



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Κατευθυνόμενος-από τη δομή-σχεδιασμός νέων δυνάμει υπογλυκαιμικών  
φαρμάκων με βάση γνωστά βιοδραστικά μόρια ή θραύσματα**

**ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΜΑΡΙΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ  
ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**  
Κατευθυνόμενος-από τη δομή-σχεδιασμός νέων δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων  
με βάση γνωστά βιοδραστικά μόρια ή θραύσματα

**ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ ΜΑΡΙΑ**

**A.M.: 61102**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:**  
**Δρ Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδα, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. Αθανασία ΣΙΑΦΑΚΑ-ΚΑΠΑΔΑΗ, Καθηγήτρια.....**
- 2. Θωμάς ΜΑΥΡΟΜΟΥΣΤΑΚΟΣ, Καθηγητής.....**
- 3. Αθανάσιος ΓΚΙΜΗΣΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής .....**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 28/1/2014**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ή μη εξαρτώμενος από την ινσουλίνη διαβήτης), πλήττει το 90-95% των ασθενών που πάσχουν από τη νόσο του σακχαρώδους διαβήτη και συνδέεται με σοβαρά νοσήματα όπως ισχαιμικά επεισόδια, νεφρική ανεπάρκεια, καρδιαγγειακά νοσήματα και σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες και με τον καρκίνο. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί κύριο ένζυμο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και κατά συνέπεια στη διατήρηση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα. και χρησιμοποιείται ως μοριακός στόχος για την ανακάλυψη και το σχεδιασμό δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Στο ένζυμο αυτό εφαρμόζεται η μέθοδος του κατευθυνόμενου-από τη δομή-σχεδιασμού με σκοπό την ταυτοποίηση ενώσεων με υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση για το μακρομοριακό στόχο. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ταυτοποίηση ενώσεων ή παραγώγων αυτών τα οποία θα αποτελέσουν δυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα με υψηλή εκλεκτικότητα για το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου, με στόχο τη μείωση των παρενεργειών στον ανθρώπινο οργανισμό.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται κρυσταλλογραφικές μελέτες ενώσεων που είχαν προηγουμένα μελετηθεί με κινητικά πειράματα για τη διερεύνηση της ανασταλτικής τους δράσης στο ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Για τον σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν οι τριδιάστατες κρυσταλλικές δομές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως συμπλόκου α) με τέσσερις οργανικές ενώσεις παράγωγα γλυκόζης και β) με πέντε θραύσματα τα οποία αποτελούν τμήματα γνωστών αναστολέων με χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας ακτίνων-Χ. Συγκεκριμένα, τα παράγωγα γλυκόζης που εξετάστηκαν προέκυψαν με εισαγωγή άκυλο-άμινο παραγώγων ως υποκαταστάτων στη β-ανωμερική θέση της γλυκόζης, προκειμένου να μελετηθεί ο τρόπος σύνδεσης αυτών στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τα κινητικά πειράματα υποδεικνύοντας ότι οι ενώσεις αυτές προάγουν την ανενεργό διαμόρφωση του ενζύμου αναστέλοντας τη δράση του. Στην περίπτωση των θραυσμάτων, τα οποία αποτελούν τμήματα μεγαλύτερων ενώσεων οι περισσότερες από τις οποίες προέρχονται από γνωστούς αναστολείς του ενζύμου, παρατηρήθηκε εξαιρετικά ασθενής συγγένεια σύνδεσης. Ωστόσο, αυτά βρέθηκαν να συνδέονται τόσο στο νέο αλλοστερικό κέντρο όσο και στο κέντρο αναστολής σύμφωνα με τις πρόδρομες ενώσεις αυτών. Αν και τα παράγωγα γλυκόζης παρουσιάζονται ως η πλέον προφανής κατηγορία ενώσεων για το σχεδιασμό δυνάμει αντιδιαβητικών

φαρμάκων, φαίνεται πως και η διερεύνηση των θραυσμάτων, μέσω μελέτης των αλληλεπιδράσεων τους με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά χρήσιμα συμπεράσματα για τη «δομική συγγένεια» που επιδεικνύουν λειτουργικές ομάδες όπως αυτή του ινδολίου και του ναφθυλίου για τα διακριτά κέντρα αναστολής του ενζύμου.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Επιστήμες ζωής

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, μεταβολισμός γλυκογόνου, φωσφορυλάση του γλυκογόνου, κατευθυνόμενος-από τη δομή- σχεδιασμός φαρμάκων, κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ

## ABSTRACT

Diabetes mellitus type 2 (or non-insulin dependent diabetes) affects 90-95 % of patients suffering from the disease and is associated with serious diseases such as ischemic stroke, renal failure, cardiovascular disease, and according to recent studies with cancer. Glycogen phosphorylase, a key enzyme in glycogen metabolism that regulates blood sugar levels, is used as a molecular target for the discovery and design of potential hypoglycemic drugs for the treatment of diabetes mellitus type 2.

The method of structure-based drug design is applied on this enzyme to allow the identification of compounds with high affinity and specificity for the macromolecular target. In the frame of the present MSc thesis, the results from structural studies of compounds that were previously evaluated for their inhibitory potency against glycogen phosphorylase are reported. The complex structures of glycogen phosphorylase in a complex with a) four organic compounds glucose derivatives and b) five fragments derived from known inhibitors' scaffold have been determined at high resolution using X-rays from synchrotron radiation sources. More specifically, the glucose derivatives studied, were generated by introducing amino - acyl substituents in the  $\beta$ - anomeric position of glucose in order to examine the possibility of increasing the binding affinity of compounds to the catalytic site. The results confirmed the findings of the kinetic studies showing that those compounds promote the inactive T state conformation and inhibit the enzyme's action. In the case of fragments, most of which are part of known inhibitors of the enzyme, exhibited weak affinity for the enzyme. However, there were found to bind at the new allosteric site and the inhibitor site of the glycogen phosphorylase in accordance with their lead compounds. Although the glucose derivatives is the most obvious class of compounds for the design of antidiabetic agents, it appears that the investigation of the role of fragments and their interactions upon binding at the enzyme with X-ray crystallography sheds light to their significance and might lead to useful observations for the "structural affinity" some functional groups such as indole or naphthyl groups exhibit for the distinct inhibitor binding sites of the enzyme

**SUBJECT AREA:** Life Sciences

**KEYWORDS:** Type 2 diabetes, glycogen metabolism, glycogen phosphorylase, structure-based drug design, X-ray crystallography

**Αφιερωμένο :**

*Στους γονείς μου*

*Στις αδελφές μου*

*Στους παππούδες μου*

*Στην Μάγδα*

*Στην Ανδρεάννα*

*Στην Μαρία*

*Στον Λευτέρη*

*Στον Αλέκο*

*Στον άνθρωπο που προσπαθεί να κατανοήσει μέσω της  
Χημείας τον κόσμο και τον Θεό...*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια Αθανασία Σιαφάκα-Καπάδα για τη συνεργασία και την πολύτιμη συμβολή της στην ολοκλήρωση της. Επίσης την Δρ Ευαγγελία Χρυσίνα για την πολύτιμη βοήθεια και την ευκαιρία που μου έδωσε να λάβω πολύτιμες γνώσεις, μέσω της εκπόνησης του μεταπτυχιακού μου διπλώματος κάτω από συνθήκες πιεσμένου χρόνου λόγω του γεγονότος ότι παράλληλα με την ενασχόληση με την μεταπτυχιακή μου εργασία έπρεπε να εργασθώ για την επιβίωσή μου. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Ντία Γαλανοπούλου η οποία αποτέλεσε την αφορμή να αγαπήσω την Βιοχημεία και αποτελούσε πάντα μια ανοιχτή πόρτα όταν είχα ανάγκη τις συμβουλές της. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές του τομέα της Βιοχημείας κύριο Δημόπουλο και κυρία Μαυρή για την βοήθεια, τη στήριξη και την κατανόησή τους όλο το διάστημα της διδασκαλίας των μεταπτυχιακών μαθημάτων. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την φίλη μου Μάγδα Χεγκάζι για την υποστήριξη και ενθάρρυνσή της καθώς και την Δήμητρα Δρόσου η οποία υπήρξε συνοδοιπόρος μου κατά την εκπόνησης του μεταπτυχιακού μας ως εργαζόμενοι μεταπτυχιακοί φοιτητές.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....</b>	<b>19</b>
<b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΟΣ-ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΜΗ-ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....</b>	<b>21</b>
1.1 Η ανάγκη για την ανακάλυψη καινοτόμων φαρμάκων με υψηλή εξειδίκευση.....	21
1.2 Ο κατευθυνόμενος-από τη δομή- σχεδιασμός φαρμάκων.....	23
1.3 Κατευθυνόμενος-από τη δομή- σχεδιασμός φαρμάκων με βάση θραύσματα (Fragment-Based Drug Design, FBDD.....	28
<b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ.....</b>	<b>30</b>
2.1 Εισαγωγή.....	30
2.2 Πηγές ακτίνων Χ.....	32
2.3 Κρυστάλλωση πρωτεϊνικού στόχου.....	36
2.4 Προσδιορισμός δομής συμπλόκων ενώσεων με πρωτεΐνη στόχο με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.....	40
<b>3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ</b>	<b>44</b>
3.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	44
3.2 Φαρμακευτική αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2.....	46
3.3 Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	47
3.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	50
3.5 Καταλυτικά κέντρα φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	55
<b>4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>59</b>
4.1 Αντικείμενο μελέτης-Σκοπός.....	59
4.2 Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κουνελιού στην (RMGPb).....	59
4.3 Συνθετική πορεία.....	60
α) γλυκοπυρανοζυλιδινο-σπειρο-ιμινοθειαζολιδινονών.....	60
β) θραύσματα μικρού μοριακού βάρους.....	62



4.4 Κινητική μελέτη της RMGPb.....	62
4.5 Κρυσταλλογραφικές μελέτες φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου (RMGPb) ως συμπλόκου με εν δυνάμει αναστολείς.....	64
<b>5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....</b>	<b>69</b>
5.1 Δομικές μελέτες της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως συμπλόκου με γλυκοπυρανοζυλιδινο-σπειρο-ιμινοθειαζολιδιόνες.....	69
5.2 Δομικές μελέτες για θραύσματα οργανικών μορίων προερχόμενα από υπάρχοντες αναστολείς.....	97
<b>6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>132</b>
<b>7. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ– ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΑ.....</b>	<b>137</b>
<b>8. ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</b>	<b>139</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1</b>	: Ο κορμός της ιτιάς. Το 1829 ο Henry Leroux απόμόνωσε 30 g σαλικίνης από 1.5 kg φλοιού ιτιάς.....	23
<b>Σχήμα 2</b>	: Κατευθυνόμενος από την δομή σχεδιασμός φαρμάκων Στάδια της μεθόδου	25
<b>Σχήμα 3</b>	: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου του κατευθυνόμενου-από τη δομή-σχεδιασμού με βάση τυχαίας βιβλιοθήκης θραυσμάτων.....	28
<b>Σχήμα 4</b>	: Wilhelm Röntgen (1845- 1923), Nobel Prize in Physics (1901).....	30
<b>Σχήμα 5</b>	: Σχηματική αναπαράσταση διακριτικής ικανότητας ακτινοβολίας για κάθε περιοχή μήκους κύματος.....	31
<b>Σχήμα 6</b>	: Συμβατική πηγή ακτίνων-Χ, Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.....	32
<b>Σχήμα 7</b>	: Παρουσιάζεται η εφαρμογή των επιμέρους μεθόδων οπτικής παρατήρησης ανάλογα με το μέγεθος του αντικειμένου.....	35
<b>Σχήμα 8</b>	: Μοναδιαία κυψελίδα.....	37
<b>Σχήμα 9</b>	: Σχηματισμός κρυστάλλου.....	37
<b>Σχήμα 10</b>	: Διάγραμμα φάσεων πρωτεϊνικών μακρομοριακών δομών.....	38
<b>Σχήμα 11</b>	: 1. Μέθοδος καθήμενης σταγόνας..... 2. Μέθοδος κρεμάμενης σταγόνας.....	40 40
<b>Σχήμα 12</b>	: Συνοπτική διαδικασία ακτινοβόλισης κρυστάλλου με ακτίνες-Χ.....	43
<b>Σχήμα 13</b>	: Μεταβολική οδός παραγωγής-σύνθεσης γλυκόζης στον οργανισμό.....	45
<b>Σχήμα 14</b>	: Η νησίδα του Langerhans.....	45
<b>Σχήμα 15</b>	: Διάσπαση του α-1,6 γλυκοζιτικού δεσμού στο γλυκογόνο.....	50
<b>Σχήμα 16</b>	: Αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς 1- φωσφορική γλυκόζη.....	51
<b>Σχήμα 17</b>	: Ορμονικός έλεγχος γλυκογονόλυσης και καταρράκτης ενεργοποίησης της φωσφορυλάσης από το cAMP.....	52

<b>Σχήμα 18</b>	: Φωσφορική πυριδοξάλη.....	53
<b>Σχήμα 19</b>	: Μηχανισμός δράσης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	54
<b>Σχήμα 20</b>	: Η τρισδιάστατη δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού.....	55
<b>Σχήμα 21</b>	: Παράγωγα γλυκόζης που συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο	60
<b>Σχήμα 22</b>	: Αντίδραση ακυλίωσης γλυκοπυρανοζυλιδινο-σπειρο-ιμινοθειαζολιδινονών.....	62
<b>Σχήμα 23</b>	: Σχήμα 23. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ της ένωσης CK417 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP <i>b</i> σε 1σ.....	71
<b>Σχήμα 24</b>	: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεων της CK417 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.....	76
<b>Σχήμα 25</b>	: Υπέρθεση των κρυσταλλικών δομών των RMGP <i>b</i> ως συμπλόκου με την σπειροϋδαντοΐνη της γλυκοπυρανόζης και την CK417.....	78
<b>Σχήμα 26</b>	: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ της ένωσης CK418 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP <i>b</i> σε 1σ.....	79
<b>Σχήμα 27</b>	: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων της CK418 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.....	81
<b>Σχήμα 28</b>	: Υπέρθεση των κρυσταλλικών δομών των RMGP <i>b</i> : CK417 (κυανό) και αυτής της σπειροϋδαντοΐνη της γλυκοπυρανόζης (πορτοκαλί) στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.....	85
<b>Σχήμα 29</b>	: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ της ένωσης CK421 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP <i>b</i> σε 1σ.....	86
<b>Σχήμα 30</b>	: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ της ένωσης DTT στο καταλυτικό κέντρο της RMGP <i>b</i> σε 1σ.....	89

<b>Σχήμα 31</b>	: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων DTT κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.....	90
<b>Σχήμα 32</b>	: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων της CK421 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.....	91
<b>Σχήμα 33</b>	: Υπέρθυση των κρυσταλλικών δομών των RMGP <i>b</i> ως συμπλόκου με την CK421 (μωβ) και της RMGP <i>b</i> :CK418 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.....	94
<b>Σχήμα 34</b>	: Σχηματική αναπαράσταση σύγκρισης των CK417,CK418 και CK421.....	95
<b>Σχήμα 35</b>	: Η ένωση CK422 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου μετά τον πρώτο κύκλο βελτιστοποίησης.....	99
<b>Σχήμα 36</b>	: Χημικές δομές και κινητικά αποτελέσματα για τα θραύσματα που μελετήθηκαν.....	96
<b>Σχήμα 37</b>	: Η ένωση CP320626.....	101
<b>Σχήμα 38</b>	: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ του θραύσματος 491361 (FRG4) στο κέντρο αναστολής της RMGP <i>b</i> σε 1σ.....	102
<b>Σχήμα 39</b>	: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων του θραύσματος 491361 FRG4 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου	106
<b>Σχήμα 40</b>	: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του θραύσματος 491361 FRG4 στο κέντρο αναστολής του ενζύμου.....	107
<b>Σχήμα 41</b>	: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ του θραύσματος 17422321 (FRG1) στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP <i>b</i> σε 1σ.....	108
<b>Σχήμα 42</b>	: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων του θραύσματος 17422321 FRG1 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.....	112

<b>Σχήμα 43</b>	: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του θραύσματος 17422321 FRG1 στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται τα αμινοξέα της υπομονάδος που προέρχεται ο αναστολέας ενώ με μωβ τα αμινοξέα της συμμετρικής υπομονάδος.....	113
<b>Σχήμα 44</b>	: Υπέρθυση των τρισδιάστατων δομών του θραύσματος 17422321 με της ένωσης CP320626 ως συμπλόκων με την RMGP <i>b</i> .....	113
<b>Σχήμα 45</b>	: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ του θραύσματος 86964 (FRG8) στο κέντρο αναστολής της RMGP <i>b</i> σε $1\sigma$ .....	114
<b>Σχήμα 46</b>	: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων του θραύσματος 86964 FRG8 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.....	118
<b>Σχήμα 47</b>	: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του θραύσματος 86964 FRG4 στο κέντρο αναστολής του ενζύμου.....	119
<b>Σχήμα 48</b>	: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ του θραύσματος 1125606 FRG11 στο κέντρο αναστολής της RMGP <i>b</i> σε $1\sigma$ .....	120
<b>Σχήμα 49</b>	: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ του θραύσματος 1125606 FRG11 στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP <i>b</i> σε $1\sigma$ .....	120
<b>Σχήμα 50</b>	: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων του θραύσματος 1125606 FRG11 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.....	124
<b>Σχήμα 51</b>	: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του θραύσματος 1125606 FRG11 στο κέντρο αναστολής του ενζύμου.....	125
<b>Σχήμα 52</b>	: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ του θραύσματος 1006946 στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP <i>b</i> σε $1\sigma$ .....	127

<b>Σχήμα 53</b>	: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων της ένωσης 1006946 FRG10 κατά τη σύνδεσή της στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου.....	130
<b>Σχήμα 54</b>	: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του θραύσματος 1006946 FRG10 στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου.....	131
<b>Σχήμα 55</b>	: Τομή (κατά μήκος του άξονα που βρίσκεται κάθετος στο επίπεδο της σελίδας από τον αναγνώστη προς το σχήμα) της επιφάνειας του καταλυτικού κέντρου της RMGP <i>b</i> όπου παρουσιάζεται ο τρόπος σύνδεσης των ενώσεων CKs κατά μήκος του ενεργού κέντρου. Παρατηρείται ότι η θέση του δακτυλίου της γλυκοπυρανόζης διατηρείται ενώ οι αρωματικοί υποκαταστάστες εντοπίζονται στο β-υποκέντρο..	133
<b>Σχήμα 56</b>	: Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_o-F_c$ των θραυσμάτων που μελετήθηκαν. Υποδεικνύεται το κέντρο σύνδεσης καθώς και η ανασταλτική δράση αυτών στην RMGP <i>b</i> σε 1σ.....	134
<b>Σχήμα 57.</b>	Υπέρθωση των θραυσμάτων που συνδέονται στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .	135

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1</b>	: Γλυκοπυρανοζυλιδινο-σπειρο- ιμινοθειαζολιδινόνες.....	69
<b>Πίνακας 2</b>	: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP <i>b</i> :CK417.....	72
<b>Πίνακας 3</b>	: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης CK417 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	73
<b>Πίνακας 4</b>	: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση CK417 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP <i>b</i> .....	74
<b>Πίνακας 5</b>	: Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης CK417 και των αμινοξέων και των νερών του καταλυτικού κέντρου της RMGP <i>b</i> .....	75
<b>Πίνακας 6</b>	: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP <i>b</i> :CK418.....	72
<b>Πίνακας 7</b>	: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης CK418 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	82
<b>Πίνακας 8</b>	: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση CK418 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP <i>b</i> .....	82
<b>Πίνακας 9</b>	: Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης CK418 και των αμινοξέων και των νερών του καταλυτικού κέντρου της RMGP <i>b</i> .....	83
<b>Πίνακας 10</b>	: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης CK421 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	86

<b>Πίνακας 11</b>	: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης CK421 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	92
<b>Πίνακας 12</b>	: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση CK421 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP <i>b</i> .....	92
<b>Πίνακας 13</b>	: Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης CK421 και των αμινοξέων και των νερών του καταλυτικού κέντρου της RMGP <i>b</i> .....	93
<b>Πίνακας 14</b>	: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης CK422 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	96
<b>Πίνακας 15</b>	: Θραύσματα οργανικών ενώσεων που μελετήθηκαν δομικά. Υποδεικνύεται ο τρόπος αρίθμησης των επί μέρους ατόμων.....	99
<b>Πίνακας 16</b>	: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP <i>b</i> :491361.....	103
<b>Πίνακας 17</b>	: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 491361 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο κέντρο αναστολής της RMGP <i>b</i> .....	104
<b>Πίνακας 18</b>	: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση 491361 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του κέντρου αναστολής της RMGP <i>b</i> .....	104
<b>Πίνακας 19</b>	: Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 491361 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο κέντρο αναστολής της RMGP <i>b</i> .....	105
<b>Πίνακας 20</b>	: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP <i>b</i> :17422321.....	108
<b>Πίνακας 21</b>	: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 17422321 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	111



<b>Πίνακας 22</b>	: Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 17422321 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	111
<b>Πίνακας 23</b>	: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP <i>b</i> :86964.....	114
<b>Πίνακας 24</b>	: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 89964 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο κέντρο αναστολής της RMGP <i>b</i> .....	117
<b>Πίνακας 25</b>	: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση 86964 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του κέντρου αναστολής της RMGP <i>b</i> .....	117
<b>Πίνακας 26</b>	: Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 86964 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο κέντρο αναστολής της RMGP <i>b</i> .....	117
<b>Πίνακας 27</b>	: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP <i>b</i> :1125606.....	121
<b>Πίνακας 28</b>	: Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 1125606 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο κέντρο αναστολής της RMGP <i>b</i>	123
<b>Πίνακας 29</b>	: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 1125606 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	125
<b>Πίνακας 30</b>	: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση 1125606 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	125
<b>Πίνακας 31</b>	: Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 1125606 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	126
<b>Πίνακας 32</b>	: Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP <i>b</i> :1006946.....	128

<b>Πίνακας 33</b>	:	Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 1006946 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	129
<b>Πίνακας 34</b>	:	Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 1006946 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGP <i>b</i> .....	129

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση του μεταπτυχιακού μου διπλώματος πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών στο πλαίσιο συνεργασίας με το Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στο διάστημα αυτό εκπαιδεύτηκα σε βασικές αρχές κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ και στην εφαρμογή της μεθόδου του κατευθυνόμενου-από τη δομή-σχεδιασμού δυνάμει φαρμάκων χρησιμοποιώντας ως πρότυπο το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Συγκεκριμένα ασχολήθηκα με τον προσδιορισμό της τριδιάστατης δομής του ενζύμου ως συμπλόκου με δυνάμει αναστολείς αυτού. Τέτοιοι αναστολείς αποτελούσαν παράγωγα γλυκόζης και θραύσματα μικρού μοριακού βάρους για την αξιοποίηση αυτών ως πρόδρομες ενώσεις για το σχεδιασμό ισχυρών αντιδιαβητικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΜΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

#### 1.1 Η ανάγκη για την ανακάλυψη καινοτόμων φαρμάκων με υψηλή εξειδίκευση.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ραγδαία αύξηση των ασθενών που πάσχουν από χρόνιες νόσους λόγω του σύγχρονου τρόπου ζωής και των περιβαλλοντικών συνθηκών. Το διαρκώς αυξανόμενο κόστος για τη νοσηλεία και θεραπεία των ασθενών έχει καταστεί αφόρητο παγκοσμίως, ιδιαίτερως για τους δημόσιους φορείς ασφάλισης που λειτουργούν ως χρηματοδότες. Ως εκ τούτου, η ανακάλυψη και η παραγωγή αποτελεσματικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση ή/και τη θεραπεία των ασθενιών αυτών είναι επιτακτική. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το 2003 στις Η.Π.Α. το κόστος για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών ουσιών υπολογίζεται πως ξεπερνούσε τα 800 εκατομύρια δολάρια. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιούνται εκτενείς μελέτες για την ανακάλυψη καινοτόμων φαρμάκων, την αξιολόγηση του κόστους ανάπτυξης και παραγωγής αυτών καθώς και το πώς αυτό διαμορφώνεται με την πάροδο του χρόνου [<http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n5/full/nrd1382.html>].

