischer, W.; Hahn, T.; Koptsik, V. A.; Mackay, A. L.; Wondratschek, H.; Wilson, A. J. C.; Abrahams, S. C., Nomenclature for Crystal Families, Bravais-Lattice Types and Arithmetic Classes Report of the International Union of Crystallography Ad-Hoc Committee on the Nomenclature of Symmetry. *Acta Crystallogr A* **1985,** *41*, 278-280.
26. Laue, M. Nobel Prize in Physics for his discovery of the diffraction of X-rays by crystals. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1914/.
27. Bragg, H. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1915/.
28. Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C., A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* **1958,** *181*, 662-6.
29. Perutz, M. F., Structure of hemoglobin. *Brookhaven symposia in biology* **1960,** *13*, 165-83.
30. Dauter, Z.; Jaskolski, M.; Wlodawer, A., Impact of synchrotron radiation on macromolecular crystallography: a personal view. *J Synchrotron Radiat* **2010,** *17*, 433-44.
31. Rhodes, G., *Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models.* . 2nd. ed. Academic Press, San Diego: **2000**.
32. Koch, M. H. J. B., J, X-ray diffraction ans scattering on disordered systems using synchrotron radiation. *Nuclear Instruments and Methods* **1983,** *208*, 461-463.
33. Blundell, T. L.; Jhoti, H.; Abell, C., High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature reviews. Drug discovery* **2002,** *1*, 45-54.
34. Fischer H., *Methods in Enzymology* **1962,** *5*, 369-373.

35. Nelson D., *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed.; **2005**.
36. Kastenschmidt, L. L.; Kastenschmidt, J.; Helmreich, E., The effect of temperature on the allosteric transitions of rabbit skeletal muscle phosphorylase b. *Biochemistry* **1968,** *7*, 4543-56.
37. Goyard, D.; Chajistamatiou, A. S.; Sotiropoulou, A. I.; Chrysina, E. D.; Praly, J. P.; Vidal, S., Efficient atropodiastereoselective access to 5,5'-bis-1,2,3-triazoles: studies on 1-glucosylated 5-halogeno 1,2,3-triazoles and their 5-substituted derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors. *Chemistry* **2014,** *20*, 5423-32.
38. Gyorgydeak, Z.; Hadady, Z.; Felfoldi, N.; Krakomperger, A.; Nagy, V.; Toth, M.; Brunyanszki, A.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsak, L., Synthesis of N-(beta-D-glucopyranosyl)- and N-(2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glucopyranosyl) amides as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg Med Chem* **2004,** *12*, 4861-70.
39. Tsitsanou, K. E.; Oikonomakos, N. G.; Zographos, S. E.; Skamnaki, V. T.; Gregoriou, M.; Watson, K. A.; Johnson, L. N.; Fleet, G. W., Effects of commonly used cryoprotectants on glycogen phosphorylase activity and structure. *Protein science : a publication of the Protein Society* **1999,** *8*, 741-9.
40. Saheki, T.; Nakano, K.; Kobayashi, K.; Imamura, Y.; Itakura, Y.; Sase, M.; Hagihara, S.; Matuo, S., Analysis of the enzyme abnormality in eight cases of neonatal and infantile citrullinaemia in Japan. *Journal of inherited metabolic disease* **1985,** 8, 155-6.
41. Subbarow, F., The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry* **1925,** *LXVI*.
42. Cheng, Y.; Prusoff, W. H., Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **1973,** *22*, 3099-108.
43. Leatherbarrow, GraFit version 3.0. Data Analysis and Graphics program for the IBM PC. **1992**.
44. Oikonomakos, N. G.; Melpidou, A. E.; Johnson, L. N., Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalytic characterization. *Biochim Biophys Acta* **1985,** *832*, 248-56.

45. Garman, E., 'Cool' crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage. *Curr Opin Struct Biol* **2003,** *13*, 545-51.
46. http://strucbio.biologie.uni-konstanz.de/ccp4wiki/index.php/Cryo.
47. Kabsch, W., Xds. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2010,** *66*, 125-32.
48. Bailey, S., The Ccp4 Suite - Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr D* **1994,** *50*, 760-763.
49. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K., Features and development of Coot. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2010,** *66*, 486-501.
50. Cousins, K. R., Computer review of ChemDraw Ultra 12.0. *Journal of the American Chemical Society* **2011,** *133*, 8388.
51. The GlycoBioChem PRODRG2 Server. http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg.
52. Davis, I. W.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C., MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. *Nucleic Acids Res* **2004,** *32* (Web Server issue), W615-9.
53. UCSF CHIMERA an Extensible Molecular Modeling System. http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/.
54. Kraulis, P. J., Molscript - a Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures. *J Appl Crystallogr* **1991,** *24*, 946-950.
55. Bokor, E.; Docsa, T.; Gergely, P.; Somsak, L., Synthesis of 1-(D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazoles and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2010,** *18*, 1171-80.
56. Chrysina, E. D.; Kosmopoulou, M. N.; Kardakaris, R.; Bischler, N.; Leonidas, D. D.; Kannan, T.; Loganathan, D.; Oikonomakos, N. G., Binding of beta-D-glucopyranosyl bismethoxyphosphoramidate to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Bioorg Med Chem* **2005,** *13*, 765-72.
57. Petsalakis, E. I.; Chrysina, E. D.; Tiraidis, C.; Hadjiloi, T.; Leonidas, D. D.; Oikonomakos, N. G.; Aich, U.; Varghese, B.; Loganathan, D., Crystallographic studies on N-azidoacetyl-beta-D-glucopyranosylamine,

an inhibitor of glycogen phosphorylase: comparison with N-acetyl-beta-D-glucopyranosylamine. *Bioorg Med Chem* **2006,** *14*, 5316-24.

58. Nagy, V.; Felfoldi, N.; Konya, B.; Praly, J. P.; Docsa, T.; Gergely, P.; Chrysina, E. D.; Tiraidis, C.; Kosmopoulou, M. N.; Alexacou, K. M.; Konstantakaki, M.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G.; Kozmon, S.; Tvaroska, I.; Somsak, L., N-(4-Substituted-benzoyl)-N'-(beta-d-glucopyranosyl)ureas as inhibitors of glycogen phosphorylase: Synthesis and evaluation by kinetic, crystallographic, and molecular modelling methods. *Bioorg Med Chem* **2012,** *20,* 1801-16.
59. Goyard, D.; Baron, M.; Skourti, P. V.; Chajistamatiou, A. S.; Docsa, T.; Gergely, P.; Chrysina, E. D.; Praly, J. P.; Vidal, S., Synthesis of 1,2,3-triazoles from xylosyl and 5-thioxylosyl azides: evaluation of the xylose scaffold for the design of potential glycogen phosphorylase inhibitors. *Carbohydrate research* **2012,** *364*, 28-40.
60. Goyard, D.; Kónya, B.; Chajistamatiou, A.; Chrysina, E. D.; Leroy, J.; Balzarin, S.; Tournier, M.; Tousch, D.; Milhau, J.; Petit, P.; Duret, D.; Maurel, P.; Somsák, L.; Docsa, T.; Praly, J. P.; Vidal, S., Glucose-derived spiro-isoxazolines are anti-hyperglycemic agents against type 2 diabetes through glycogen phosphorylase inhibition. *in preparation*