Κατά τα τελευταία 60 χρόνια, η φαρμακευτική βιομηχανία έχει παραδώσει στην παγκόσμια κυκλοφορία πάνω από 1.220 νέα φάρμακα τα οποία έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στη βελτίωση της δημόσιας υγείας και την παράταση του προσδόκιμου ζωής των ασθενών (κατά μέσο όρο δύο μήνες ετησίως). Παρ' όλα αυτά διαφαίνεται πως ο ρυθμός ανακάλυψης και παραγωγής νέων φαρμάκων φθίνει ενώ το κόστος διατηρείται στα ύψη με αποτέλεσμα να ισοπεδώνονται οι πωλήσεις των φαρμακοβιομηχανιών [1].

#### *Ιστορική αναδρομή*

Η πρώτη αναφορά στα βότανα και τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες έγινε στην Κίνα το 2700 π.Χ. Στη συνέχεια το 1550 π.Χ. σε αιγυπτιακούς παπύρους καταγράφεται ένας μεγάλος αριθμός ασθενειών καθώς και πλήθος συνταγών για την αντιμετώπισή τους. Ο μεγάλος φιλόσοφος Αριστοτέλης (384-322 π.Χ.) έκανε σημαντικές παρατηρήσεις κατά τη χορήγηση βοτάνων στα ζώα. Ο δε μαθητής του Θεόφραστος (372-287 π.Χ.) ταξινόμησε όλα τα μέχρι τότε γνωστά φαρμακευτικά φυτά στο μεγάλο του έργο "Φυτών

αιτίαι και Φυτών ιστορία". Το έργο αυτό συμπληρώθηκε από τον Έλληνα γιατρό και φαρμακοποιό Διοσκουρίδη τον Πεδάνιο (1ος μ.Χ. αιώνα). Στο περίφημο έργο του "Περί ύλης ιατρικής" (Materia Medica), (77-78 μ.Χ.), που αποτυπώθηκε σε πέντε βιβλία και αποτέλεσε μια πλήρη πραγματεία περί φαρμακολογίας, περιγράφονται πάνω από 600 φαρμακευτικά φυτά. Η περίοδος της Αναγέννησης στην Ευρώπη επέφερε σημαντικές εξελίξεις στον τομέα της φαρμακολογικής έρευνας. Κατά τη διάρκεια του 17<sup>ου</sup> και 18<sup>ου</sup> αιώνα άνθησε το εμπόριο φαρμακευτικών προϊόντων καθώς κάνουν την εμφάνισή τους τα πρώτα πειράματα ιατρικής. Ο 19<sup>ος</sup> αιώνας χαρακτηρίζεται από τη ραγδαία ανάπτυξη της χημείας, γεγονός που διευκόλυνε το χημικό προσδιορισμό και τη μελέτη των δραστικών φαρμακευτικών ουσιών φυσικής προέλευσης [<http://www.virbac.gr/p-virbacgrpugr/pdf/1EisagogiN.pdf>].

Οι ενώσεις που χορηγούντο, ως δυνάμει φάρμακα, ήταν στην πλειοψηφία τους φυσικά προϊόντα και προκαλούσαν πολλές παρενέργειες, λόγω των προσμίξεων που έφεραν καθώς και της χαμηλής τους εξειδίκευσης. Έτσι, τα αποτελέσματα που συλλέγονταν περιοριζόνταν μόνο σε παρατηρήσεις χωρίς να είναι εφικτή η βαθύτερη ανάλυση/ερμηνεία αυτών.

Η Αναλυτική και Οργανική Χημεία επεκτάθηκε με ταχύτατο ρυθμό κατά τον 19<sup>ο</sup> και 20<sup>ο</sup> αιώνα με σημαντικό αριθμό νέων ανακαλύψεων και πειραματικών τεχνικών. Η πρόοδος που σημειώθηκε ιδιαίτερα σε τεχνικές διαχωρισμού όπως η εκχύλιση και η χρωματογραφία συνέβαλαν στην απομόνωση των φυσικών δραστικών ουσιών σε υψηλά επίπεδα καθαρότητας, οι οποίες ήταν στο μεγαλύτερο ποσοστό τους ελεύθερες ανεπιθύμητων προσμίξεων. Με τον τρόπο αυτό, επιτεύχθηκε η ελαχιστοποίηση των παρενεργειών που παρατηρούνταν κατά τη χορήγησή τους. Στην άνθηση αυτή συνέβαλαν μια σειρά από έξοχους οργανικούς συνθετικούς χημικούς που βελτίωσαν τις μέχρι τότε εργαστηριακές συσκευές αλλά και ανέπτυξαν μεθόδους σύνθεσης των δραστικών ουσιών για την παραγωγή τους σε μεγάλη απόδοση και υψηλή καθαρότητα σε μικρό χρόνο. Χαρακτηριστικά, αναφέρεται ο Γερμανός Justus von Liebig (1803-1873), ο οποίος συνεισέφερε επίσης πολλά στον τομέα του προσδιορισμού της στοιχειακής σύνθεσης των οργανικών ενώσεων [[http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_history.htm](http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_history.htm)].



**Σχήμα 1. Ο κορμός της ιτιάς. Το 1829 ο Henry Leroux απομόνωσε 30 g σαλικίνης, η οποία έχει αναλγητικές ιδιότητες, από 1.5 kg φλοιού ιτιάς [[http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_ASA.htm](http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_ASA.htm)].**

Παράλληλα, η περίθλαση των ακτίνων-Χ από κρυστάλλους ανόργανων ενώσεων καθιέρωσε τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ ως ένα εργαλείο για την αποκάλυψη της διάταξης των ατόμων στο χώρο. Η μέθοδος επεκτάθηκε στη μελέτη αρχικά σχετικά απλών οργανικών μορίων και αξιοποιήθηκε για την ταυτοποίηση δραστικών ουσιών, δυνάμει φαρμάκων. Αργότερα η κρυσταλλογραφία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δομής πεπτιδίων καθώς και πολυπλοκότερων μορίων όπως οι πρωτεΐνες. Ακολούθησε, η μελέτη της τριδιάστατης δομής μακρομορίων (πρωτεΐνη στόχος ή υποδοχέας) ως συμπλόκων με δυνάμει φάρμακα (προσδέτης), για την καλύτερη κατανόηση του τρόπου αλληλεπίδρασης αυτών με το μακρομοριακό στόχο καθώς και του μηχανισμού δράσης τους για την αντιμετώπιση/θεραπεία ασθενειών.

## **1.2 Ο κατευθυνόμενος-από τη δομή- σχεδιασμός φαρμάκων**

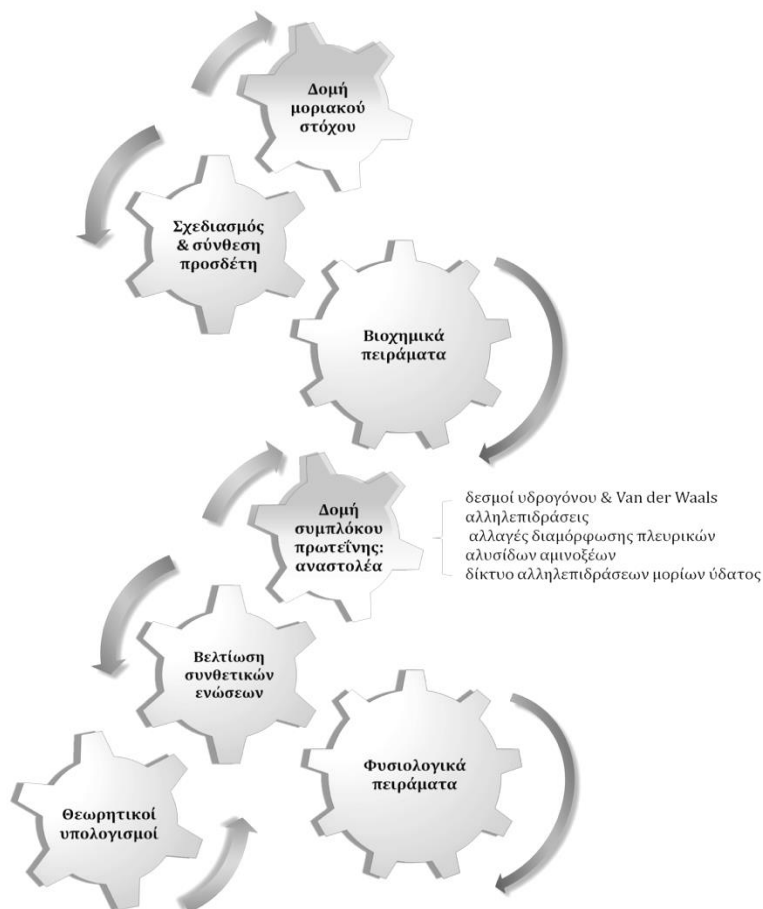
Για τον σχεδιασμό φαρμάκων με υψηλή εξειδίκευση απαραίτητη είναι η καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας των μακρομοριακών στόχων. Η λειτουργία μιας πρωτεΐνης, σχετίζεται με τις διαφορετικές διαμορφώσεις που λαμβάνει κατά τη σύνδεση ενός προσδέτη και γι' αυτό το λόγο αρχικά μελετάται η δομή της απουσία του προσδέτη. Στη συνέχεια είτε ο προσδέτης είναι μια άλλη πρωτεΐνη ή τμήμα αυτής (πεππίδιο) είτε

μια χημική ένωση, μελετώνται οι αλληλεπιδράσεις του στόχου με τον προσδέτη για την αποτύπωση των σχέσεων δομής-λειτουργίας [2].

Ο κατευθυνόμενος-από τη δομή-σχεδιασμός φαρμάκων (Structure-Based Drug Design, SBDD) στηρίζεται στη γνώση της τριδιάστατης δομής του μακρομοριακού στόχου και έχει ως σκοπό την ανακάλυψη και ταυτοποίηση προσδετών, συνήθως χημικών ενώσεων ή παραγώγων αυτών, που θα αποτελέσουν δυνάμει φάρμακα [3]. Υπάρχουν αρκετά παραδείγματα ενζύμων στα οποία εφαρμόστηκε η μέθοδος, π.χ. η HIV-1 πρωτεάση, τυροσινική κινάση και η θρομβίνη για τα οποία σχεδιάστηκαν προσδέτες με αυξημένη συγγένεια σύνδεσης και εκλεκτικότητα [4].

Τα στάδια που ακολουθούνται για το σχεδιασμό φαρμάκων με βάση την τριδιάστατη δομή του στόχου περιλαμβάνουν: α) το δομικό χαρακτηρισμό και προσδιορισμό των διακριτών κέντρων σύνδεσης του μακρομορίου-στόχου, β) το σχεδιασμό και τη σύνθεση ενώσεων οι οποίες φαίνεται να επηρεάζουν τη βιολογική λειτουργία ενός πρωτεϊνικού στόχου και χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ενώσεις, γ) την αξιολόγηση, μέσω βιοχημικών πειραμάτων των προς μελέτη ενώσεων ως προς τη συγγένεια που παρουσιάζουν για το μακρομόριο, δ) τις δομικές μελέτες του συμπλόκου μακρομορίου-προσδέτη με μεθόδους όπως η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, ε) τη μελέτη του τρόπου σύνδεσης του προσδέτη στο μακρομοριακό στόχο (π.χ. ανάλυση αλληλεπιδράσεων), στ) το σχεδιασμό βελτιωμένων παραγώγων των πρόδρομων ενώσεων με εισαγωγή λειτουργικών ομάδων ως υποκαταστατών και τη διεξαγωγή θεωρητικών υπολογισμών πρόσδεσης (*in silico docking*) και τέλος ζ) τα φυσιολογικά πειράματα, όταν εντοπιστεί ένα παράγωγο της πρόδρομου ένωσης. Από τα παραπάνω στάδια η μελέτη του τρόπου σύνδεσης του προσδέτη στο μακρομοριακό στόχο και συγκεκριμένα η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει με τον υποδοχέα αποτελεί ένα από τα κρίσιμότερα σημεία της εφαρμογής της μεθόδου αφού καθορίζει το ρυθμό εξέλιξης της διαδικασίας [5].





**Σχήμα 2. Κατευθυνόμενος από την δομή σχεδιασμός φαρμάκων όπου παρουσιάζονται τα στάδια της μεθόδου [5].**

Ο κατευθυνόμενος-από τη δομή-σχεδιασμός φαρμάκων διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες:

**α) Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων με βάση μια γνωστή πρόδρομο ένωση.**

Τα τελευταία χρόνια αξιοποιώντας τη γνώση που προέκυψε από την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-προσδέτη οι επιστήμονες προχώρησαν στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Η στρατηγική που ακολουθείται στον ορθολογικό σχεδιασμό δυνάμει φαρμάκων (Rational drug design) αφορά σε ήδη γνωστούς προσδέτες (πρόδρομες ενώσεις) ενός πρωτεϊνικού στόχου με σκοπό την

δημιουργία νέων μορίων τα οποία θα επιδεικνύουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και χημική συγγένεια προς τον στόχο. Ενδεικτικό παράδειγμα αυτής της στρατηγικής αποτελεί η εφαρμογή της μεθόδου για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό αντιδιαβητικών φαρμάκων. Το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποικοδομεί το γλυκογόνο (φυσιολογικό υπόστρωμα) σε γλυκόζη μέσω της διαδικασίας της γλυκογονόλυσης. Η γλυκόζη έχει χρησιμοποιηθεί ως ένωση οδηγός για το σχεδιασμό και σύνθεση πλήθους ενώσεων, υποκατεστημένων παραγώγων αυτής, μερικά εκ των οποίων αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της δράσης του ενζύμου κατά τη σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο αυτού.

Σήμερα, η ίδια στρατηγική εφαρμόζεται και για την αξιοποίηση διακριτών τμημάτων, τα λεγόμενα θραύσματα, γνωστών προσδετών, οι αλληλεπιδράσεις των οποίων ενδεχομένως αποτελούν καθοριστικής σημασίας παραμέτρους για τη σύνδεση του προσδέτη στο στόχο. Τα θραύσματα αυτά στη συνέχεια αξιοποιούνται εκ νέου ως πρόδρομες ενώσεις στις οποίες προστίθενται λειτουργικές ή φαρμακοφόρες ομάδες [5].

### **β) Σχεδιασμός φαρμάκων από σάρωση τυχαίας βιβλιοθήκης ενώσεων ή θραυσμάτων.**

Στο σχεδιασμό δυνάμει φαρμάκων από σάρωση τυχαίας βιβλιοθήκης (Random screening) ενώσεων, συνήθως πραγματοποιούνται *in silico* δοκιμές πρόσδεσης αυτών στο μακρομοριακό στόχο. Οι επικρατέστερες από αυτές με βάση την ενέργεια σύνδεσης τους στην πρωτεΐνη, χρησιμοποιούνται για κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Σχήμα 2).

Η ιδέα του σχεδιασμού φαρμάκων βάσει των θραυσμάτων αναπτύχθηκε κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990. Σε μελέτες που διεξήχθησαν από επιστήμονες της Abbott για την κατανόηση των σχέσεων δομής-λειτουργίας με τη βοήθεια θραυσμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Στην κατεύθυνση αυτή εργάστηκαν αρκετές ακαδημαϊκές ομάδες μελετώντας τη συστηματική σύνδεση των μορίων ύδατος στον πρωτεϊνικό στόχο. Ωστόσο, η πρώτη σάρωση θραυσμάτων με χρήση κρυσταλλογραφίας

ακτίνων-Χ για την ανακάλυψη δυνάμει φαρμάκων έγινε από μια ακόμα ομάδα της Abbott. Τα αποτελέσματα αυτών των εργασιών χρησιμοποιήθηκαν και αναπτύχθηκαν από διάφορες μικρομεσαίες εταιρείες τεχνολογίας [11-12]. Η μέθοδος αυτή αναλύεται εκτενέστερα στο κεφάλαιο 1.3.

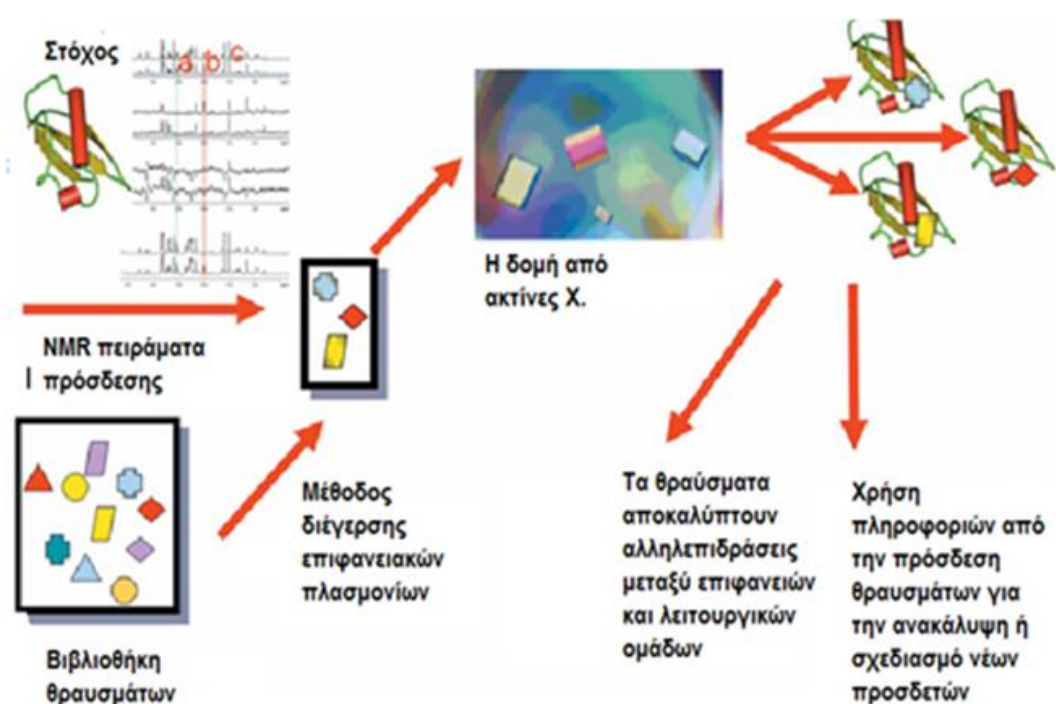
Τα τελευταία χρόνια, σημειώνεται σημαντική πρόοδος στην έρευνα που διεξάγεται για τον κατευθυνόμενο-από τη δομή- σχεδιασμό. Αυτή κυρίως οφείλεται στην αξιοποίηση της γνώσης που έχει προκύψει από την υψηλής ευκρίνειας τριδιάστατη δομή συμπλόκων ενώσεων με τον στόχο, αλλά και από τα εργαλεία βιοπληροφορικής που διατίθενται. Ειδικότερα, έχουν αναπτυχθεί αλγόριθμοι που λαμβάνουν υπ' όψιν τόσο τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων που συνθέτουν ένα κέντρο σύνδεσης (π.χ. υδροφοβικότητα) όσο και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά αυτού (π.χ. προσβασιμότητα). Έτσι, παρατίθενται πλέον στη βιβλιογραφία για αρκετούς μακρομοριακούς στόχους περιοχές μεγάλου ενδιαφέροντος, «**hotspots**», οι οποίες αφορούν για παράδειγμα το καταλυτικό κέντρο ενός ενζύμου και τις υποπεριοχές αυτού οι οποίες συμβάλλουν σημαντικά στη βελτίωση της ενέργειας σύνδεσης. Η χαρτογράφηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων που εντοπίζονται σε αυτές τις περιοχές και των λειτουργικών ομάδων των προσδετών που φιλοξενούν, παρέχουν εξαιρετικά χρήσιμες πληροφορίες για το σχεδιασμό ενώσεων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά για το στόχο. Η χρήση των θραυσμάτων έχει αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμη σε αυτές τις περιπτώσεις [12].

Οι ραγδαίες τεχνολογικές εξελίξεις στην έκφραση και παραγωγή πρωτεϊνών, σε καθαρότητα κατάλληλη για κρυσταλλογραφικές μελέτες, επιτρέπουν την εφαρμογή της μεθόδου του κατευθυνόμενου-από τη δομή-σχεδιασμού και σε πολυπλοκότερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Στην περίπτωση αυτή ως προσδέτης θεωρείται μια πρωτεΐνη, η οποία τροποποιείται κατάλληλα προκειμένου να σημειώνει τις βέλτιστες αλληλεπιδράσεις στη διεπιφάνεια σύνδεσής της με το στόχο [9]. Μελέτες τέτοιου είδους πραγματοποιούνται κατά το σχεδιασμό αντισωμάτων ή εμβολίων όπου η γνώση της δομής ενός αντιγόνου, ως συμπλόκου με έναν ή περισσότερους επιτόπους, και η απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος, αξιοποιείται για το σχεδιασμό νέων εμβολίων για την αντιμετώπιση επικίνδυνων ασθενειών [10].

### 1.3 Κατευθυνόμενος-από τη δομή- σχεδιασμός φαρμάκων με βάση θραύσματα (Fragment-Based Drug Design, FBDD).

Η μέθοδος είναι αρκετά σημαντική για την κατανόηση της σχέσης δομής-λειτουργίας του συμπλόκου πρωτεΐνης-θραύσματος. Η διαδικασία που ακολουθείται για την ταυτοποίηση των θραυσμάτων παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3).

Τα θραύσματα είναι μικρά οργανικά μόρια (100–250 Da) τα οποία εμφανίζουν συνήθως χαμηλή συγγένεια σύνδεσης (~100  $\mu$ M έως 10 mM) όπως έδειξαν κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες αυτών ως συμπλόκων με πρωτεϊνικούς στόχους [11]



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου του κατευθυνόμενου-από τη δομή-σχεδιασμού με βάση τυχαίας βιβλιοθήκης θραυσμάτων [11].

Η χαμηλή συγγένεια σύνδεσης που επιδεικνύουν οφείλεται κυρίως στη μικρή πολυπλοκότητα της χημικής τους δομής και στο μέγεθος τους. Ωστόσο, οι πληροφορίες που εξάγονται από το σχηματισμό των παραπάνω συμπλόκων δίνουν τη δυνατότητα ταυτοποίησης νέων κέντρων σύνδεσης προς περαιτέρω διερεύνηση. Παράλληλα, υποδεικνύουν τις δυνατές διαμορφώσεις που μπορούν να λάβουν τα αμινοξέα που συνθέτουν ένα ή περισσότερα κέντρα σύνδεσης τα οποία είτε γειτνιάζουν είτε υπόκεινται σε δομικές αλλαγές μέσω μεταβολών του διαλύτη [12].

Τα θραύσματα έχουν αναδειχθεί ως αξιόπιστα εργαλεία για την ταυτοποίηση πρόδρομων ενώσεων. Οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν κατά τη σύνδεσή τους στο στόχο είναι καθοριστικής σημασίας. Οι συνθετικοί χημικοί, λαμβάνοντας υπ' όψιν τον τρόπο σύνδεσης των θραυσμάτων, προσθέτουν λειτουργικές ομάδες σε αυτά, οι οποίες αναμένεται να αναπτύξουν ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τον στόχο και να οδηγήσουν σε νέα παράγωγα με υψηλή εκλεκτικότητα αλλά και αυξημένη συγγένεια σύνδεσης με την πρωτεΐνη [12].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα της συγκεκριμένης προσέγγισης αποτελεί η ανακάλυψη του φαρμάκου vemurafenib για το μεταστατικό μελάνωμα το οποίο τέθηκε σε κυκλοφορία το 2011. Ο κύριος ερευνητής, της ομάδας που ανακάλυψε το παραπάνω φάρμακο, Chris Lipinski, αναφέρει [12].

*“If I had to single out one technology that really took me by surprise and has been very successful, it has been fragment screening,”*

*“ Αν έπρεπε να επιλέξω μία τεχνολογία που πραγματικά με αιφνιδίασε και είναι αρκετά επιτυχής, αυτή είναι η σάρωση θραυσμάτων”*

και

*“If someone had told me 15 years ago that you could take a low-affinity, low-weight hit and build it into a clinical candidate, I would not have believed him”*

*“ Αν κάποιος μου είχε πει πριν από 15 χρόνια ότι θα μπορούσε κανείς να πάρει έναν χαμηλής συγγένειας και χαμηλού (μοριακού) βάρους προσδέτη και να τον «δομήσει» σε ένα δυνάμει φάρμακο για κλινικές μελέτες , δεν θα τον πίστευα)*

Ένα παράδειγμα θραυσμάτων τα οποία έχουν προκύψει από τμήματα γνωστών προσδετών περιγράφεται από τους Krimm, Lancelin και Praly (2012) για αναστολείς του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ενός θεραπευτικού στόχου για την αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 [12].

Λαμβάνοντας υπόψη την απουσία της τριδιάστατης δομής ενός υποδοχέα, οι μελέτες διερεύνησης της σύνδεσης ή μη θραυσμάτων σε έναν στόχο μπορούν να δώσουν σπουδαίες πληροφορίες παράλληλα με τις προσπάθειες αξιοποίησης αυτών μέσω της μεθόδου της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΤΙΝΩΝ-Χ

#### 2.1 Εισαγωγή

Ακτίνες-Χ ή ακτίνες Röntgen αποκαλείται ένα τμήμα του ηλεκτομαγνητικού φάσματος με περιοχή μήκους κύματος μεταξύ 10nm με 10 pm που αντιστοιχεί σε περιοχή συχνότητας από 30 PHz-30 EHz και σε περιοχή ενέργειας 120 eV -120 keV. Αυτή η περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται σε μήκος κύματος μεταξύ αυτού, της υπεριώδους ακτινοβολίας και των ακτίνων γ.

Η δεύτερη ονομασία της ακτινοβολίας προέρχεται από το όνομα ενός από τους πρώτους ερευνητές, του Γερμανού φυσικού *Wilhelm Röntgen*, ο οποίος τις ανακάλυψε το 1895.



Σχήμα 4. Wilhelm Röntgen (1845- 1923), Nobel Prize in Physics (1901)

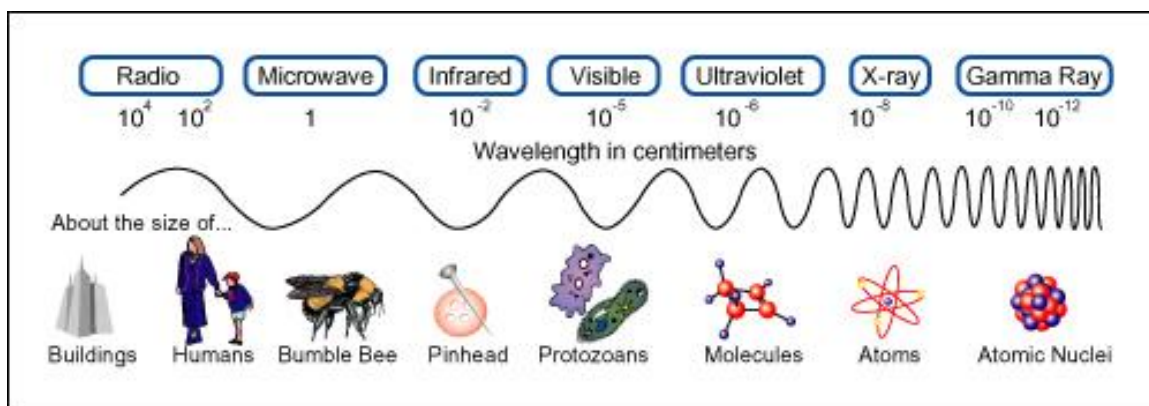
Οι ακτίνες-Χ ανήκουν στις ιονίζουσες ακτινοβολίες, αφού η ενέργειά τους είναι ικανή να προκαλέσει τον ιονισμό ατόμων και μορίων διεγείροντας τα ηλεκτρόνιά τους. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν στην Ιατρική ως διαγνωστικό εργαλείο για τη λήψη ακτινογραφίας καθώς και στη Φυσική και τη Χημεία για την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής μικρών μορίων [[http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BA%CF%84%CE%AF%CE%BD%CE%B5%CF%82\\_%CE%A7](http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BA%CF%84%CE%AF%CE%BD%CE%B5%CF%82_%CE%A7)].

Οι ακτίνες-Χ κατηγοριοποιούνται σε μαλακές και σκληρές ακτίνες-Χ ανάλογα με το μήκος κύματος στο οποίο εκπέμπονται και την ενέργεια αυτών (10 nm-100 pm, 30

PHz-3 HHz, 12 eV-120 keV) και σκληρές ακτίνες-X (100-10 pm. 3-30 HHz, 12-120 keV).

Η διάκριση μεταξύ των ακτίνων-X και ακτίνων γ άλλαξε τις τελευταίες δεκαετίες. Παλαιότερα, υπήρχε και 3<sup>η</sup> κατηγορία ακτίνων X, αλλά αυτές εντάχθηκαν στις ακτίνες γ, γιατί προκαλούσαν επιπλέον διεγέρσεις και στους πυρήνες ατόμων.

Ένα αντικείμενο όταν εκτίθεται σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία γίνεται αντιληπτό όταν οι διαστάσεις του είναι ανάλογες με το μήκος κύματος αυτής. Για τον προσδιορισμό της τριδιάστατης δομής βιολογικών μακρομοριακών στόχων χρησιμοποιούνται ακτίνες-X (με μήκος κύματος Ångström range,  $\sim 10^{-10}$  m) διότι το μήκος των δεσμών των ατόμων της ένωσης που μελετάται είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Συγκεκριμένα, η προσπίπτουσα ακτινοβολία περιθλάται από το ηλεκτρονιακό νέφος ενός ατόμου [14].



Σχήμα 5: Παρουσιάζονται οι διαφορετικές περιοχές μήκους κύματος (σε cm) της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στις οποίες μπορεί να παρατηρηθεί ένα αντικείμενο ανάλογα με το μέγεθος του [<http://spaceplace.nasa.gov/cosmic-colors/>].

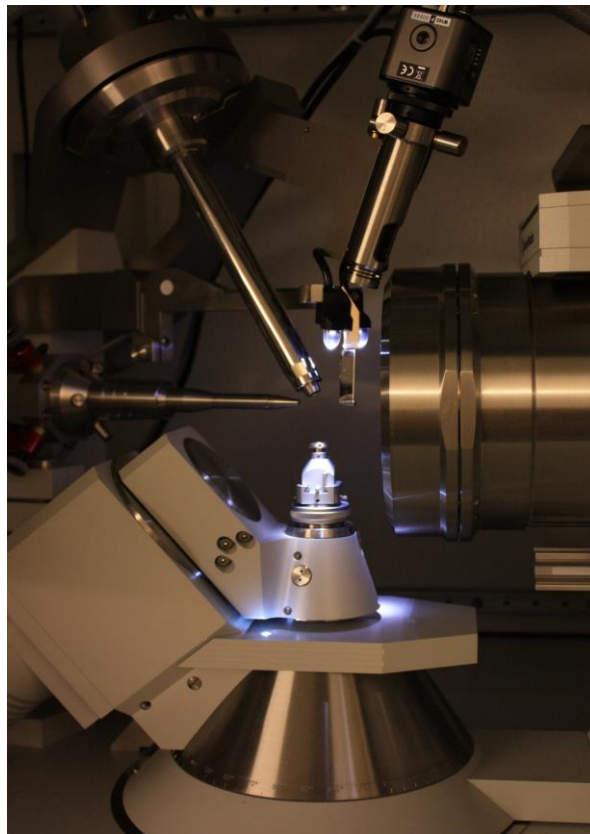
Πρώτος ο Max von Laue (βραβείο Nobel 1914) έχοντας σκοπό να ελέγξει την υπόθεση ότι οι ακτίνες X είναι κυματικής φύσεως, με μήκη κύματος της τάξεως του 1 Å, πρότεινε το πρώτο πείραμα, το οποίο έφεραν επιτυχώς εις πέρας οι W. Friedrich και P. Knipping. Σε λιγότερο από ένα χρόνο ο W. L. Bragg έλυσε την πρώτη δομή, αυτή του NaCl (βραβείο Nobel 1925) και διατύπωσε τη μαθηματική εξίσωση η οποία έλαβε και το όνομα του δηλαδή τον **νόμο του Bragg** :

$$4\pi d \sin\theta = 2\pi n\lambda \rightarrow n\lambda = 2d \sin\theta$$

Σύμφωνα με τον παραπάνω νόμο η προσπίπτουσα, υπό γωνία  $\theta$ , μονοχρωματική ακτινοβολία σε έναν κρύσταλλο περιθλάται με την ίδια γωνία  $\theta$ , όπου  $h, k, l$  ονομάζονται δείκτες Miller και ορίζουν τα εσωτερικά επίπεδα συμμετρίας του κρυστάλλου,  $d$  ορίζεται η απόσταση μεταξύ αυτών και  $\lambda$  το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

## 2.2 Πηγές ακτίνων-Χ

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος παραγωγής ακτίνων Χ είναι μέσω της επιτάχυνσης ηλεκτρονίων από δυναμικό τάξης μεγέθους των δεκάδων χιλιάδων βολτ και πρόσπτωσής τους σε στόχο ο οποίος αποτελείται από μεταλλικό υλικό μεγάλου ατομικού αριθμού, συνήθως βολφράμιο ή μολυβδένιο.



Σχήμα 6. Συμβατική πηγή ακτίνων-Χ, Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.



Τα προσπίπτοντα στο στόχο ηλεκτρόνια, χάνουν σταδιακά την ενέργεια τους, αφού υφίστανται επιβραδύνσεις από τα άτομα του υλικού του στόχου. Εντούτοις, η ενέργεια που αποδίδουν στα άτομα του στόχου είναι αρκετή για να διεγείρει και ηλεκτρόνια των εσωτερικών στοιβάδων των ατόμων. Αποτέλεσμα αυτού είναι η συμπλήρωση των εσωτερικών στοιβάδων από ηλεκτρόνια υψηλότερων ενεργειακά στοιβάδων και έτσι παράγονται τα φωτόνια των ακτίνων Χ.

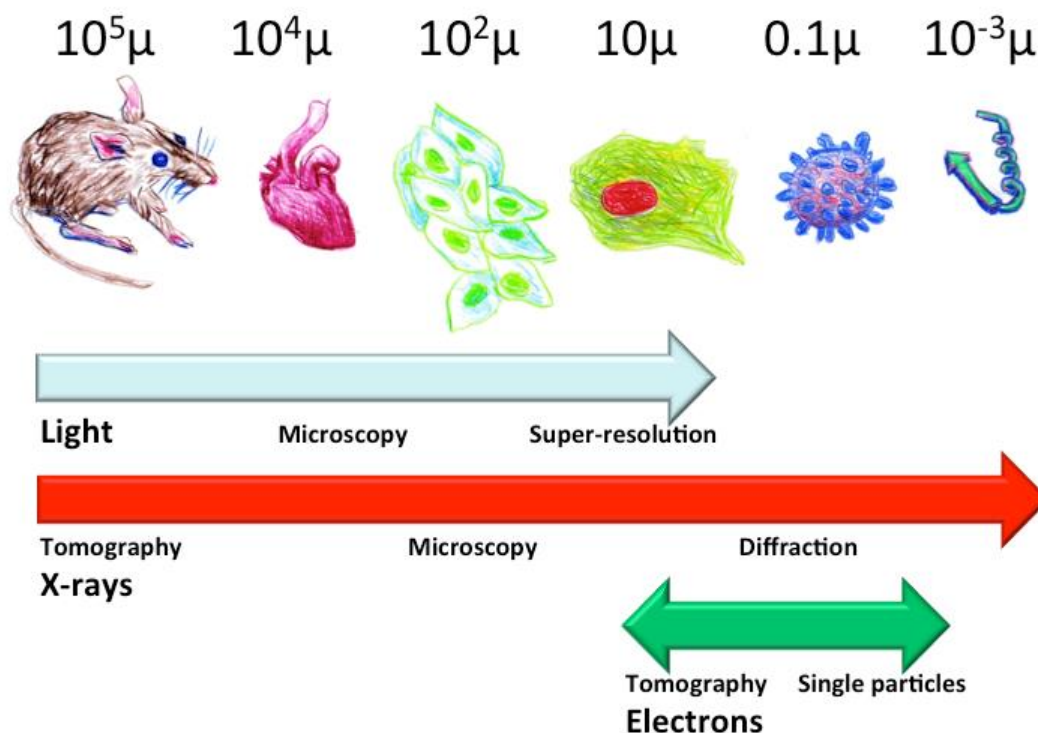
Επειδή τα ηλεκτρόνια που έχουν επιταχυνθεί αρχικά εναποθέτουν συγκεκριμένες τιμές ενέργειας στα άτομα του στόχου, το φάσμα που προέρχεται από την αποδιέγερση και συμπλήρωση των στοιβάδων των ατόμων του μεταλλικού στόχου, είναι γραμμικό. Υπάρχει όμως και ένα συνεχές τμήμα του φάσματος των ακτίνων Χ, το οποίο προέρχεται από τη λεγόμενη ακτινοβολία πέδησης (*Bremsstrahlung*) που δίνεται από τα ηλεκτρόνια που επιταχύνονται από το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο που υπάρχει κοντά στον μεγάλο ατομικού αριθμού πυρήνα [15].

Πέραν των συμβατικών πηγών ακτίνων-Χ, αυτές μπορούν να παραχθούν με υψηλότερη ενέργεια, η οποία ονομάζεται «συγχροτρονική ακτινοβολία» από τον επιταχυντή σωματιδίων «σύγχροτρον» όπου πρωτοπαρατηρήθηκε. Σε μεγάλες εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας (Synchrotron Radiation Sources, SRS) όπως το SRS στο Daresbury Αγγλίας, το DESY στο Αμβούργο Γερμανίας κλπ, φορτισμένα σωματίδια (π.χ ηλεκτρόνια) επιταχύνονται σε κυκλική τροχιά με σχετική ταχύτητα κοντά στην ταχύτητα του φωτός με αποτέλεσμα να αποκτούν υψηλή ενέργεια και να εκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Τα σωματίδια χάνουν την ενέργειά τους κατά της διάρκεια αυτής της διαδικασίας με αποτέλεσμα να απαιτείται η ύπαρξη συνεχούς τροφοδοσίας νέων ηλεκτρονίων. Για τον λόγο αυτό οι επιστήμονες χρησιμοποίησαν δακτύλιους επιτάχυνσης ηλεκτρονίων οι οποίοι λειτουργούν υπό κενό και έχουν τοποθετημένους στην περιφέρειά τους ισχυρούς ηλεκτρομαγνήτες και καθρέπτες που με τη σειρά τους προκαλούν κάμψη της τροχιάς των ηλεκτρονίων σε περισσότερο ή λιγότερο κυκλικές τροχιές. Συγκεκριμένα, μετά τη διαδικασία εισαγωγής νέων ηλεκτρονίων και την προεπιτάχυσή τους σε τροχιά, αυτά αποκτούν σταθερή ενέργεια και ταχύτητα [<http://www.physics.ntua.gr/POPPHYS/60/synchrotron.html>].

Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιούνται ηλεκτρόνια για την παραγωγή της συγχροτρονικής ακτινοβολίας (και όχι πρωτόνια) είναι ότι όταν μικρής μάζας σωματίδια όπως τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται, επιτυγχάνεται υψηλότερη απόδοση ενέργειας από αυτή που εκπέμπεται από βαριά σωματίδια [26].

Η χρήση των ακτίνων-Χ σήμερα, κυρίως αξιοποιείται για τον προσδιορισμό της τριδιάστατης δομής μακρομορίων με χρήση των μεθόδων α) της κρυσταλλογραφίας, όπου τα πρωτεϊνικά μόρια βρίσκονται διατεταγμένα υπό μορφή κρυστάλλου, β) της σκέδασης των ακτίνων Χ υπό μικρή γωνία, κατά την οποία η πρωτεΐνη είναι σε διάλυμα.

Η υψηλότερη ευκρίνεια που έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα με χρήση της μεθόδου αυτής, είναι για τον προσδιορισμό της δομής μιας πρωτεΐνης μικρού μεγέθους η οποία συναντάται στο λάχανο, της κραμβίνης σε  $0.48 \text{ \AA}$  [<http://www.bio.davidson.edu/molecular/MolStudents/spring2003/Kogoy/protein.html>]. Άλλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της τριδιάστατης δομής πρωτεϊνών, οι οποίες όμως δεν φθάνουν τη διακριτική ικανότητα της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, είναι ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός με διακριτική ικανότητα έως  $1 \mu\text{m}$ , όπου το δείγμα βρίσκεται σε διάλυμα. Ωστόσο υπάρχουν περιορισμοί που αφορούν στο μοριακό βάρος αυτής. Άλλη μια μέθοδος είναι αυτή της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας με διακριτική ικανότητα  $1-2 \text{ nm}$ , η οποία έχει αναπτυχθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια. Συχνά συνδυάζεται με την κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, γνωστή ως ηλεκτρονική κρυσταλλογραφία μια από τις πλέον σύγχρονες υβριδικές μεθόδους που εφαρμόζονται[22].



Σχήμα 7. Παρουσιάζεται η εφαρμογή των επιμέρους μεθόδων οπτικής παρατήρησης ανάλογα με το μέγεθος του αντικειμένου [<http://www.structuralbiology.eu>].

Σύμφωνα με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων (Protein Data Bank, PDB) [<http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>] έως την 24<sup>η</sup> Σεπτεμβρίου 2013 έχουν προσδιορισθεί 87138 δομές πρωτεϊνών από τις οποίες οι :

- 77603 έχουν προσδιορισθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X
- 8861 έχουν προσδιορισθεί με NMR
- 471 έχουν προσδιορισθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία
- 52 έχουν προσδιορισθεί με υβριδικές μεθόδους και
- 151 με άλλες μεθόδους.

Από τα παραπάνω στοιχεία διαφαίνεται ότι η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της τριδιάστατης δομής. Επιπλέον, μέσω αυτής επιτυγχάνεται η βέλτιστη ευκρίνεια πρωτεϊνικών δομών [14]. Παρά τις διαφωνίες που παρατηρήθηκαν στην επιστημονική κοινότητα για την αξιοπιστία της μεθόδου, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αποδεκτό ότι η

κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ έχει συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο αλληλεπιδρούν τα μόρια με τα κέντρα δράσης τους [13].

Ειδικότερα, η μέθοδος αφορά στη μελέτη του κρυσταλλικού πλέγματος με έκθεση του κρυστάλλου σε δέσμη ακτίνων-Χ. Η πειραματική αυτή τεχνική εκμεταλλεύεται τη διευθέτηση και τη συμμετρία που φέρουν τα μόρια της πρωτεΐνης στο κρυσταλλικό πλέγμα.

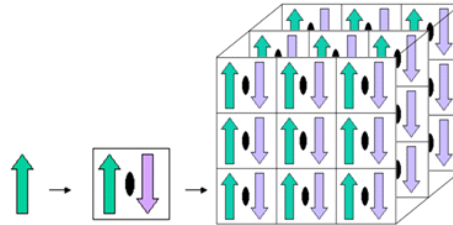
### **2.3 Κρυστάλλωση πρωτεϊνικού στόχου.**

Η γνώση της τριδιάστατης δομής μακρομορίων αποκαλύπτει σημαντικές πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης αυτών. Ωστόσο, τα στάδια προετοιμασίας του δείγματος προς κρυστάλλωση είναι εξαιρετικά χρονοβόρα και κοστοβόρα με αποτέλεσμα το πλήθος των δομών που κατατίθενται στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων να είναι εξαιρετικά μικρό αναλογικά με τον αριθμό των στόχων που μελετώνται. Η ανάγκη που προέκυψε για τον προσδιορισμό περισσότερων κρυσταλλικών πρωτεϊνικών δομών, ιδιαίτερα αυτών που αφορούν στη θεραπεία/αντιμετώπιση ασθενειών, αναπτύχθηκαν μέθοδοι υψηλής ρυθμαπόδοσης τόσο στο επίπεδο έκφρασης και καθαρισμού πρωτεϊνών, όσο και στο στάδιο της κρυστάλλωσης αυτών. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι σήμερα χρησιμοποιούνται 4<sup>ης</sup> γενιάς ρομπότ κρυστάλλωσης τα οποία διαχειρίζονται όγκους της τάξης των λίγων nL.

Το στάδιο της κρυστάλλωσης πρωτεϊνών είναι κομβικό για τον προσδιορισμό της τριδιάστατης δομής με χρήση ακτίνων-Χ. Οι δε κρύσταλλοι είναι απαραίτητοι αφού ένα μόνο μόριο περιθλά πολύ ασθενώς την ακτινοβολία και η περιοδική επανάληψη του ιδίου μορίου σε διατεταγμένη μορφή ενισχύει το σήμα που προκύπτει από την περίθλαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και γίνεται δυνατή η καταγραφή του [19].

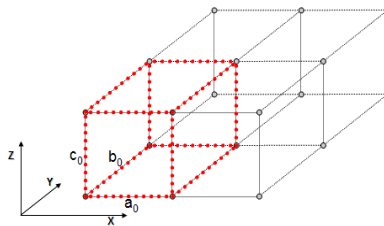
Οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι είναι ιδιαίτερα εύθραστοι και ευαίσθητοι σε όλα τα είδη των περιβαλλοντικών μεταβολών. Συγκεκριμένα περιέχουν, κατά μέσο όρο 50 % διαλυτή ο οποίος πληροί το χώρο μεταξύ των διατεταγμένων μορίων εντός της στοιχειώδους κυψελίδας του κρυστάλλου. Οι αλληλεπιδράσεις οι οποίες συγκρατούν τα μόρια πρωτεΐνης είναι συνήθως ασθενείς όπως δεσμοί υδρογόνου, γέφυρες άλατος και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις σε σύγκριση με τις ισχυρές ομοιοπολικές ή ιοντικές αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται σε κρύσταλλους ορυκτών.

Η μοναδιαία κυψελίδα αποτελεί την δομική μονάδα του κρυστάλλου και μπορεί να αποτελείται από έναν πεπερασμένο αριθμό ασύμμετρων μονάδων ανάλογα με το τι ορίζει η ομάδα χώρου συμμετρίας που ανήκει το κρυσταλλικό πλέγμα. Έχουν ταυτοποιηθεί 230 ομάδες χώρου συμμετρίας [16]



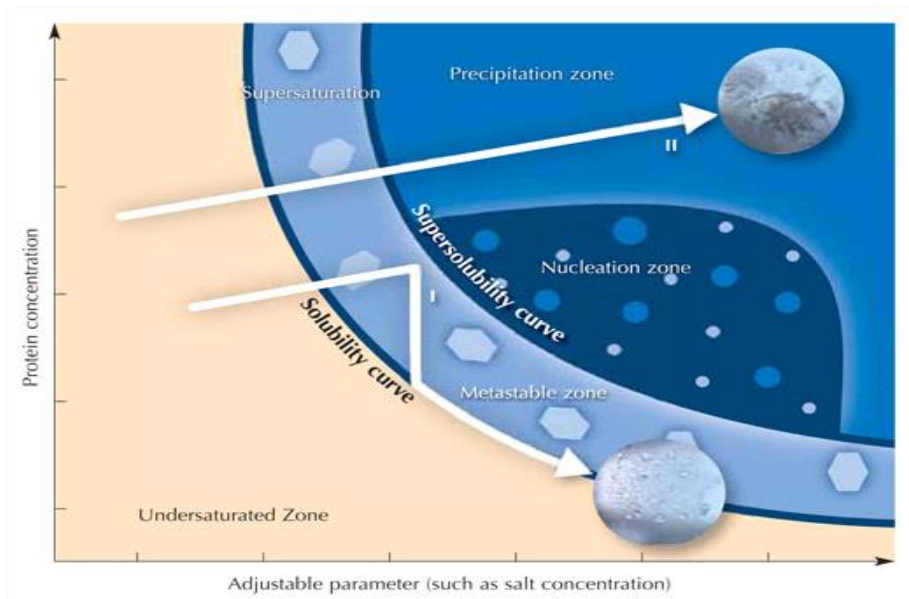
Ασύμ. Μονάδα Μον. Κυψελίδα Κρύσταλλος

**Σχήμα 8. Μοναδιαία κυψελίδα.**



**Σχήμα 9. Σχηματισμός κρυστάλλου**

Η διαδικασία της κρυστάλλωσης περιγράφεται από το διάγραμμα φάσεων (σχήμα 7) όπου παρουσιάζεται η σχέση που διέπει τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών μορίων ως προς τη συγκέντρωση του παράγοντα καθίζησης [29].



**Σχήμα 10. Διάγραμμα φάσεων πρωτεϊνικών μακρομοριακών δομών.**

Συγκεκριμένα, η περιοχή που αφορά στη συγκέντρωση διαχωρίζεται μέσω της καμπύλης διαλυτότητας σε δύο ζώνες, την ακόρεστη και την υπέρκορη ζώνη. Κάθε σημείο που βρίσκεται πάνω στην καμπύλη διαλυτότητας αντιστοιχεί στην συγκέντρωση της πρωτεΐνης για την οποία η πρωτεΐνη βρίσκεται σε ισορροπία με τον παράγοντα καθίζησης [17].

Ένα διάγραμμα φάσης παρέχει πληροφορίες σχετικά με τους πυρήνες κρυστάλλωσης και τις συνθήκες ανάπτυξης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης και των θερμοδυναμικών παραμέτρων όπως η θερμοκρασία, το pH ή η συγκέντρωση καθίζησης. Το διάγραμμα φάσης που αποτυπώνει τη διαδικασία κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης, χωρίζεται σε δύο περιοχές: α) την ακόρεστη περιοχή όπου η πρωτεΐνη βρίσκεται σε διαλυτή μορφή και β) την υπέρκορη περιοχή η οποία χωρίζεται σε τρεις ζώνες ( μετασταθή ζώνη, ζώνη πυρήνωσης και ζώνη σχηματισμού ιζήματος).

Το όριο διαλυτότητας διαχωρίζει την υπέρκορη περιοχή από τη μετασταθή ζώνη. Στην υπέρκορη περιοχή οι κρύσταλλοι που δημιουργούνται δεν είναι σταθεροί και μπορούν εύκολα να διαλυθούν ενώ στη μετασταθή ζώνη, το διάλυμα είναι υπέρκορο και οι κρύσταλλοι μπορούν να αναπτυχθούν. Το όριο υπερκορεσμού διαχωρίζει την μετασταθή ζώνη από την ασταθή ζώνη όπου το επίπεδο υπερκορεσμού της

πρωτεΐνης είναι τόσο υψηλό όσο χρειάζεται έτσι ώστε να προκαλέσει την έναρξη της πυρήνωσης, δηλαδή τον σχηματισμό των νέων κρυστάλλων.

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>].

Οι βέλτιστες συνθήκες για το σχηματισμό καλής ποιότητας κρυστάλλων, ξεκινούν με τη δημιουργία ενός πυρήνα κρυστάλλωσης στην ασταθή περιοχή (ή ζώνη πυρήνωσης) πάνω από τη μετασταθή κατάσταση. Καθώς οι κρύσταλλοι αναπτύσσονται, το διάλυμα επανέρχεται στη μετασταθή κατάσταση και η πυρήνωση σταματά. Οι υπάρχοντες πυρήνες θα αναπτυχθούν περαιτέρω με πιο αργούς ρυθμούς μέχρι να φτάσει το σύστημα σε ισορροπία. Στη μετασταθή κατάσταση, η πυρήνωση δε θα ξεκινήσει αν δεν αλλάξει η μηχανική του συστήματος, π.χ. με την εισαγωγή κάποιου μικροκρυστάλλου που θα αποτελέσει τον “πυρήνα” για την κρυστάλλωση (σπορά, seeding).

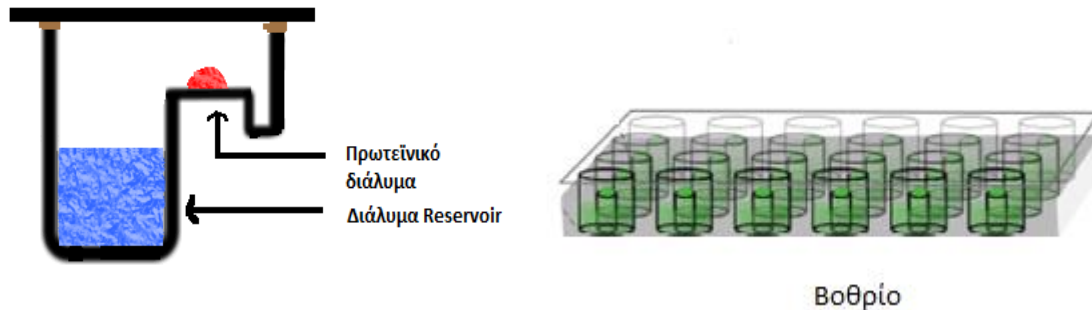
Στη ζώνη πυρήνωσης, τα πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται σε κρυσταλλική μορφή είναι σε περίσσεια, ενώ στη ζώνη σχηματισμού ιζήματος τα πρωτεϊνικά μόρια σε περίσσεια διαχωρίζονται από το διάλυμα αμέσως με τη μορφή άμορφου ιζήματος [21].

Οι μέθοδοι κρυστάλλωσης περιλαμβάνουν:

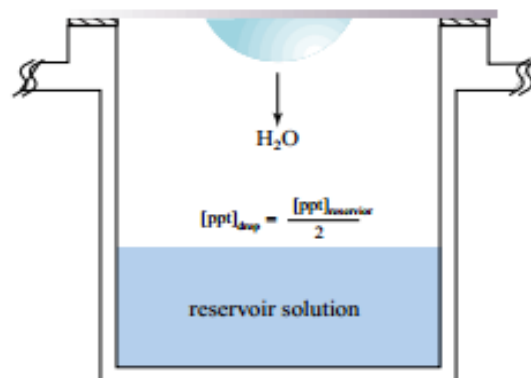
- την batch μέθοδο,
- τη μέθοδο διάχυσης ατμών (vapour diffusion method) και
- τη μέθοδο διαπίδωσης (dialysis method)

Στη συνέχεια αναλύεται η μέθοδος διάχυσης ατμών για την οποία χρησιμοποιείται είτε η καθήμενη (sitting drop) είτε η κρεμάμενη σταγόνα (hanging drop) με χρήση μικροπλακών χωρητικότητας 24 ή 96 βοθρίων (wells). Η πρωτεΐνη με τη μορφή σταγόνας βρίσκεται σε διάλυμα παρουσία των υπολοίπων συστατικών κρυστάλλωσης και εκτίθεται σε αντίστοιχο διάλυμα υψηλότερης όμως συγκέντρωσης στα επί μέρους συστατικά (Reservoir) του το οποίο τοποθετείται στα wells (σχήμα 11.1 και 11.2). Ατμοί μορίων ύδατος διαχέονται στο διάλυμα που βρίσκεται στο well με αποτέλεσμα τη συμπύκνωση της σταγόνας και την αύξηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε αυτή. Η διάχυση των ατμών θα συνεχισθεί έως ότου επιτευχθεί ισορροπία. Στο στάδιο αυτό

εάν ο συνδυασμός των συστατικών που επιλέχθηκε είναι ο κατάλληλος θα σχηματιστεί κρύσταλλος.



Σχήμα 11.1 Μέθοδος καθήμενης σταγόνας  
[\[http://hamptonresearch.com/documents/growth\\_101/3.pdf\]](http://hamptonresearch.com/documents/growth_101/3.pdf)



Σχήμα 11.2 Μέθοδος κρεμάμενης σταγόνας [32].

## 2.4 Προσδιορισμός δομής συμπλόκων ενώσεων με πρωτεΐνη στόχο με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.

### Βήμα 1: Ακτινοβολήση κρυστάλλου

Κατά την έκθεση του κρυστάλλου σε δέσμη ακτίνων-Χ, τα άτομα αυτού περιθλούν την ακτινοβολία, η οποία στη συνέχεια καταγράφεται σε ανιχνευτή με τη μορφή περιθλασιγράμματος. Η θέση της κάθε κηλίδας που αποτυπώνεται στο διάγραμμα περίθλασης περιγράφεται από τρεις δείκτες, δείκτες Miller (h,k,l) και αντιπροσωπεύει το άθροισμα της σκέδασης των ακτίνων Χ από τα άτομα του κρυστάλλου που βρίσκονται σε περιοδικές θέσεις.



## Βήμα 2: Ταυτοποίηση της δομής

Η θέση του κάθε ατόμου στον κρύσταλλο μπορεί να προσδιορισθεί μέσω μετασχηματισμού Fourier ο οποίος συνδέει το εσωτερικό επίπεδο συμμετρίας όπως αυτό ορίζεται από τους δείκτες Miller (h,k,l) με την πραγματική θέση των ατόμων στο χώρο (x, y, z).

Συγκεκριμένα η εξίσωση που συνδέει τα (h,k,l) με τα (x, y, z) είναι η εξής:

$$f(x, y, z) = \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Ο δομικός παράγοντας μιας συγκεκριμένης περίθλασης  $F_{hkl}$  εκφράζεται ως συνάρτηση του πλάτους του δομικού παράγοντα και της φάσης του κύματος της μονοχρωματικής ακτινοβολίας,  $\alpha$ , από τη σχέση:

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j) = F(hkl) \exp i\alpha(hkl)$$

Για τον υπολογισμό της ηλεκτρονιακής πυκνότητας χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} \sum_{l=-\infty}^{\infty} F(hkl) \exp - 2\pi i(hx + ky + lz)$$

Τα πειράματα περίθλασης ακτίνων-X μπορούν να δώσουν πληροφορίες μόνο για την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας, που είναι ανάλογη του τετραγώνου του πλάτους του παράγοντα δομής ( $I_{hkl} \sim |F_{hkl}|^2$ ) ενώ δεν μπορούν να δώσουν καμία πληροφορία για την φάση,  $\phi_{hkl}$ , του παράγοντα δομής.

Το προαναφερθέν ονομάζεται “πρόβλημα φάσης της κρυσταλλογραφίας” και αντιμετωπίζεται με μεθόδους όπως η ισόμορφη μοριακή αντικατάσταση, μέσω ανώμαλης σκέδασης η οποία προκύπτει από την παρουσία βαρέων μετάλλων ως συμπλόκων με την πρωτεΐνη στον κρύσταλλο που ακτινοβολείται με μονοχρωματική

ακτινοβολία (SAD, single wavelength anomalous diffraction). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, αρχικώς προσδιορίζεται η θέση των βαρέων μετάλλων (Hg, Pt, Zn, κ.ά.) και μέσω αυτής, η θέση των αντίστοιχων αμινοξέων στα οποία συνδέονται [<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S1744309110052607>].

Στην περίπτωση όπου η τριδιάστατη δομή του μακρομοριακού στόχου είναι γνωστή, ο προσδιορισμός της δομής γίνεται με τη μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης χρησιμοποιώντας τη φυσική πρωτεΐνη ως αρχικό μοντέλο. Αντίστοιχη είναι η διαδικασία που ακολουθείται στην περίπτωση όπου η πρωτεΐνη που μελετάται παρουσιάζει αμινοξική ή δομική ομολογία > 30% με άλλη πρωτεΐνη με ήδη γνωστή δομή [36].

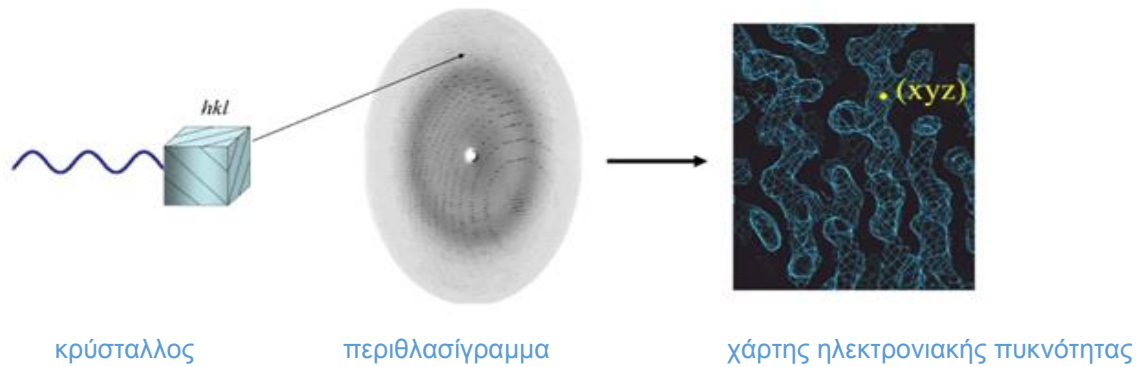
### *Βήμα 3: Μελέτη του στόχου ως συμπλόκου με βιοδραστικά μόρια*

Αφού προσδιορισθεί η τριδιάστατη δομή του πρωτεϊνικού στόχου αρχίζει η μελέτη των διακριτών θέσεων σύνδεσης του μακρομορίου με στόχο να σχεδιαστούν μικρομοριακές ενώσεις οι οποίες μπορούν να λειτουργήσουν ως ενεργοποιητές, αναστολείς ή τροποποιητές της δράσης ενός ενζύμου ή πρωτεΐνης, αντίστοιχα. Η αξιολόγηση του τρόπου σύνδεσης ενός προσδέτη σε έναν υποδοχέα, πραγματοποιείται μέσω μιας σειράς πειραματικών διαδικασιών όπως μετρήσεων φθορισμού, επισήμανσης ατόμων με ραδιενεργές ενώσεις ή μέσω κινητικών πειραμάτων. Η πιο συνηθισμένη προσέγγιση στην περίπτωση των ενζύμων είναι η βιοχημική αποτίμηση των παραμέτρων  $IC_{50}$  και  $K_i$ , οι οποίες προσδιορίζονται παρουσία ενός εύρους διαφορετικών συγκεντρώσεων της ένωσης [5].

Υπολογίζονται χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, ελέγχεται η σύνδεση ή μη του προσδέτη στο εκάστοτε κέντρο σύνδεσης. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας ( $2F_{\text{observed}} - F_{\text{calculated}}$ ) ο οποίος προσδιορίζεται με βάση τις φάσεις του αρχικού μοντέλου [<http://www.k-state.edu/bmb/labs/jc/teaching/bioch590/bioch590-7-Xray.pdf>].

Το επόμενο βήμα της έρευνας περιλαμβάνει την ανάλυση της κρυσταλλικής δομής με την βοήθεια ειδικού λογισμικού και την ανάκτηση πληροφοριών σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις της μελετώμενης ένωσης με τα αμινοξέα από τα οποία απαρτίζεται

το κέντρο σύνδεσης. Συγκεκριμένα αποτυπώνονται οι δεσμοί υδρογόνου και οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει ο προσδέτης με το περιβάλλον του, δηλαδή, με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης, καθώς και με τα μόρια του ύδατος που βρίσκονται στο κέντρο σύνδεσης. Στο σχήμα 12 παρουσιάζονται συνοπτικά τα βήματα από την ακτινοβόληση του κρυστάλλου με ακτίνες X στον προσδιορισμό της ηλεκτρονιακής πυκνότητας.



**Σχήμα 12. Συνοπτική διαδικασία ακτινοβόλησης κρυστάλλου με ακτίνες-X.**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

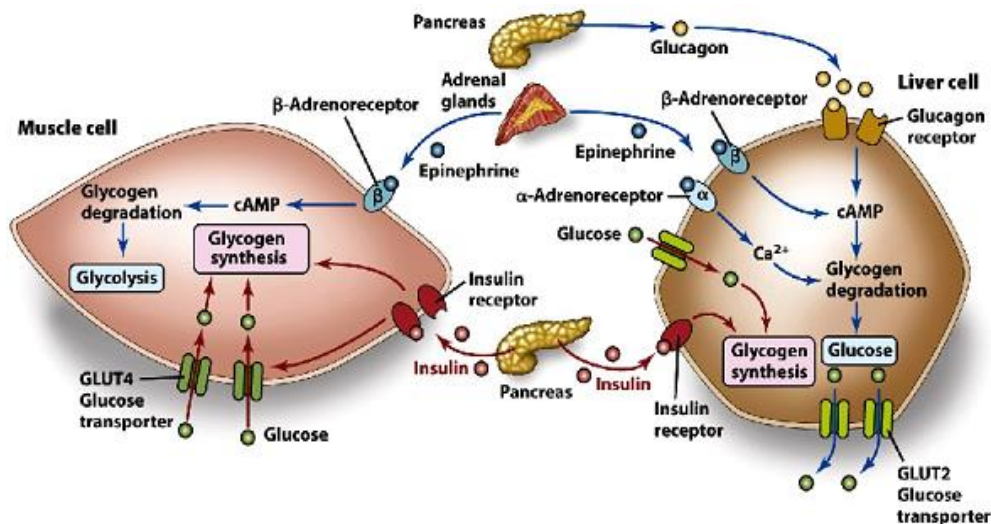
### ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

#### 3.1 Σακχαρώδης διαβήτης.

Το 1962 σε έναν τάφο ευγενών στο Λούξορ της Αιγύπτου ανακαλύπτεται η πρώτη αναφορά στο διαβήτη που χρονολογείται το 1550π.Χ. Ο ξακουστός ιατρός Αρεταίος ο Καππαδόκης (120-200 π. Χ.), η τρίτη μεγαλύτερη ιατρική προσωπικότητα της αρχαιότητας μετά τον Ιπποκράτη και τον Γαληνό, έδωσε την ονομασία «διαβήτης» από το ρήμα «διαβαίνω» εξαιτίας του ότι το νερό που έπινε ο άρρωστος διάβαινε (πέρναγε) αναλλοίωτο στα ούρα. Πριν την ονομασία αυτή λέγονταν «δίψακο» από το όνομα φιδιού που όταν δαγκώνει προκαλεί ακατάσχετη δίψα και πίστευαν ότι ήταν και το αίτιο της νόσου. Ταυτόχρονα στην Κίνα ο διαβήτης ήταν γνωστός ως η νόσος της δίψας ενώ στην Ινδία ως «νόσος με μελώδη ούρα». Ο δε άραβας γιατρός Auicenna (Αβικένα 980-1037 μ.Χ.) περιέγραψε πρώτος τη διαβητική γάγγραινα στο πόδι [38].

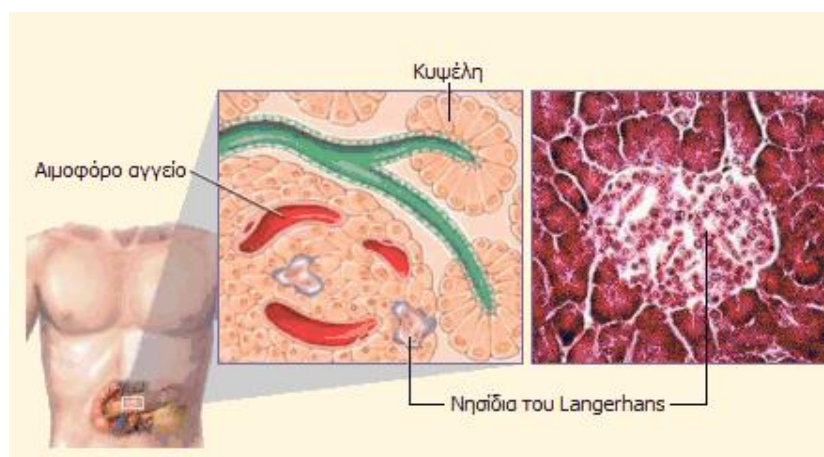
Η μεταβολική αυτή διαταραχή προκαλείται από την αδυναμία του οργανισμού να ρυθμίσει τα επίπεδα της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος. Συγκεκριμένα χαρακτηρίζεται ως διαταραχή του μεταβολισμού της ινσουλίνης στον οργανισμό, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της μεταγευματικής γλυκόζης ή της γλυκόζης σε περίοδο νηστείας.

Η ινσουλίνη είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται στο πάγκρεας από τις νησίδες του Langerhans και συγκεκριμένα από τα β-παγκρεατικά κύτταρα, απ' όπου διαχέεται στο αίμα. Όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι υψηλά, (άνω των 140mg/dl), τα β-κύτταρα διεγείρονται και αρχίζει η παραγωγή της ινσουλίνης λόγω της ομοίωσης της γλυκόζης [<http://diabetology.gr/medical-history/-diabetes-history>].



Σχήμα 13. Μεταβολική οδός παραγωγής-σύνθεσης γλυκόζης στον οργανισμό [25].

Η ινσουλίνη επίσης, βοηθά στην απορρόφηση της γλυκόζης από τους διαφορετικούς τύπους κυττάρων στον οργανισμό (μυϊκά, ηπατικά, νευρικά, ερυθρά αιμοσφαίρια, λιπώδης ιστός), ενώ απουσία αυτής, ο οργανισμός λιμοκτονεί, παρόλη την πρόσληψη της τροφής [24,26].



Σχήμα 14. Η νησίδα του Langerhans [42].

Σύμφωνα με στοιχεία του 2013 πάνω από 382.000.000 άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από ζαχαρώδη διαβήτη εκ των οποίων το 46 % έχει διαγνωσθεί [http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem\_insulin.htm,66].

Το 80-90% των περιπτώσεων αυτών αφορά στον μή ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη ή διαβήτη τύπου 2, ενώ οι υπόλοιπες περιπτώσεις αφορούν στους : σακχαρώδη διαβήτη

τύπου 1 (εξαρτώμενο από την ινσουλίνη) και τον διαβήτη της κύησης ο οποίος συνήθως υποχωρεί μετά τον τοκετό [57-58].

Ο Διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης και ελαττωμένης ευαισθησίας των κυττάρων στη δράση της (φαινόμενο που ονομάζεται ινσουλινοαντοχή) με αποτέλεσμα τη συσσώρευση της γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία). Η χρόνια υπεργλυκαιμία έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με διάφορες παθήσεις όπως νεφροπάθειες, νευροπάθειες, αυξημένη πηκτικότητα του αίματος και ισχαιμία [<http://www.idf.org/diabetesatlas/content/foreword-0>].

Επίσης, έρευνες έχουν δείξει πως παράγοντες όπως τα λιπίδια, ιδιαίτερα κορεσμένα λιπαρά οξέα, μπορεί να διαταράσσουν τη λειτουργία των β-κυττάρων τροποποιώντας την ενδοκυτταρική σηματοδότηση ασβεστίου καθώς και να προκαλέσουν την παραγωγή κεραμιδίου, το οποίο προκαλεί απόπτωση των β-παγκρεατικών κυττάρων [45].

### **3.2 Φαρμακευτική αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2.**

Έχουν προηγηθεί πολλά χρόνια έρευνας προκειμένου να ανακαλυφθούν φάρμακα αντιμετώπισης της νόσου του διαβήτη. Η έρευνα αυτή οδήγησε σε κατηγορίες φαρμάκων οι οποίες βοήθησαν τους ανθρώπους που πάσχουν από διαβήτη να ρυθμίζουν μόνοι τους τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα τους.

Στα άτομα που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 χορηγούνται συχνά φάρμακα που περιλαμβάνουν ινσουλίνη, η οποία βοηθά στον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης του αίματος. Τα περισσότερα από αυτά τα φάρμακα διατίθενται υπό μορφή δισκίων, αλλά ορισμένα χορηγούνται με ένεση. Αυτά τα χάπια ή ενέσεις προορίζονται για χρήση σε συνδυασμό με υγιεινή διατροφή και τακτική σωματική άσκηση και όχι ως υποκατάστατο αυτών. Σήμερα υπάρχουν έντεκα κατηγορίες χαπιών που χρησιμοποιούνται για τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης του αίματος και δύο κατηγορίες ενέσιμων σκευασμάτων. Τα χάπια είναι γνωστά ως διγουανίδες (biguanides), σουλφονουλουρίες, θειαζολιδινεδιόνες (γλιταζόνες), μεγλιτινίδες, αναστολείς της γλυκοσιδάσης άλφα (ακαρβόζη) και αναστολείς της διπέπτυλο πεπτιδάσης-4 (DPP-4). Οι δύο κατηγορίες φαρμάκων που χορηγούνται με ένεση είναι μιμητικά ινκρετίνης και ινσουλίνης [46].

Παρόλη την ύπαρξη όλων αυτών των κατηγοριών αντιδιαβητικών φαρμάκων, στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής το 2011 ο διαβήτης αποτέλεσε αιτία τύφλωσης, νεφρικής ανεπάρκειας και ακρωτηριασμών των κάτω άκρων [<http://www.idf.org/diabetesatlas/content/foreword-0>].

Τα παραπάνω αποτελέσματα οφείλονται στο γεγονός, ότι τα φάρμακα που συνταγογραφούνται για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 έχουν παρενέργειες. Οι πιο συνηθισμένες περιλαμβάνουν αύξηση βάρους, ναυτία και εξανθήματα. Παραδείγματα πιο σοβαρών παρενεργειών είναι καρδιαγγειακά νοσήματα, ηπατικές βλάβες ή χαμηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα, η καλούμενη υπογλυκαιμία η οποία αποτελεί την κυριότερη παρενέργεια των φαρμάκων αυτών [48-<http://www.everydayhealth.com/type-2-diabetes/type-2-diabetes-drugs-sideeffects.aspx>].

Συγκεκριμένα η υπογλυκαιμία αποτελεί την κύρια παρενέργεια παροχής ινσουλίνης σε διαβητικούς. Η παρεχόμενη ινσουλίνη, της οποίας η αμινοξική ακολουθία παρουσιάζει αρκετές διαφορές ως προς την ανθρώπινη, απορροφάται δύσκολα από τα κύτταρα του παγκρέατος με αποτέλεσμα να μη ρυθμίζει με το σωστό τρόπο τη συγκέντρωση του γλυκόζης στο αίμα. Ταυτόχρονα, τα επιθηλιακά κύτταρα του ήπατος, η επιφάνεια των οποίων είναι διάτρητη, φέρουν κοιλότητες τέτοιου μεγέθους που επιτρέπουν την αυξημένη έκθεση τους στην ινσουλίνη. Αποτέλεσμα αυτού είναι η πρόκληση υπογλυκαιμίας, η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω επιπλοκές όπως συμπτώματα επιληπτικής κρίσης και κώμα [30,32].

Προκειμένου λοιπόν να αποφευχθούν οι παρενέργειες των υπαρχόντων φαρμάκων οι ερευνητές προσπαθούν να ανακαλύψουν εναλλακτικούς τρόπους ρύθμισης του μεταβολισμού της γλυκόζης, μελετώντας ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτόν σε ανθρώπους που πάσχουν από τον διαβήτη τύπου 2. Ενδεικτικά αναφέρεται το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου το οποίο αποτελεί έναν από τους μοριακούς στόχους για την αντιμετώπιση υπεργλυκαιμίας στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 [31,34].

### **3.3.Μεταβολισμός του γλυκογόνου.**

Η γλυκόζη είναι ένας απλός μονοσακχαρίτης και αποτελεί έναν από τους τρεις διατροφικούς μονοσακχαρίτες, μαζί με τη φρουκτόζη και τη γαλακτόζη, οι οποίοι περνούν άμεσα στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια της πέψης. Αποτελεί

τον σημαντικότερο υδατάνθρακα στη βιολογία αφού τα κύτταρα την χρησιμοποιούν ως την πρωταρχική πηγή ενέργειας και ως μέσο μεταβολισμού.

Η γνώση της χημικής δομής της γλυκόζης συνέβαλε σημαντικά στην γενική πρόοδο της οργανικής χημείας. Σε αυτό συνέβαλλαν οι έρευνες του Γερμανού χημικού Emil Fischer, ο οποίος έλαβε το 1902 το Νόμπελ Χημείας [54]. Οι ημερήσιες ανάγκες του εγκεφάλου σε γλυκόζη σε έναν ενήλικο άνθρωπο είναι 120 g περίπου, ποσότητα η οποία αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος των 160 g γλυκόζης που χρειάζεται ολόκληρο το σώμα.

Το γλυκογόνο αποτελεί την άμεσα κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Είναι ένα πολύ μεγάλο, διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει γλυκόζη όταν απαιτείται ενέργεια από τον ανθρώπινο οργανισμό. Ειδικότερα, το γλυκογόνο είναι ένα σημαντικό απόθεμα καυσίμων μορίων για τους παρακάτω λόγους:

- ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση της γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων καθιστώντας το ως ρυθμιστή της διατήρησης των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα,
- η γλυκόζη η οποία προέρχεται από το γλυκογόνο, κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μία καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα,
- σε αντίθεση με τα λιπαρά οξέα η γλυκόζη μπορεί να προμηθεύει ενέργεια απουσία οξυγόνου με αποτέλεσμα να τροφοδοτεί με ενέργεια αναερόβιες δραστηριότητες.

Το γλυκογόνο αποθηκεύεται κυρίως στους σκελετικούς μύες αλλά απαντάται και στο ήπαρ (η συγκέντρωση του γλυκογόνου αποτελεί το 10% και το 2%, του αντίστοιχου βάρους του ιστού στο οποίο αποθηκεύεται).

Στο ήπαρ η σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού, ενώ στους μύες οι διεργασίες αυτή ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών που αφορούν αποκλειστικά στους μύες [<http://diabetology.gr/medical-history/-diabetes-history>].



Συγκεκριμένα το ήπαρ διατηρεί την ομοιόσταση της γλυκόζης αίματος στα φυσιολογικά επίπεδα από την ταχεία εκκαθάριση της γλυκόζης από την πυλαία φλέβα στην απορροφητική κατάσταση μετά από ένα γεύμα και με ελεγχόμενη παραγωγή γλυκόζης στη μετα-απορροφητική κατάσταση σε επαρκή ρυθμό διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωσή της στο αίμα. Μετά από ένα γεύμα τρεις ρυθμιστικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στη μετάβαση, μέσω του ήπατος, από την καθαρή παραγόμενη γλυκόζη στην προς χρήση γλυκόζη.

Ο πρώτος, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως “αποτελεσματικότητα της γλυκόζης”, ενεργοποιείται από την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Συγκεκριμένα αντιπροσωπεύει μία σειρά επανατροφοδοτικών μηχανισμών ενεργοποίησης οι οποίοι προκλήθηκαν από την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης εντός των ηπατοκυττάρων η οποία βρίσκεται σε ισορροπία με την εξωκυτταρική συγκέντρωση μέσω της GLUT-2, ενός μεταφορέα υψηλής δραστηριότητας ο οποίος βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη των υπατοκυττάρων [35].

Ο δεύτερος, είναι ορμονικός μηχανισμός και καθορίζεται από την αύξηση της αναλογίας των επιπέδων ινσουλίνης προς γλυκαγόνη η οποία προκαλεί απενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ενεργοποίηση της συνθάσης γλυκογόνου και αύξηση της συγκέντρωσης της 2,6-διφωσφορικής φρουκτόζης με επακόλουθη αναστολή της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης και διέγερση της πρόσληψης γλυκόζης από το ήπαρ [<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%93%CE%BB%CF%85%CE%BA%CF%8C%CE%B6%CE%B7>].

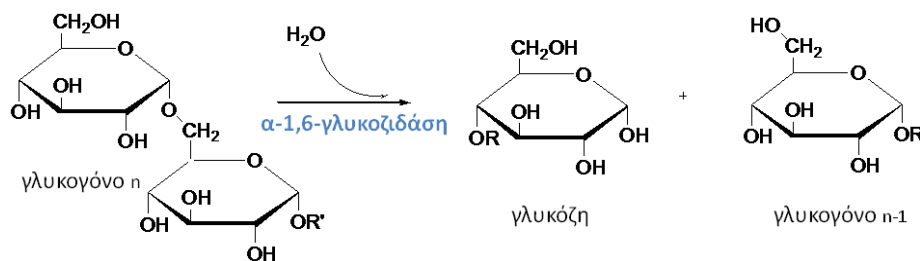
Ο τρίτος μηχανισμός περιγράφεται ως «το πυλαίον σήμα» (portal signal). Πιστεύεται ότι περιλαμβάνει έναν αισθητήρα γλυκόζης στην πυλαία φλέβα που ρυθμίζει τη σηματοδότηση του πνευμονογαστρικού προσαγωγού, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε μεταβολή του συμπαθητικού και παρασυμπαθητικού ελέγχου του μεταβολισμού της ηπατικής γλυκόζης.

Ο ρόλος του μεταβολισμού του γλυκογόνου στην ομοιόσταση της γλυκόζης στον οργανισμό είναι καθοριστικός και η ρύθμιση αυτού ελέγχεται με αυστηρούς μηχανισμούς μέσω [[www.diabetes.org](http://www.diabetes.org)]:

- ορμονικών και νευρικών σημάτων

- διαδοχικών φωσφορυλιώσεων/ αποφωσφορυλιώσεων
- αλλοστερικών τροποποιητών και
- άλλων μορίων

Όταν ο οργανισμός εξαντλήσει το γλυκογόνο του ήπατος, η γλυκόζη συντίθεται είτε από γαλακτικό οξύ, ή από γλυκερόλη ή τέλος διασπώντας τα αμινοξέα των μυών, και κυρίως την αλανίνη (μέσω της μετατροπής της σε πυροσταφυλικό οξύ). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται γλυκονεογένεση και μαζί με τη γλυκογονόλυση συνιστούν την ενδογενή παραγωγή γλυκόζης. Η διαδικασία της γλυκογονόλυσης προκειμένου να παραχθεί γλυκόζη καταλύεται από το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) και τα ένζυμα αποδιακλάδωσης μεταφοράση και γλυκοζιδάση α-1,6 . (Σχήμα 15)

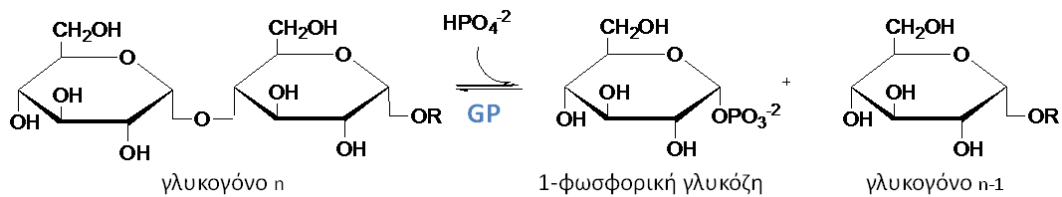


**Σχήμα 15. Διάσπαση του α-1,6 γλυκοζιτικού δεσμού στο γλυκογόνο**

Επίσης μαζί με τα ανωτέρω ένζυμα σημαντικό ρόλο παίζει το ένζυμο φωσφογλυκομουτάση η οποία μετατρέπει την 1-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη μέρος της οποίας μετατρέπεται σε γλυκόζη στο ήπαρ [38].

### 3.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την φωσφορυλιτική διάσπαση του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη, το πρώτο βήμα στην παραγωγή μεταβολικής ενέργειας.



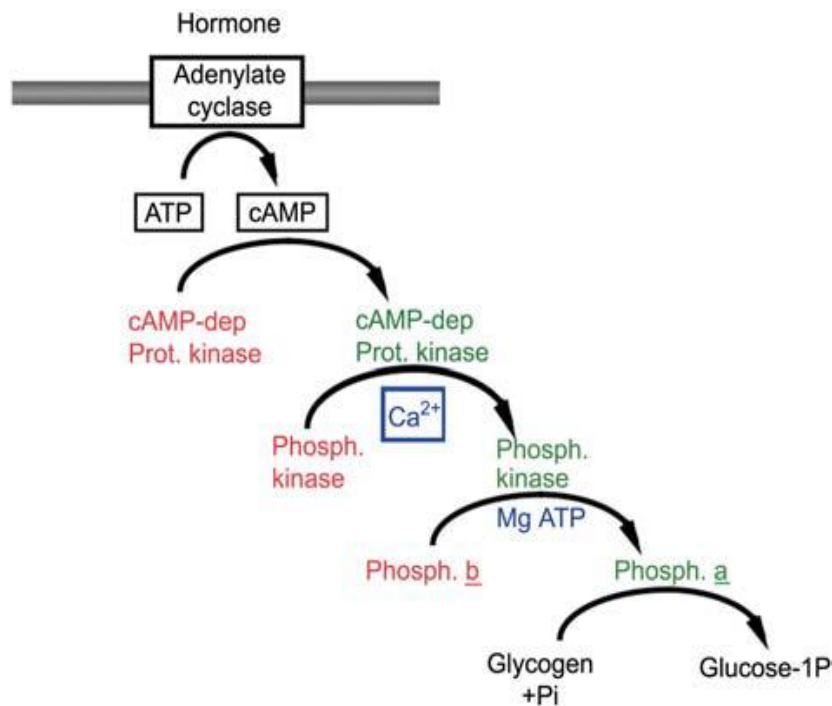
**Σχήμα 16. Αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη.**

Το ένζυμο βρίσκεται στο διάλυμα ως διμερές (μοριακό βάρος κάθε υπομονάδας 97,440 kDa ) και χαρακτηρίζεται ως ένα ρυθμιστικό ένζυμο το οποίο εκφράζει αυτήν την ιδιότητά του τόσο μέσω αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης και μέσω αλλοστερικών αλληλεπιδράσεων. Η δε μυική φωσφορυλάση είναι ικανή να ανταποκριθεί σε διάφορα σήματα που σχετίζονται με πρόσδεση υποκαταστατών στις έξι διακριτές θέσεις σύνδεσης [37,39].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου εκφράζεται από τρία διαφορετικά γονίδια σε τρεις διαφορετικούς ιστούς στο ανθρώπινο σώμα, του ήπατος των μυών και του εγκεφάλου. Το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου καταλύει την ίδια αντίδραση και στις τρεις ισομορφές. Το ισoenζυμο το οποίο υπάρχει στους μύες αποτελεί επικυρωμένο μοριακό στόχο (validated molecular target) για την ανάπτυξη μεθόδων όπως ο κατευθυνόμενος-από τη δομή-σχεδιασμός φαρμάκων (SBDD) για την ταυτοποίηση νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων [5].

Οι τρεις ισομορφές έχουν 80 % ομολογία στην αμινοξική τους ακολουθία συνολικά, ενώ τα 15 από τα 16 αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με τη γλυκόζη στο καταλυτικό κέντρο είναι ίδια και στις δύο τουλάχιστον ισομορφές της όπου η τρισδιάστατη δομή τους είναι γνωστή, τόσο στον άνθρωπο όσο και σε άλλους οργανισμούς [<http://diabetology.gr/medical-history/-diabetes-history>].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP $\alpha$ ) υπάρχει σε δύο λειτουργικές αλληλομετατρέπόμενες μορφές, που βρίσκονται σε ισορροπία απουσία οποιουδήποτε τροποποιητή, τη φωσφορυλιωμένη (GP $\alpha$ ) και τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή (GP $\beta$ ). Επίσης υφίσταται σε τουλάχιστον δύο διαμορφώσεις, τη λιγότερο ενεργή T διαμόρφωση (Tense state), και την ενεργή R διαμόρφωση (Relaxed state). Η ενεργή διαμόρφωση σταθεροποιείται από την φωσφορυλίωση του καταλοίπου της Ser14 και η ανενεργός διαμόρφωση σταθεροποιείται από την αποφωσφορυλίωση, την γλυκόζη και ετεροκυκλικές ενώσεις όπως η καφεΐνη [40].

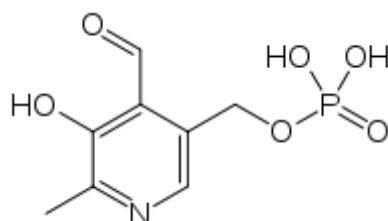


**Σχήμα 17. Ορμονικός έλεγχος γλυκογονόλυσης και καταρράκτης ενεργοποίησης της φωσφορυλάσης από το cAMP.**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στα δύο κατάλοιπα Ser<sup>14</sup> του κάθε μονομερούς κοντά στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή η περιοχή αυτή αλληλεπιδρά με θετικά φορτισμένες ομάδες αμινοξέων και είναι αρκετά εύκαμπτη ώστε να διευκολύνει τη σύνδεση με το καταλυτικό κέντρο της κινάσης της φωσφορυλάσης. Κατά τη φωσφορυλίωση, η Ser14 μετακινείται ~34 Å. Στη νέα της θέση, αλληλεπιδρά με τρία αμινοξέα από την περιοχή σύνδεσης των επί μέρους υπομονάδων, την αργινίνη 69 (Arg69) της μίας υπομονάδας και δύο κατάλοιπα της άλλης, την Arg43 και την ιστοδίνη 36 (His36) [<http://diabetology.gr/medical-history/-diabetes-history>]. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις συνεργούν στη σταθεροποίηση της δομής στη διεπιφάνεια των συμμετρικών υπομονάδων, με αποτέλεσμα την περιστροφή της μίας υπομονάδας σε σχέση με την άλλη, κατά 10° γύρω από τον άξονά της, όπου αυτό προκαλεί περαιτέρω αλλαγές στη διεπιφάνεια των υπομονάδων από την άλλη πλευρά του μορίου. Στην *T* διαμόρφωση οι δύο έλικες διευθετούνται κατά τέτοιο τρόπο φθάνοντας μέχρι το βρόχο 280 (280's loop, αμινοξέα 282-287) κοντά στα αμινοξέα που βρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο.

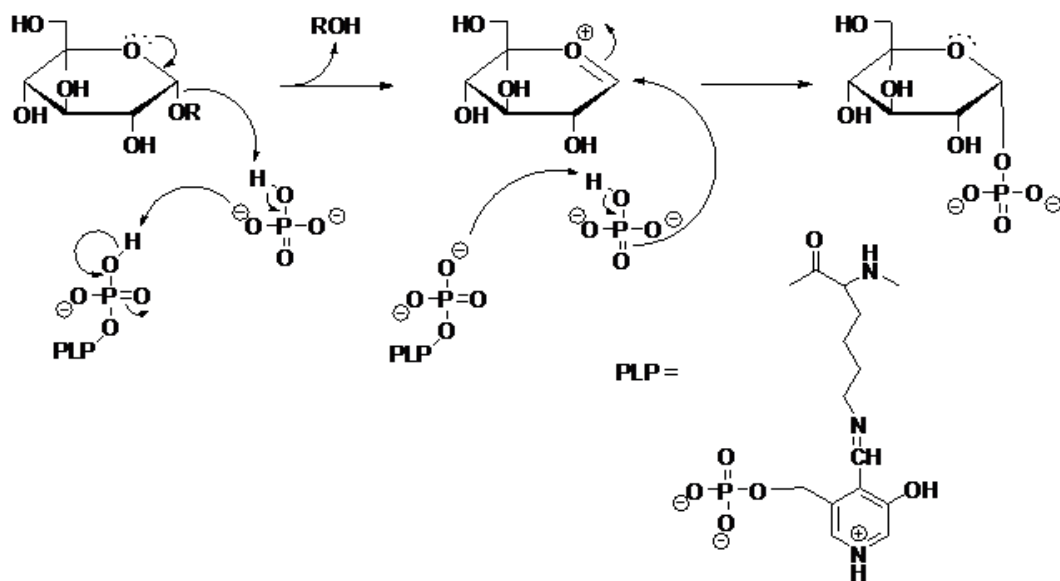
Τα αμινοξέα που αποτελούν αυτόν τον βρόχο φράσσουν την είσοδο του καταλυτικού κέντρου και παρεμποδίζουν την αποικοδόμηση του γλυκογόνου προς γλυκόζη. Κατά την μετάπτωση του ενζύμου από την *T* διαμόρφωση στην *R*, οι δύο έλικες απομακρύνονται και αλλάζουν διαμόρφωση στο χώρο επιτρέποντας την πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο [41].

Αρκετές μελέτες πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να αποδειχθεί ο μηχανισμός φωσφορολυτικής διάσπασης του γλυκογόνου. Η φωσφορική πυριδοξάλη (pyridoxal 5'-phosphate, PLP), ένα παράγωγο της πυριδοξίνης (B6) αποτελεί συμπ παράγοντα του ενζύμου στην αντίδραση που καταλύει για την διάσπαση του γλυκογόνου μέσω της βάσης Schiff που σχηματίζει η αλδεϋδική ομάδα της PLP, με τη Lys680 της φωσφορυλάσης, που επιφέρει αναδιατάξεις και περαιτέρω δομικές αλλαγές στην πρωτεΐνη [42].



Σχήμα 18.Φωσφορική πυριδοξάλη

Συγκεκριμένα ο μηχανισμός έχει ως εξής: Η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μία θέση μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό λειτουργώντας ως δότης πρωτονίων και στην συνέχεια ως δέκτης πρωτονίων. Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο, που είναι συνδεδεμένο στον άνθρακα 4 της αποχωρούσας ομάδας του γλυκογόνου και ταυτόχρονα αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP[27]. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν προσβάλλεται στην συνέχεια από το ορθοφωσφορικό προς σχηματισμό φωσφορικής γλυκόζης δεσμού α-1 με την επιστροφή ενός ατόμου υδρογόνου στην φωσφορική πυριδοξάλη [<http://diabetology.gr/medical-history/-diabetes-history/>].



Σχήμα 19 . Μηχανισμός δράσης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .

#### *Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού*

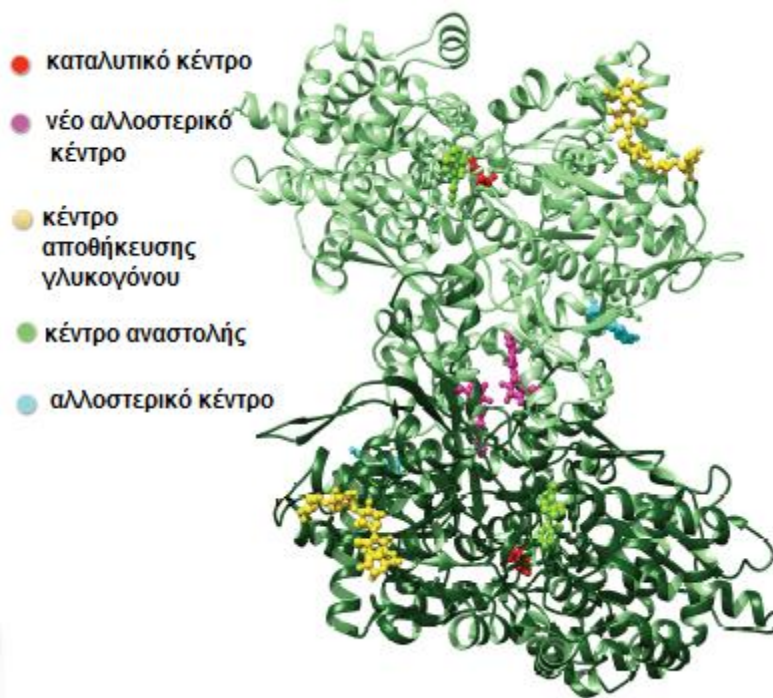
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού ανακαλύφθηκε το 1936 και κρυσταλλώθηκε για πρώτη φορά το 1942 από τους Green και Cori [43]. Η τρισδιάστατη δομή αυτής προσδιορίστηκε από τους Barford [50,43a] όπου και ταυτοποιήθηκαν διακριτά κέντρα σύνδεσης αυτής. Στη συνέχεια ακολούθησαν περαιτέρω μελέτες οι οποίες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει τουλάχιστον ένα ακόμα κέντρο σύνδεσης του ενζύμου, το νέο αλλοστερικό κέντρο [45-46] καθώς και ένα πιθανό κέντρο το κέντρο βενζιμιδαζολίου [44].

Το ένζυμο κρυσταλλώνεται ως μονομερές στο τετραγωνικό πλέγμα συμμετρίας και μιμείται το ηπατικό ισοένζυμο καθώς σχηματίζει διμερές με ένα εκ των συμμετρικών μονομερών στην μοναδιαία κυψελίδα. Σε κάθε υπομονάδα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου διακρίνεται μια αμινοτελική δομική περιοχή 484 καταλοίπων που περιέχει μία θέση πρόσδεσης γλυκογόνου και μια καρβόξυ-τελική δομική περιοχή 358 καταλοίπων. Λόγω της υψηλής της ομολογίας με το ηπατικό ένζυμο χρησιμοποιείται ευρέως για μελέτες έναντι του ηπατικού. Επίσης η παρασκευή του μυϊκού ενζύμου από σκελετικούς μυς κουνελιού αποδίδει μεγάλες ποσότητες ενζύμου ικανές για πλήθος κινητικών και κρυσταλλογραφικών μελετών.

### 3.5 Καταλυτικά κέντρα φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η μυική φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο 5 κέντρα σύνδεσης (Σχήμα 19).

- Το καταλυτικό
- Το κέντρο αναστολής
- Το αλλοστερικό κέντρο
- Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου και
- Το νέο αλλοστερικό κέντρο



Σχήμα 20. Σχηματική αναπαράσταση της τριδιάστατης δομής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού όπου διαφαίνονται τα δύο μονομερή του ενζύμου καθώς και τα διακριτά κέντρα σύνδεσης στα οποία προσδένονται δυνάμει αναστολείς.

Το **καταλυτικό κέντρο** είναι ένα μακρύ β-κανάλι αποτελούμενο από πολικά και μη πολικά αμινοξέα, το οποίο φιλοξενεί μόρια ύδατος. Συγκεκριμένα η περιοχή απαρτίζεται από δύο υπο-περιοχές τα α- και β- υπόκεντρα (α-, β- rocket). Η είσοδος

του καταλυτικού κέντρου στην T διαμόρφωση παρεμποδίζεται από τον ευκίνητο βρόχο 280s (280s loop) ο οποίος περιλαμβάνει τα αμινοξέα 282 έως 287 που σταθεροποιούνται σε μία κλειστή διαμόρφωση.

Η γλυκόζη αποτελεί φυσιολογικό αναστολέα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (με  $K_i$  1,7 mM για την  $\alpha$ -D-γλυκόζη) και χρησιμοποιήθηκε ως πρόδρομος ένωση για το σχεδιασμό παραγώγων γλυκόζης τα οποία θα παρέχουν υψηλή συγγένεια και ισχυρή αναστολή και στοχεύουν στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Η πλειοψηφία των αναστολέων οι οποίοι δείχνουν προτίμηση στο να συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου είναι τα  $\beta$ -D-γλυκοπυρανόζυλο ανάλογα τα οποία συνδέονται στο  $\beta$ -κανάλι του ενζύμου και σταθεροποιούν το βρόχο 280s με την υδρόφοβη περιοχή τους να εντοπίζεται στην περιοχή του  $\beta$ -rocket, σχηματίζοντας δεσμούς με τα αμινοξέα της καταλυτικής περιοχής. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα να σταθεροποιηθεί το ένζυμο στην T διαμόρφωση του εφόσον η loop 280s "φράσσει" την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως τα  $\beta$ -D-γλυκοπυρανόζυλο ανάλογα είναι ισχυρότεροι αναστολείς σε σύγκριση με τα  $\alpha$ -D-γλυκοπυρανόζυλο ανάλογα. Ο πρώτος υποκαταστάτης ο οποίος προσδέθηκε ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου σε σύγκριση με την  $\alpha$ -D-γλυκόζη ήταν η N-ακετυλο-γλυκοπυρανοζυλαμίνη. Μελετώντας την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου αποδείχθηκε πως αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις των περιφεριακών ομάδων υδροξυλίου του γλυκοπυρανοζιλικού δακτυλίου με κατάλοιπα καθώς επίσης και δεσμοί υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεις οι οποίες προάγουν ισχυρή πρόσδεση νέων υποκαταστατών [7]. Στις περισσότερες περιπτώσεις από αυτήν την οικογένεια ενώσεων, ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου της His377 και του αμιδικού αζώτου της ένωσης, διατηρείται.

Το **κέντρο αναστολής** αποτελείται από υδρόφοβα αμινοξέα του αμινοτελικού και του καρβοξυ-τελικού άκρου και βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου (απόσταση 12 Å). Στην T διαμόρφωση του ενζύμου το κέντρο αναστολής σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Phe285 και Tyr613 τα οποία ανήκουν στον βρόχο 280s. Στο κέντρο αυτό συνδέονται ενώσεις όπως νουκλεοτίδια, νουκλεοζίτες, πουρίνες και η φλαβοπιριδόλη εμποδίζοντας την είσοδο στο καταλυτικό κέντρο αναστέλλοντας έτσι τη δράση του ενζύμου. Η αναστολή του ενζύμου προκύπτει από την ανάπτυξη π-π αλληλεπιδράσεων επιστοίβασης μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων των αμινοξέων



Phe285 και Tyr613 δρώντας συνεργιστικά με τη γλυκόζη, αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου. Ο παραπάνω μηχανισμός αναστολής του ενζύμου καθιστά τον οργανισμό ικανό να ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα [47].

Το **αλλοστερικό κέντρο** βρίσκεται σε απόσταση 30 Å από το καταλυτικό κέντρο, στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων και σε αυτό συνδέονται τόσο αλλοστερικοί ενεργοποιητές (AMP, IMP) όσο και αναστολείς (6-φωσφορική γλυκόζη οι οποίοι προάγουν την ενεργή ή την ανενεργή μορφή του ενζύμου [47,48].

Ο ισχυρότερος αναστολέας που έχει ταυτοποιηθεί γι' αυτό το κέντρο, είναι ο W1807 (Bayer AG) με σταθερά αναστολής  $K_i$  1.6 nM. Ο W1807 επάγει δραματικές μεταβολές στην τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης, κατά τη σύνδεσή του στο αλλοστερικό κέντρο [49].

Το **κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου** βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου σε απόσταση 30 Å από το καταλυτικό κέντρο, 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο και μέσω αυτού η φωσφορυλάση προσδένεται στα σωματίδια γλυκογόνου έμβιο οργανισμό. Το κέντρο αυτό απέδειξε τη σημαντική σχέση που υπάρχει μεταξύ πολυμερών γλυκόζης και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η χημική συγγένεια του γλυκογόνου για αυτό το κέντρο σύνδεσης είναι είκοσι φορές χαμηλότερη από αυτή στο καταλυτικό κέντρο [50]. Αυτό το κέντρο επικοινωνεί με ένα κανάλι με την καταλυτική περιοχή και εκεί μπορεί να χωρέσουν μέχρι και έξι μονάδες γλυκόζης. Αυτή ακριβώς η απόσταση είναι που δίνει στη GP τη δυνατότητα να φωσφορυλιώνει ταυτόχρονα πολλά κατάλοιπα, χωρίς να χρειάζεται να αποσυνδέεται και να επανασυνδέεται, μετά από κάθε καταλυτικό κύκλο [<http://diabetology.gr/medical-history/-diabetes-history>]. Πρόσφατες κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν πως στο κέντρο αυτό προσδένονται ολιγομερή γλυκόζης καθώς β- και γ- κυκλοδεξτρίνες [51].

Το **νέο αλλοστερικό κέντρο** ανακαλύφθηκε το 2000 [47] απέχει 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Το κέντρο αυτό βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς και ταυτοποιήθηκε από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με την ένωση ινδολο-2-καρβοζαμίδιο έναν ισχυρό αναστολέα τόσο του ηπατικού όσο και του μυϊκού ενζύμου.

Εκτός από τα καρβόξυ-αμίδια, στο κέντρο αυτό συνδέονται και ενώσεις που φέρουν ομάδες ναφθυλίου [48].

Ένα νέο κέντρο σύνδεσης το οποίο βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου αρκετά μακριά από άλλα κέντρα σύνδεσης και προσδένει την ένωση του βενζιμιδαζολίου ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Το κέντρο αυτό αποτελείται από μη πολικές ομάδες των καταλοίπων Phe<sup>202</sup>, Tyr<sup>203</sup>, Val<sup>221</sup> και Phe<sup>352</sup>. Ωστόσο, δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί ως κέντρο-στόχος ώστε να χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων [44].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 4.1 Αντικείμενο μελέτης- Σκοπός

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πειραματικής διαδικασίας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών μελετήθηκαν οι τρισδιάστατες κρυσταλλικές δομές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως συμπλόκου α) με τέσσερις οργανικές ενώσεις παράγωγα γλυκόζης και β) με πέντε θραύσματα. Για όλες τις ενώσεις που μελετήθηκαν είχε προηγηθεί ο χαρακτηρισμός αυτών ως ισχυροί ή λιγότερο ισχυροί (στην περίπτωση των θραυσμάτων) αναστολείς της δράσης του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, τα παράγωγα γλυκόζης που συντέθηκαν προέκυψαν με εισαγωγή άκυλο-άμινο παραγώγων ως υποκαταστατών στη β-ανωμερική θέση της γλυκόζης προκειμένου να μελετηθεί η πιθανότητα αύξησης της σύνδεσης των ενώσεων στο καταλυτικό κέντρο περισσότερο από μία τάξη μεγέθους. Τα δε θραύσματα αποτελούν τμήματα μεγαλύτερων ενώσεων οι περισσότερες από τις οποίες προέρχονται από γνωστούς αναστολείς της δράσης του ενζύμου οι οποίοι προσδένονται στο κέντρο αναστολής ή το νέο αλλοστερικό κέντρο αυτού. Απώτερος σκοπός της μελέτης ήταν η αποτίμηση της σπουδαιότητας των συγκεκριμένων θραυσμάτων για τη συγγένεια σύνδεσης που επεδείκνυαν οι μελετώμενοι αναστολείς μελετώντας τις αλληλεπιδράσεις τους με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ [8].

**Σκοπός** της παρούσας εργασίας είναι η ταυτοποίηση ενώσεων ή παραγώγων αυτών τα οποία θα αποσπεύσουν δυνάμει υπογλυκεμικά φάρμακα ρυθμίζοντας το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου με υψηλή εκλεκτικότητα, μειώνοντας όσο το δυνατόν περισσότερο τις παρενέργειες στον ανθρώπινο οργανισμό.

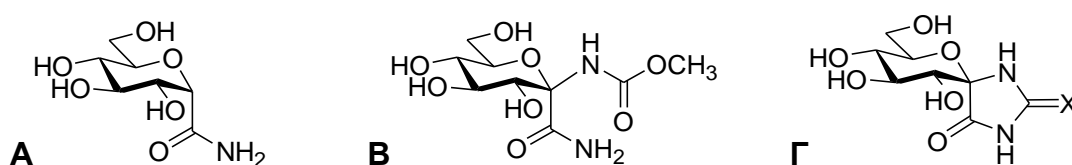
#### 4.2 Απομόνωση της φωσφορυλάσης *b* του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού στην (RMGP*b*).

Για την παρασκευή της φωσφορυλάσης *b* του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού ακολουθείται η τροποποίηση της μεθόδου Fisher & Krebs (1962) κατά την οποία σε όλα τα στάδια καθαρισμού, ως αναγωγικός παράγοντας, αντί L- κυστεΐνης χρησιμοποιείται β-μερκαπτοαιθανόλη [52-53].

### 4.3 Συνθετική πορεία

#### α) γλυκοπυρανοζυλιδινο-σπειρο-ιμινοθειαζολιδινόνες

Η σύνθεση των άκυλο-άμινο παραγώγων της γλυκόζης έλαβε χώρα στο εργαστήριο του Prof. Laszlo Somsak, Department of Chemistry, University of Debrecen, της Ουγγαρίας. Τα τελευταία 15 χρόνια έχουν σχεδιαστεί και αξιολογηθεί αρκετές κατηγορίες ενώσεων για την αναστολή της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η πιο διαδεδομένη μεταξύ αυτών είναι τα παράγωγα γλυκόζης που συνδέονται κατά κύριο λόγο στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Στο σχήμα 21 δίνονται ορισμένα παραδείγματα τέτοιου είδους ενώσεων.



Σχήμα 21. Παράγωγα γλυκόζης που συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο.

Η εισαγωγή ενός υποκαταστάτη τύπου ακυλαμινο στη β - ανωμερική θέση του **A** οδήγησε στην ένωση **B** και είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της σύνδεσης κατά περισσότερο από μία τάξη μεγέθους. Επίσης, το κλείσιμο του δακτυλίου που σχηματίζουν οι υποκαταστάτες στην α και β θέση προς σχηματισμό του δακτυλίου της σπειρουδαντοΐνης **Γ** έδωσε έναν αναστολέα ακόμη πιο ισχυρό έναντι του **B**.

Τα δομικά χαρακτηριστικά τα οποία θεωρείται ότι συμβάλουν στην ισχυρή σύνδεση των παραγώγων σπειροϋδαντοΐνης (**Γ**) στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχουν αποτυπωθεί με τη βοήθεια της μεθόδου της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X και συνοψίζονται στα εξής:

α) η παρουσία ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της β -NH ομάδας της σπειροϋδαντοΐνης και του καρβονυλικού οξυγόνου του αμινοξέος His377,

β) ο άκαμπτος δακτύλιος της σπειροϋδαντοΐνης, ο οποίος κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου δεν συνεπάγεται ενεργειακές απώλειες έναντι άλλων

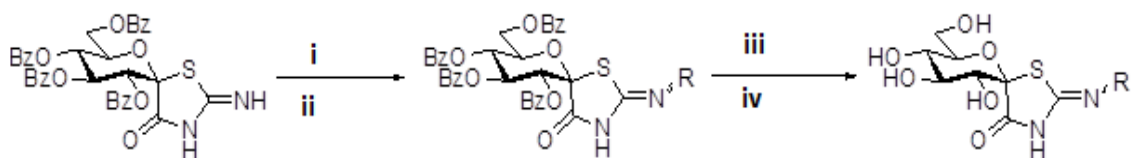
ενώσεων που υπόκεινται σε απώλεια ενέργειας λόγω μεταβολών στη διαμόρφωση που λαμβάνουν.

γ) η ικανότητα της σπειροϋδαντοΐνης να αλληλεπιδρά με τα μόρια ύδατος του καταλυτικού κέντρου και μέσω αυτών να σταθεροποιεί την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280.

Ο πρώτος αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, που προέρχεται από ανάλογο γλυκόζης και επέδειξε αναστολή της τάξης των  $\mu\text{M}$  ήταν η ένωση N-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη και κατόπιν η N-ακετυλο-N'-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρία. Ειδικότερα στην δεύτερη κατηγορία ενώσεων οι μελέτες με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X υπέδειξαν ότι η παρουσία του δεσμού υδρογόνου μεταξύ του αμιδικού αζώτου του τμήματος της ουρίας και του καρβονυλικού οξυγόνου της His377 δεν αποτελούσε προϋπόθεση για τη σύνδεση ενός αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Αντίθετα, η ισχυρότερη σύνδεση αυτού αποδόθηκε σε εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει το αρωματικό τμήμα αυτού στο λεγόμενο β-υποκέντρο του καταλυτικού καναλιού της πρωτεΐνης [Χίμαιρα πρόγραμμα οπτικοποίησης μοριακών δομών. <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>].

Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στο σχεδιασμό αναστολέων, που φέρουν έναν άκαμπτο δακτύλιο οξαζολίου καθώς και έναν αρωματικό υποκαταστάτη, ο οποίος σχεδιάστηκε έτσι ώστε να προσανατολίζεται κατά μήκος του καταλυτικού κέντρου και να φιλοξενείται στο β-υποκέντρο. Ο τρόπος σύνδεσης των ενώσεων αυτών επιβεβαιώθηκε με κρυσταλλογραφικές μελέτες του ενζύμου ως συμπλόκου με γλυκοπυρανοζυλιδίνες, σπειρο-οξαθειαζολίνες και σπειροϊσοοξαζολίνες, υποκατεστημένες με ομάδες ναφθυλίου, ενώσεις που αποτέλεσαν ισχυρούς αναστολείς της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Για την περαιτέρω μελέτη υποκαταστατών με μεγαλύτερη εξειδίκευση για το β-υποκέντρο, συντέθηκε μία ομάδα καρβοξυλαμιδίων από μία σειρά αλειφατικών και αρωματικών χλωριδίων του καρβοξυλικού οξέος. Στο σχήμα 21, παρουσιάζεται συνοπτικά η αντίδραση σύνθεσης των άκυλο-άμινο παραγώγων της γλυκόζης.



i. RCl, ii. ξηρή πυριδίνη, iii. NaOMe, iv. MeOH, v. R= H (**CK417**) ή Ph-CO (**CK418**) ή 1-νάφθυλο-2-CO (**CK422**) ή 2-νάφθυλο-CO (**CK421**) (συνθήκες αντίδρασης Zemplén).

**Σχήμα 22. Αντίδραση ακυλίωσης των γλυκοπυρανοζυλιδινο-σπειρο-ιμινοθειαζολιδινονών.**[

<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>]

Σε αυτού του είδους τις αντιδράσεις μόνο η αμιδική (-NH) ομάδα, η οποία συνδέεται στον άνθρακα-2 υποκαθίσταται. Συγκεκριμένα, στο πρώτο στάδιο σχηματίζεται ένας διπλός δεσμός (C=N) και ένα μόνο ισομερές όπως υποδεικνύεται από μετρήσεις NMR. Στην συνέχεια πραγματοποιείται αποβενζυλίωση των οξυγόνων του αναλόγου της γλυκόζης κάτω από τις συνθήκες αντίδρασης Zemplén. Τελικώς παρελήφθησαν οι προσδέτες που παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

## β) θραύσματα χαμηλού μοριακού βάρους

Τα θραύσματα ενώσεων, οι οποίες έχουν μελετηθεί ως εν δυνάμει αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου εστάλησαν από τους Dr. Isabelle Krimm και Dr. Jean-Marc Lancelin από το Laboratoire des Sciences Analytiques, Université de Lyon, Université de Claude Bernard, Lyon 1, Domaine Scientifique de la Doua, Villeurbanne στην Γαλλία. Οι ενώσεις αυτές διατίθενται στο εμπόριο από την εταιρεία Sigma Aldrich. Τα μελετώμενα θραύσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 15.

### 4.4 Κινητική μελέτη της RMGPb.

Τα κινητικά πειράματα των γλυκοπυρανοζυλιδινο-σπειρο-ιμινοθειαζολιδινονες παραγώνων πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της Δρ Κ-Μ. Αλεξάκου υπό την επίβλεψη του αείμνηστου Ν. Οικονομάκου, ενώ τα αντίστοιχα πειράματα για τα μοριακά θραύσματα διεξήχθησαν από την κα Κ. Χατζησταματίου, MSc στο πλαίσιο

της διπλωματικής της εργασίας για την απόκτηση διπλώματος ειδίκευσης στη Βιοχημεία, υπό την επίβλεψη της Δρ Ε. Χρυσίνα με κύρια υπεύθυνη την καθ. κα Α. Σιαφάκα-Καπάδα.

α) Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μυες κουνελιού πραγματοποιείται *in vitro*, προς την κατεύθυνση της σύνθεσης.



Οι ενώσεις-δυνάμει αναστολείς-διαλυτοποιούνται είτε σε νερό, είτε σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), ανάλογα με την πολικότητά τους και αναμιγνύονται με το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης (β-GP, EDTA, β-Merc), ώστε η περιεκτικότητα σε DMSO, να μην υπερβαίνει το 1% στην αντίδραση. Τα κινητικά αποτελέσματα για την αναστολή της φωσφορυλάσης συλλέγονται χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις των προς μελέτη ενώσεων και της 1-φωσφορικής γλυκόζης (η οποία χρησιμοποιείται σαν ανάλογο υποστρώματος στην αντίδραση), σε σταθερές συγκεντρώσεις γλυκογόνου και AMP [54].

Η σταθερά αναστολής  $K_i$ , αποτελεί το μέτρο της χημικής συγγένειας του αναστολέα για το ένζυμο και εξάγεται από το διάγραμμα των φαινόμενων  $K_M$ ,  $K_{M,app}$ , συναρτήσεως των διαφόρων συγκεντρώσεων του αναστολέα. Η τιμή  $K_M$  (σταθερά Michaelis-Menden), έχει διαστάσεις συγκέντρωσης και ισούται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, όπου η ταχύτητα λαμβάνει τιμή, ίση με τη μισή της μέγιστης ταχύτητας.

Η τιμή του  $IC_{50}$ , που εκφράζει τη συγκέντρωση του αναστολέα για την οποία το ένζυμο παρουσιάζει 50% αναστολή και εξάγεται με τον ίδιο τρόπο που εξάγεται η σταθερά αναστολής  $K_i$ . Στην περίπτωση όμως υπολογισμού του  $IC_{50}$ , η συγκέντρωση του

υποστρώματος παραμένει σταθερή και μεταβάλλεται μόνο η συγκέντρωση του αναστολέα.

Προκειμένου να εξεταστεί μεγάλος αριθμός ενώσεων για την ανασταλτική τους δράση στο ένζυμο, συνήθως προσδιορίζεται η τιμή IC<sub>50</sub> και εν συνεχεία υπολογίζεται η τιμή K<sub>i</sub> από τη σχέση που συνδέει τις δύο παραμέτρους και εξάγεται από τον τύπο:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [S]/K_M) \quad [55]$$

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις κινητικές μελέτες συνοψίζονται στους πίνακες 1 και 15 για τις δύο ομάδες ενώσεων που μελετήθηκαν.

#### **4.5 Κρυσταλλογραφικές μελέτες φωσφορυλάσης *b* του γλυκογόνου (RMGP*b*) ως συμπλόκου με εν δυνάμει αναστολείς.**

Όλες οι κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του ΕΙΕ. Για τις μεν ενώσεις παράγωγα των γλυκοπυρανοζυλιδινο-σπειρο-ιμινοθειαζολιδινών είχε ήδη γίνει η συλλογή και η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων από την Δρ Αλεξάκου καθώς και προκαταρκτικός προσδιορισμός της δομής του ενζύμου ως συμπλόκου με αυτές. Για τα δε μοριακά θραύσματα, η συλλογή των δεδομένων περίθλασης πραγματοποιήθηκε στην εγκατάσταση συγχροτρονικής ακτινοβολίας ακτίνων-Χ μεγάλης κλίμακας στο Αμβούργο της Γερμανίας (Large scale facility at EMBL-Hamburg Unit, PETRA III) από την Δρ Ευαγγελία Χρυσίνα. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας διεξήχθησαν πειράματα κρυστάλλωσης του ενζύμου στη φυσική διαμόρφωση, καθώς και μελέτες προσδιορισμού της δομής αυτού ως συμπλόκου με τους μελετώμενους αναστολείς.

Ειδικότερα:

Η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου πραγματοποιείται σε pH 6.8 στο οποίο το ένζυμο είναι ενεργό. Χρησιμοποιείται DDT ως αναγωγικός παράγοντας ο οποίος προστατεύει τις θειϊκές ομάδες των κυστεϊνών της πρωτεΐνης, NaN<sub>3</sub> ως αντιβακτηριδιακό, IMP για τον καλύτερο σχηματισμό κρυστάλλων και σπερμίνη για την εξουδετέρωση των αρνητικών φορτίων της πρωτεΐνης. Η πειραματική διαδικασία



απαιτεί δύο εργαστηριακές ημέρες ενώ για την παραλαβή ευμεγέθων κρυστάλλων απαιτούνται δύο έως και τρεις εβδομάδες.

#### Υλικά :

- Φωσφορυλάση του γλυκογόνου b απόσκελετικούς μύες κουνελιού.
- Ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης του ενζύμου (BES 10 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 0.5 mM και  $\text{NaN}_3$  0.01%), pH 6.8
- Διάλυμα σπερμίνης  $\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{N}_4 \cdot 4\text{HCl}$  200 mM
- Ζωάνθρακας
- Διάλυμα διθειοθρεϊτόλης (DTT)  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$  200 mM
- Διάλυμα μονοφωσφορικής ινοσιτόλης (IMP) 200 mM
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Μικροί κρύσταλλοι GPb (πυρήνες κρυσταλλώσεως)
- Κυψελίδες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm
- Γυάλινη ράβδος
- Γυάλινοι κυλινδρικοί σωλήνες διαμέτρου ~2 mm
- Ποτήρι ζέσεως 1000 mL
- Σιφώνιο
- Μεμβράνες διαπίδυσης
- Ιατρικές σύριγγες των 20 mL και του 1 mL
- Φίλτρα προσαρμοζόμενα σε σύριγγες Millex Millipore
- Απιονισμένο ύδωρ
- Parafilm

#### Εργαστηριακά όργανα

- Φυγόκεντρος Sorvall, RC5-C, με κεφαλές SS-34 και GS-3
- Πεχάμετρο Metrohm 744
- Φασματοφωτόμετρο UV-Visible Spectrophotometer (CARY)
- Πιπέτες Gilson των 20  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$  και 1000  $\mu\text{L}$
- Αναλυτικός ζυγός
- Vortex Autovortex Mixer SA2 Stuart Scientific

### Πειραματική διαδικασία:

#### α) Διαπίδυση του ενζύμου.

Ποσότητα ενζύμου η οποία επιλέχθηκε να κρυσταλλωθεί εισάγεται αργά αργά σε ένα σάκο διαπίδυσης απαλαγμένο από την συντηρητική αιθανόλη. Ο σάκος κλείνεται από τις δύο πλευρές αφήνοντας ελάχιστο κενό και τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως το οποίο περιέχει ~1000 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα της διαπίδυσης και αφήνεται υπό ήπια ανάδευση σε ψυκτικό θάλαμο, στους 4 °C. Έπειτα από 2 ώρες περίπου το ρυθμιστικό διάλυμα της διαπίδυσης αντικαθίσταται με νέο οπότε η διαπίδυση συνεχίζεται υπό τις ίδιες συνθήκες για μία ολόκληρη νύχτα.

#### β) Κατεργασία με ζωάνθρακα.

Σε σωλήνα φυγοκέντρησης προστίθεται 1.5 φορές το βάρος του ενζύμου σε ζωάνθρακα και απογεμίζεται με το ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης, χωρίς το αντιοξειδωτικό DTT. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 35943 g επί 20 min σε θερμοκρασία 25-30 °C. Απομακρύνεται το διάλυμα της διαπίδυσης και στο σωλήνα φυγοκέντρησης μεταγγίζεται από το σάκο διαπίδυσης το ένζυμο, το οποίο αναδεύεται ήπια με μία γυάλινη ράβδο για περίπου 40 min. Όταν ολόκληρη η μάζα του ενζύμου έρθει σε επαφή με το ζωάνθρακα για την απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων, τότε ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Φυλάσσεται το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης το οποίο περνά μέσα από φίλτρο με τη βοήθεια μίας μεγάλης σύριγγας για την απομάκρυνση του τυχόν εναπομείναντος ζωάνθρακα.

#### γ) Φωτομέτρηση ενζύμου.

Η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 280 nm με βάση το νόμο Lambert-Beer:

$$c = A/\epsilon \cdot b$$

με 
$$\epsilon = 1.32 \left( \frac{ml}{mg \cdot cm} \right) \text{ και } b = 1 \text{ cm}$$

Προκειμένου για την κρυστάλλωση του ενζύμου αυτό κατεργάζεται με ζωάνθρακα για να απαλλαγεί από τα νουκλεοτιδία. Για αυτόν τον σκοπό προσδιορίζεται ο λόγος  $A_{260nm}/A_{280nm}$  ο οποίος θεωρείται ικανοποιητικός για τιμές < 0.5. Η συγκέντρωση του ενζύμου περίπου 20 mg/mL θεωρείται πολύ ικανοποιητική για κρυσταλλώσεις.

δ) Κρυστάλλωση πρωτεΐνης.

Συγκέντρωση σπερμίνης ίση με 1 mM, DTT 3 mM και IMP 1 mM προστίθενται στην ποσότητα του προς επεξεργασία ενζύμου και το μίγμα μοιράζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, όχι απαραίτητα ισόποσα. Στον πρώτο από τους σωλήνες εισάγεται μικρή ποσότητα πυρήνων κρυστάλλωσης (περίπου το 1/5 του περιεχομένου του σωλήνα) και ακολουθούν διαδοχικές αραιώσεις των πυρήνων κρυστάλλωσης από τον ένα δοκιμαστικό σωλήνα στον επόμενο σύμφωνα με τη διαδικασία που έχει προαποφασιστεί, κυρίως όμως με τυχαίο τρόπο. Τελικά, το ένζυμο τοποθετείται σε μικρά γυάλινα κυλινδρικά σωληνάκια τα οποία πληρώνονται, κλείνονται ασφικτικά και από τις δύο πλευρές τους και φυλάσσονται στον θάλαμο κρυσταλλώσεων στους 16 °C. Συνήθως οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αρχίζουν να γίνονται ορατοί μετά από δύο περίπου ημέρες, ενώ η ανάπτυξη τους συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου RMGPb:αναστολέα έγινε με εμβάπτιση του κρυστάλλου σε διάλυμα αναστολέα συγκέντρωσης σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 10 έως 20 mM παρουσία 20% DMSO (μέγιστη περιεκτικότητα) όπου ήταν απαραίτητο λόγω δυσδιαλυτότητας των ενώσεων. Στη συνέχεια ο κρύσταλλος εκτίθεται σε συγχροτρονική μονοχρωματική ακτινοβολία ακτίνων-Χ σε θερμοκρασία δωματίου. Η θέση και η ένταση των περιθλάσεων των ατόμων υπολογίζονται με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού μετά από ολοκλήρωση και κλιμάκωση των δεδομένων που αποτυπώνονται στο σύνολο των περιθλασιγραμμάτων, το χρόνο έκθεσης, τη γωνία περιστροφής του κρυστάλλου, την απόσταση από τον ανιχνευτή και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε με τα προγράμματα *MOSFLM* [63] και *XDS* [<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/harry/imosflm/ver107/>]. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν εφαρμογές του πακέτου **CCP4** [88] το οποίο περιλαμβάνει σειρά προγραμμάτων όπως:

α) **Scala**: για τη συγχώνευση και ολοκλήρωση των δεδομένων περίθλασης .

β) **Phaser**: με το οποίο υπολογίζεται η ομάδα χώρου συμμετρίας της μοναδιαίας κυψελίδας στο πλέγμα του κρυστάλλου.

γ) **Refmac**: για τον υπολογισμό χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας και τη βελτιστοποίηση των πρωτεϊνικών μοντέλων έναντι των πειραματικών δεδομένων

Για το σχεδιασμό των οργανικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **Chemdraw** [[http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01442358309353349#.UmbGL\\_IrISI](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01442358309353349#.UmbGL_IrISI)], ενώ η γεωμετρία των αναστολέων (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κλπ) καταγράφηκε με τη μορφή βιβλιοθήκης, με τη βοήθεια του προγράμματος **Dundee server** [[http://www.ccp4.ac.uk/MG/ccp4mg\\_help/symmetry.html](http://www.ccp4.ac.uk/MG/ccp4mg_help/symmetry.html)].

Ο έλεγχος της συμφωνίας του μοντέλου ως προς τα πειραματικά δεδομένα έγινε με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών **COOT** με τη βοήθεια του οποίου απεικονίζονται οι χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας και παρέχεται η δυνατότητα προσαρμογής του πρωτεϊνικού μοντέλου σε αυτή όπου αυτό είναι απαραίτητο [<http://davarc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg/>].

Η ορθή γεωμετρία της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου ελέγχθηκε με το πρόγραμμα **Molprobit** το οποίο αποτελεί ένα διαδουκτιακό εργαλείο επικύρωσης δομής βασισμένο σε ευρύ φάσμα παγκόσμιων σταθερών προκειμένου να αξιολογήσει την ποιότητα του προς μελέτη μοντέλου [57].

Οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται κατά τη σύνδεση των αναστολέων στο ένζυμο προσδιορίζονται με το πρόγραμμα **Contact** [88] και αποτυπώνονται σχηματικά με την εφαρμογή **LIGPLOT** [<http://neochemist.com/software/download-chemdraw-ultra-12-0-for-free/>].

Τέλος τα προγράμματα οπτικοποίησης τρισδιάστατων δομών, **Chimera** και **MolSoft** χρησιμοποιήθηκαν για τη σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων [80, <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

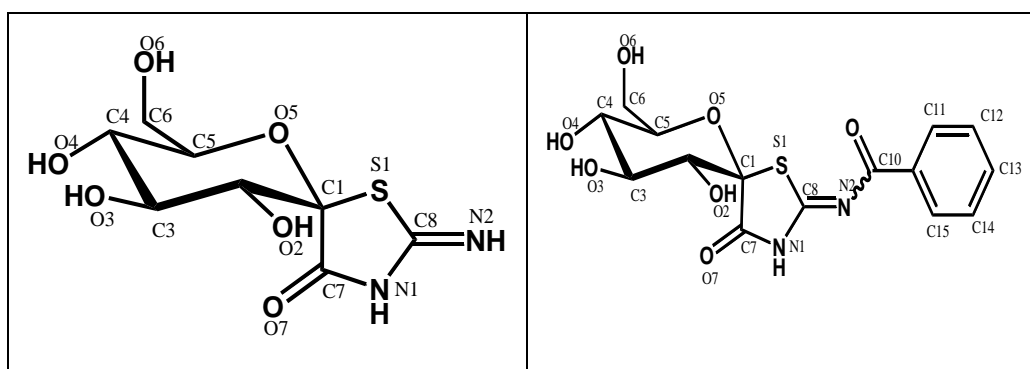
### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

#### 5.1 Δομικές μελέτες της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως συμπλόκου με γλυκοπυρανοζυλιδινο-σπειρο-ιμινοθειαζολιδινονες.

Η γνώση που προέκυψε από τη μελέτη της τριδιάστατης δομής της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ και των διακριτών κέντρων σύνδεσης αυτής, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να σχεδιασθούν χημικές ενώσεις οι οποίες θα λειτουργούσαν ως δυνάμει αναστολείς του ενζύμου. Μεταγενέστερα, θα υπήρχε η δυνατότητα να παραχθούν φάρμακα προκειμένου να ρυθμιστεί η ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του διαβήτη τύπου 2. Οι πρώτες ενώσεις οι οποίες μελετήθηκαν με στόχο το καταλυτικό κέντρο της RMGPb ήταν παράγωγα γλυκόζης τα οποία συνδέονταν κατά μήκος του β-καναλιού στο καταλυτικό κέντρο. Συγκεκριμένα μελέτες έδειξαν πως παράγωγα γλυκόζης, τα οποία προέρχονται από υποκατάσταση της α-ανωμερικής θέσης του δακτυλίου και φέρουν το δακτύλιο της σπειροϋδαντοΐνης καθώς και παράγωγα αυτής με αρωματικούς ή φαινυλικούς δακτυλίους, είχαν την δυνατότητα να συνδεθούν στο καταλυτικό κέντρο της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αναστέλλοντας τη δράση αυτού.

Με γνώμονα τα παραπάνω συντέθηκαν τέσσερα ανάλογα γλυκόζης (Πίνακας 1) στο εργαστήριο του Prof. Laszlo Somsak, Department of Organic Chemistry, University of Debrecen, Hungary.

Πίνακας 1. Γλυκοπυρανοζυλιδινο-σπειρο-ιμινοθειαζολιδινονες



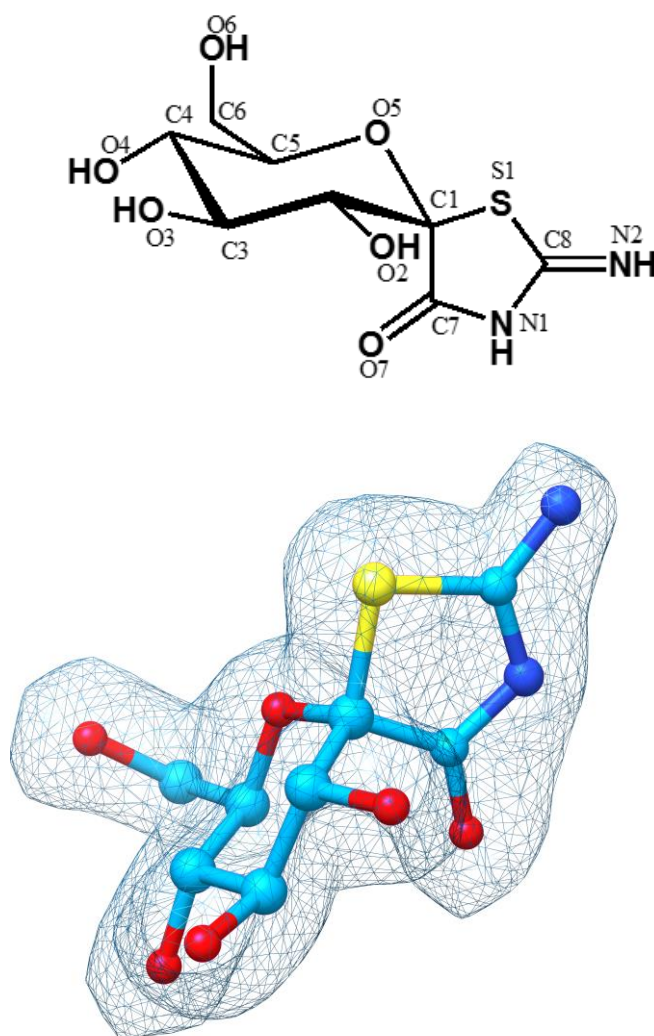
<b>IC<sub>50</sub>: 27 ± 1.5 μM</b> <b>CK417</b>	<b>IC<sub>50</sub>: 17.1 ± 0.3 μM</b> <b>CK418</b>
<b>IC<sub>50</sub>: 7.1 ± 0.7 μM</b> <b>CK421</b>	<b>IC<sub>50</sub>: 14.7 ± 0.5 μM</b> <b>CK422</b>

Για τα παραπάνω παράγωγα γλυκόζης πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου ως δυνάμει αναστολείς της *RMGPb* στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών υπό την επίβλεψη του αείμνηστου Νίκου Οικονομάκου στο πλαίσιο της διδικτορικής διατριβής της Κύρας-Μελίντας Αλεξάκου. Τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών έδειξαν ότι την ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι της *RMGPb* επέδειξε η ένωση CK421 IC<sub>50</sub> 7.1 μM ενώ την ασθενέστερη η ένωση CK417. Αυτό υποδεικνύει ότι η προσθήκη αρωματικών υποκαταστατών στο N2 του σπειρο- δακτυλίου ευνοεί την ανασταλτική δράση των ενώσεων αυτής της οικογενείας [66].

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κρυσταλλογραφικές μελέτες με χρήση ακτίνων-Χ προκειμένου να διερευνηθεί ο τρόπος σύνδεσης της κάθε ένωσης ένζυμο. Για τη συλλογή των δεδομένων περίθλασης των κρυσταλλικών συμπλόκων χρησιμοποιήθηκαν οι εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας στο Daresbury Laboratory, UK σταθμός εργασίας PX10 υπό συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν ήταν πλήρη με ευκρίνεια εύρους 1.95 Å έως 1.90 Å για όλα τα σύμπλοκα. Τα στοιχεία που αφορούν στη συλλογή δεδομένων και για τα τέσσερα σύμπλοκα παρουσιάζονται στους πίνακες 2 έως 5. Ειδικότερα:

## A. Ένωση CK417.

Η τριδιάστατη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου RMGP*b*:CK417 προσδιορίστηκε σε ευκρίνεια 1.95 Å. Ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o - F_c$  (Σχήμα 23) έδειξε ότι η ένωση CK417 συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο όπως αναμενόταν για ένα ανάλογο της γλυκοπυρανόζης. Τα στατιστικά στοιχεία που αφορούν στα δεδομένα που συλλέχθηκαν καθώς και την τελική δομή περιγράφονται στον πίνακα 2.



Σχήμα 23. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o - F_c$  της ένωσης CK417 στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b* σε 1σ. Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>].

Πίνακας 2. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGP*b*:CK417

<b>Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων</b>	
Πείραμα	Κρύσταλλοι T-διαμόρφωσης RMGP <i>b</i> εμβαπτίζονται σε διάλυμα αναστολέα συγκέντρωσης 20mM σε 20%DMSO για 21 ώρες.
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	Daresbury PX10.1,16-19/11/2007
Μήκος κύματος (Å)	0.97976
Απόσταση (mm)	160
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.8
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	80(64)
Ομάδα χώρου συμμετρίας	<i>P</i> 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	a =b=128.2 Å, c=115.9 Å, α=β=γ=90°
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	35.7-1.95
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	619937
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	69137(9822)
<i>R</i> <sub>merge</sub> <sup>a</sup> (εξωτερική στοιβάδα)	0.061 (0.376)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	98.0 (96.8)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.06-1.95
<i>&lt;I/σ(I)&gt;</i> (εξωτερική στοιβάδα)	20.4(5.1)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	5.3(5.2)
Τιμή του παράγοντα θερμ/σίας B (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot)	25.4
<b>Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου</b>	
Ευκρίνεια (Å)	35.71 - 1.95
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 5%)	65603 (3502)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	(12-251)(261-314)(324-836)
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6562



Αριθμός μορίων ύδατος	274
Αριθμός ετεροατόμων	17 (CK417), 5(PO <sub>4</sub> ), 15 (PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R$ ( $R_{free}$ )	0.17274(0.19574)
$R$ ( $R_{free}$ ) (εξωτερική στοιβάδα)	0.216(0.23)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	1.039
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας $B$ (Å <sup>2</sup> )	31.4
Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα:	29.7
Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O):	33.0
Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας $B$ (Å <sup>2</sup> ) για τα ετεροάτομα	68.9(PO <sub>4</sub> ), 20.18(CK417), 19.775 (PLP)
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας $B$ (Å <sup>2</sup> ) για τα μόρια ύδατος	36

<sup>a</sup> $R_m = \sum_i \sum_h | \langle l_h \rangle - l_{ih} | / \sum_i \sum_h l_h$ , όπου  $\langle l_h \rangle$  και  $l_{ih}$  είναι η μέση και η  $i^{\text{th}}$  μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων  $h$ , αντιστοίχως. <sup>b</sup> $\sigma$  ( $l$ ) είναι η τυπική απόκλιση  $l$ . <sup>c</sup>Κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας  $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως.  $R_{free}$  είναι η αντίστοιχη τιμή  $R$  value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στη βελτιστοποίηση.

Κατά τη σύνδεση της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, η ένωση CK417 αναπτύσσει 16 δεσμούς υδρογόνου (πίνακες 3, 4) και 78 Van der Waals αλληλεπιδράσεις (πίνακας 5) με τα αμινοξέα που συνθέτουν το β-κανάλι της ενεργής περιοχής του ενζύμου (σχήμα 24). Οι αλληλεπιδράσεις που αφορούν στις περιφερειακές ομάδες υδροξυλίου του σακχάρου είναι συντηρημένες σε όλα τα σύμπλοκα γλυκόζης, οι δε επιπλέον αφορούν στον νέο υποκαταστάτη που εισήχθη.

**Πίνακας 3: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης CK417 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb.**

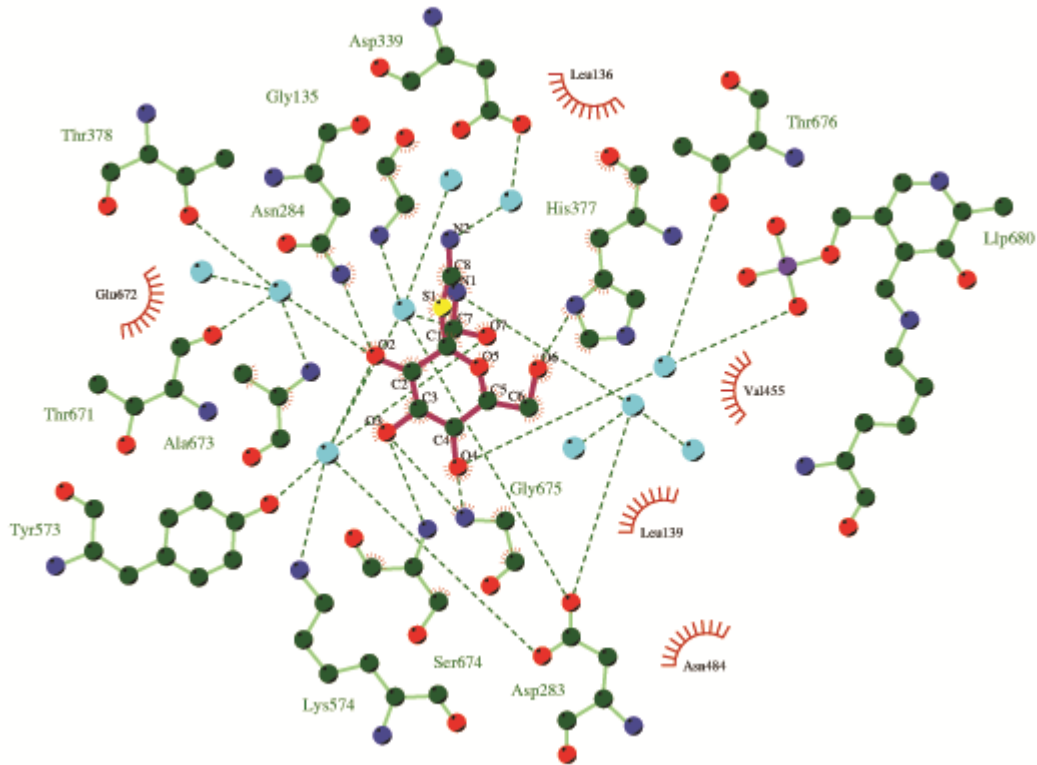
Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
O2	Asn284 ND2	3.0	161.4
	Tyr573 OH	3.1	146.9
	Glu672 OE1	3.2	177.4
	Wat52 O	3.0	-

	Wat189 O	3.0	-
<b>O3</b>	Glu672 OE1	2.7	121.9
	Ser674 N	3.1	176.6
	Gly675 N	3.1	145.4
<b>O4</b>	Gly675 N	2.9	129.1
	Wat49 O	2.6	-
<b>O6</b>	His377 ND1	2.7	166.4
	Asn484 OD1	2.8	136.1
<b>O7</b>	Wat50 O	3.2	-
	Wat52 O	3.1	-
<b>N1</b>	Wat53 O	2.8	-
<b>N2</b>	Wat60 O	2.7	-
	<b>Σύνολο</b>	<b>16</b>	

Πίνακας 4: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση CK417 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b*

<b>O4</b>	<b>...Wat49 O</b>	...Thr676 OG1	
		...PLP680 OP3	
<b>O7</b>	<b>...Wat50 O</b>	...Gly135 N	
		...Asp283 OD1	
	<b>...Wat51 O</b>	...PLP680 OP2	
		...Arg569 N	
	<b>...Wat52 O</b>	...Asp283 OD2	
		...Tyr573 OH	
		...Lys574 NZ	
<b>N1</b>	<b>...Wat53 O</b>	...Asp283 OD1	
	<b>...Wat54 O</b>	...Glu88 OE2	
		...Gly134 N	
		...Gly137 N	
	<b>...Wat55 O</b>	...Glu88 OE1	
<b>N2</b>	<b>...Wat60 O</b>	...Asp339 OD2	
<b>O2</b>	<b>...Wat189 O</b>	...Thr378 OG1	
		...Thr671 O	

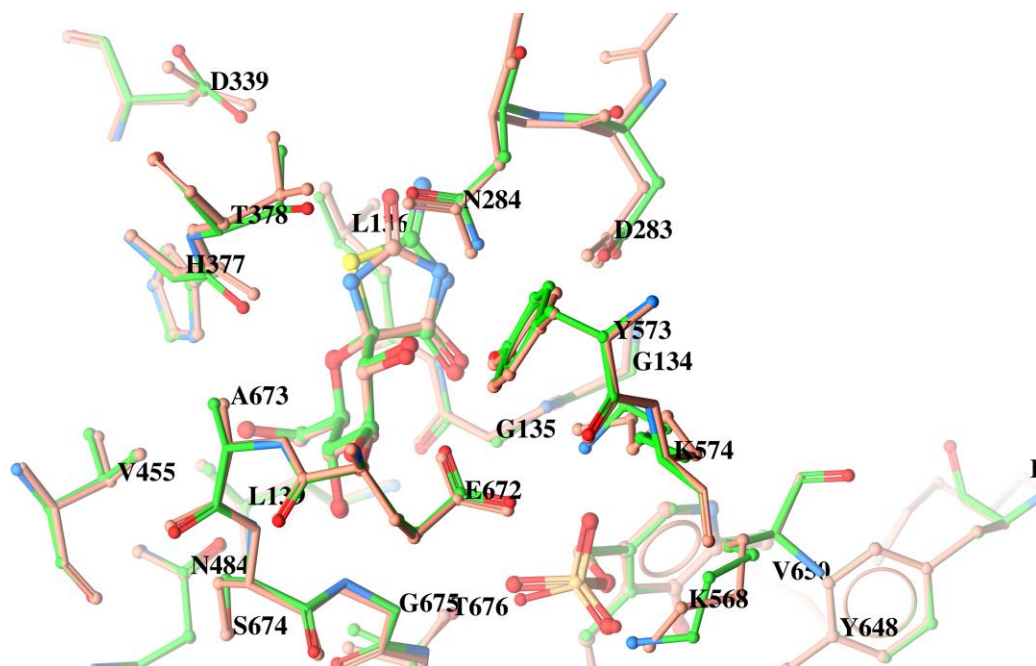




Σχήμα 24. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και Van der Waals αλληλεπιδράσεων της CK417 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT* [62].

Η σύγκριση της δομής του συμπλόκου *RMGPb:CK417* με αντίστοιχου συμπλόκου της σπειροϋδαντοΐνης, η δομή της οποίας προσδιορίσθηκε προγενέστερα [82,60], έδειξε ότι η αντικατάσταση του αζώτου στην 1' θέση του σπειροδακτυλίου με θείο, είχε ως αποτέλεσμα τη λιγότερο ευνοϊκή σύνδεση της ένωσης με τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου έναντι αυτής της σπειροϋδαντοΐνης. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών οι οποίες διεξήχθησαν, η συγγένεια σύνδεσης του αναστολέα

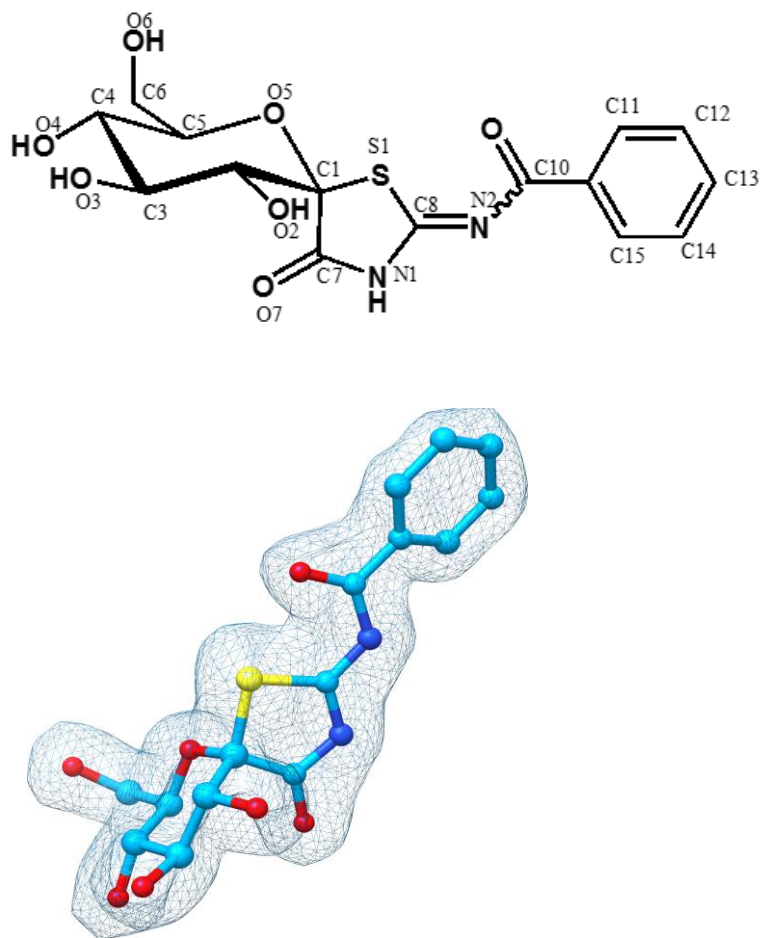
μειώθηκε. Προηγούμενες δομικές μελέτες με ανάλογα γλυκόζης έχουν δείξει πως η παρουσία της ισχυρής αλληλεπίδραση μεταξύ της ομάδας –NH και του καρβονυλικού οξυγόνου της His377 είναι μεν ευνοϊκή ωστόσο δε θεωρείται απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόσδεση. Ωστόσο, η ασθενέστερη πρόσδεση θα μπορούσε να μην αποδοθεί αποκλειστικά στην απουσία του εν λόγω δεσμού υδρογόνου. Προσεκτικότερη μελέτη των αμινοξέων στο περιβάλλον της ένωσης μετά από υπέρθεση της δομής του συμπλόκου *RMGPb:CK417* σε αυτήν της *RMGPb:σπειροϋδαντοΐνης* έδειξε ότι τα άτομα του σπειρο-δακτυλίου έχουν μετακινηθεί κατά  $\sim 0.5 \text{ \AA}$  (στρέψη του δακτυλίου κατά  $\sim 16^\circ$ ) ενώ το καρβονυλικό οξυγόνο της His377 έχει απομακρυνθεί κατά  $\sim 0.4 \text{ \AA}$  από την αρχική του θέση. Οι απωστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ του ατόμου θείου που εισήχθη στον σπειρο-δακτύλιο και του His377 O θα μπορούσαν μερικώς να ερμηνεύσουν την ασθενέστερη αναστολή της δράσης του ενζύμου παρά τον αυξημένο αριθμό αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται (δύο επιπλέον δεσμοί υδρογόνου και οκτώ van der Waals αλληλεπιδράσεις). Επιπρόσθετα, αναμένεται ότι η αντικατάσταση του καρβονυλικού οξυγόνου στη θέση (4) του σπειρο-δακτυλίου με μια αμιδική ομάδα θα βελτίωνε τη συγγένεια σύνδεσης. Ωστόσο, φαίνεται ότι το αμίδιο σχηματίζει αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του βρόχου 280s με αυτές του καρβονυλικού οξυγόνου στην περίπτωση της δομής του συμπλόκου *RMGPb:σπειροϋδαντοΐνης* (πίνακας 3,4 και 5, σχήμα 25) [60] Για να γίνει αυτό εφικτό, η δομή του διαλύτη διαταράσσεται ελαφρώς (παρατηρούνται αλλαγές κατά  $\sim 0.4 \text{ \AA}$ ) με την πλέον εκτεταμένη αλλαγή να αφορά στο νερό Wat53 O, το οποίο σχηματίζει απευθείας δεσμό υδρογόνου με το N1 του CK417 και μετακινείται κατά  $\sim 0.9 \text{ \AA}$  για να βελτιώσει την αλληλεπίδρασή του με το Asp283 OD1. Τα άτομα τόσο των αμινοξέων Asp283 όσο και Asp284 επίσης μετατοπίζονται κατά  $\sim 0.4 \text{ \AA}$ .



Σχήμα 25: Υπέρθυση των κρυσταλλικών δομών των *RMGPb* ως συμπλόκου με την σπειροϋδαντοΐνη της γλυκοπυρανόζης και την CK417. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών *MolSoft* [63].

## B. Ένωση CK418

Η τριδιάστατη δομή της ένωσης CK418 ως συμπλόκου με την *RMGPb* ενίσχυσε περαιτέρω την προτίμηση που επιδεικνύει το λεγόμενο β-υποκέντρο του καταλυτικού κέντρου για αρωματικές ομάδες με την προϋπόθεση ότι αυτές προσανατολίζονται κατά μήκος του β καναλιού. Ικανοποιητικός ήταν ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας και σε αυτήν την ένωση όπου χωρίς αμφιβολία υποδήλωνε τη σύνδεση της CK418. Η δομή του συμπλόκου προσδιορίσθηκε σε ευκρίνεια 1.9 Å (Σχήμα 26). Τα στατιστικά στοιχεία συλλογής, επεξεργασίας και βελτιστοποίησης συνοψίζονται στον Πίνακα 6.



Σχήμα 26. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας  $2F_o - F_c$  της ένωσης CK418 στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb σε  $1\sigma$ . Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>].

Πίνακας 6. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGPb:CK418

<b>Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων</b>	
Πείραμα	Κρύσταλλοι Τ-διαμόρφωσης GPb εμπυπνίζονται σε διάλυμα ανστολέα με συγκέντρωση 20mM σε 20% DMSO για 3.9 ώρες
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	Daresbury PX10.1, 16-19/11/2007
Μήκος κύματος (Å)	0.97976
Απόσταση (mm)	160

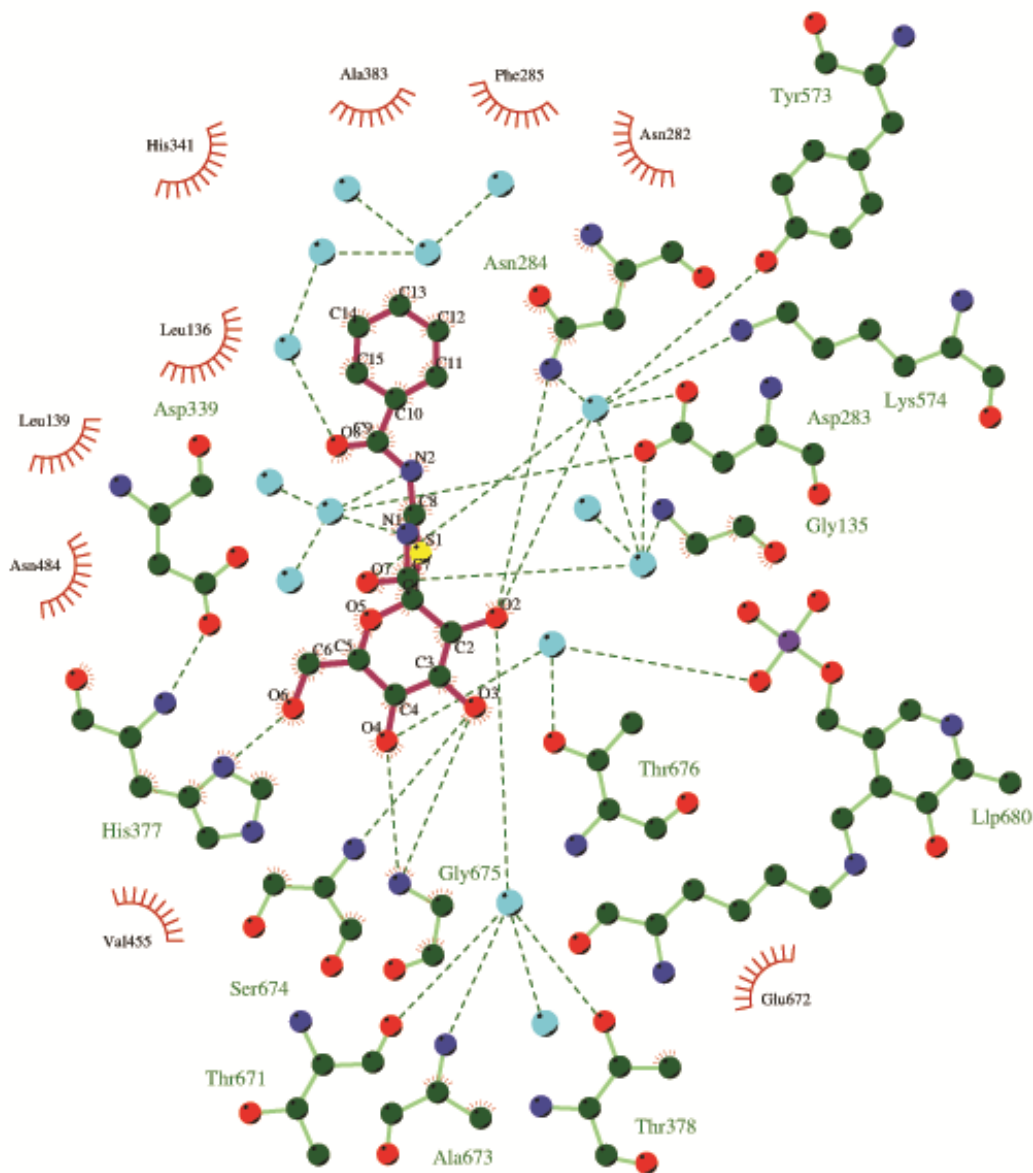
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.8
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	80(64)
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.0 Å, c=115.8 Å α=β=γ=90°
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	35.7-1.90
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	672299
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	74351 (10763)
R <sub>merge</sub> <sup>a</sup> (εξωτερική στοιβάδα)	0.073 (0.412)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	98.2 (98.5)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.00-1.9
<I / σ(I) > (εξωτερική στοιβάδα)	16.6 (3.2)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	5.1 (4.8)
Τιμή του παράγοντα θερμοσίας B (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot)	25.9
<b>Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου</b>	
Ευκρίνεια (Å)	35.50 - 1.9
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 5%)	70557(3734)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	(12-254) (261-314) (324-836)
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6589
Αριθμός μορίων ύδατος	287
Αριθμός ετεροατόμων	25(CK418), 5 (PO <sub>4</sub> ), 15 (PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R (R <sub>free</sub> )	0.17646(0.19256)
R (R <sub>free</sub> ) (εξωτερική στοιβάδα)	0.252(0.254)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	1.028
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα:	33.1
Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O):	31.3
Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	34.8
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα ετεροάτομα	82.744(PO <sub>4</sub> ), 21.137 (PLP) , 21.614(CK418)
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα μόρια ύδατος	36.885

<sup>a</sup> $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$ , όπου  $\langle I_h \rangle$  και  $I_{ih}$  είναι η μέση και η  $i^{\text{th}}$  μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων  $h$ , αντιστοίχως. <sup>b</sup> $\sigma(I)$  είναι η τυπική απόκλιση  $I$ . <sup>c</sup>Κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας  $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως.  $R_{\text{free}}$  είναι η αντίστοιχη τιμή  $R$  value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στη βελτιστοποίηση.

Η ελαφρώς ασθενέστερη αναστολή που προκαλεί σε σύγκριση με το γλυκοκυρανοζιτικό ανάλογο της σπειροϋδαντοΐνης (Πίνακας 1), μπορεί να οφείλεται



τόσο στην παρουσία του θείου που εισήχθη στον σπειρο-δακτύλιο, όμοια με την CK417, αλλά και στην μικρή ανακατάταξη στη δομή του διαλύτη προκειμένου να φιλοξενηθεί ο φαινυλικός δακτύλιος. Προφανώς οι απώλειες στην συνολική ενέργεια σύνδεσης από την εκτόπιση του διαλύτη στη θέση που τώρα καταλαμβάνει ο αρωματικός δακτύλιος δεν επηρέασε σημαντικά την συγγένεια που επέδειξε η CK418 η οποία συνδέεται ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο σχηματίζοντας συνολικά 19 δεσμούς υδρογόνου και 109 van der Waals αλληλεπιδράσεις (Πίνακες 7-9, Σχήμα 27).



Σχήμα 27. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων της CK418 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT* [62].

Πίνακας 7: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης CK418 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της RMGP*b*.

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
<b>O2</b>	Asn284 ND2	3.16	149.0
	Asn284 OD1	3.2	98.0
	Tyr573 OH	3.04	144.2
	Glu672 OE1	3.28	178.7
	Wat141 O	2.92	-
	Wat142 O	2.99	-
<b>O3</b>	Glu672 OE1	2.72	123.3
	Ser674 N	3.16	176.3
	Gly675 N	3.19	142.0
<b>O4</b>	Gly675 N	2.87	133.6
	Wat154 O	2.61	-
<b>O6</b>	His377 ND1	2.71	170.2
	Asn484 OD1	2.84	137.9
<b>O7</b>	Wat142 O	3.07	-
	Wat143 O	3.06	-
<b>O8</b>	Wat165 O	2.77	-
	Wat143 O	3.06	-
<b>N1</b>	Wat158 O	2.78	-
<b>N2</b>	Wat158 O	3.32	-
<b>Σύνολο</b>	<b>19</b>		

Πίνακας 8: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση CK418 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGP*b*

<b>O2</b>	<b>...Wat141 O</b>	...Thr378 OG1 ...Thr671 O ...Ala673 N <b>...Wat140 O</b>	...Wat138 O ...Val379 N ...Thr671 O
<b>O7</b>	<b>...Wat142 O</b>	...Asp283 OD2 ...Tyr573 OH ...Lys574 NZ <b>...Wat143 O</b>	...Gly135 N ...Asp283 OD1

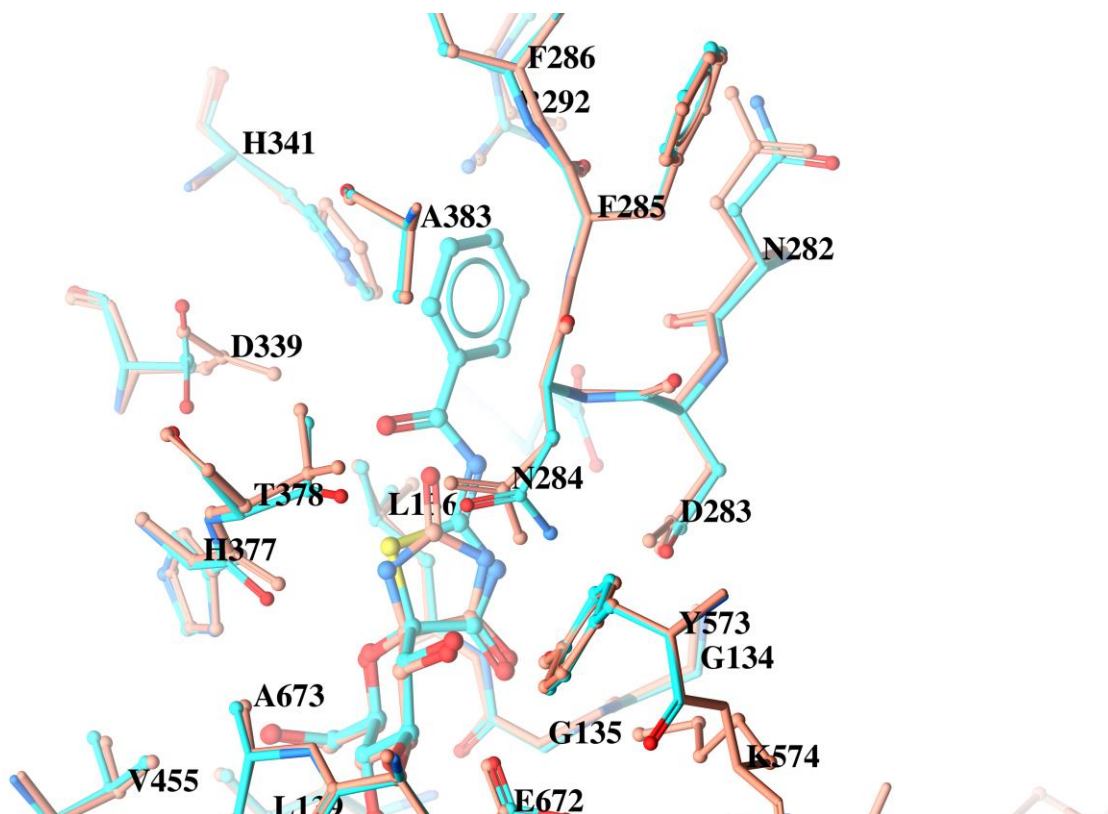
			...Wat144 O	...Arg 569 N ...PLP 680 OP2
O4	...Wat154 O	...Thr676 OG1 ...Lip680 OP3		
N1	...Wat158 O	...Asp283 OD1 ...Wat157 O	...Glu 88 OE2 ...Gly134 N ...Gly137 N	
		...Wat159 O	...Glu88 OE1 ...Asn282 O	
O8	...Wat165 O	...Wat164 O	...Asp339 OD1 ...His341 NE2 ...Ala383 O ...Wat167 O	

Πίνακας 9: Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης CK418 και των αμινοξέων και των νερών του καταλυτικού κέντρου της RMGPb.

Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης/διαλύτη	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
C1	His377A O	1
C2	His377 O; Glu672 OE1; Wat141 O, Wat142 O	4
C3	GLu672 OE1; Gly675 N; Wat154 O	3
C4	Gly675 N; Wat154 O	2
C5	Gly135 C; Leu136 N; Wat154 O	3
C6	Gly135 O; Gly135 C; His377 ND1; Asn484 OD1	4
C7	Leu136 N; Asn284 ND2; Wat142 O; Wat143 O; Wat158 O	5
C8	Leu136 CB; Asn284 CG, ND2; Wat158 O	4
C9	Leu136 CD1; Asn284 N, CA; Wat165 O	4
C10	Asn284 N, CA; His341 CE1	3
C11	Asn284 CA; Phe285 N; His341 NE2; Ala383 O; Wat164 O; Wat165 O	6
C12	Phe285 O, C, N; Ala383 O; His341 NE2; Wat164 O	6
C13	Phe285 O; His341 NE2, CE1; Wat163 O	4
C14	Asn282 O; His341 CE1; Wat159 O; Wat171 O; Wat160 O	5
C15	Asn282 O; Asn284 N; His341 CE1; Wat159 O	4
O2	Asn284 CG	1

<b>O3</b>	Glu672 C, CD, C; Ala673 CA, CB, N; Ser674 N; Wat141 O	8
<b>O4</b>	Asn484 OD1; Ser674 CB, C; Gly675 CA, O, C	6
<b>O5</b>	Leu136 N, CA, CB; His377 CB, ND1, O	6
<b>O6</b>	Leu139 CD2; His377 CE1, CG, ND1; Val455 CG1, CG2	6
<b>O7</b>	Gly135 CA, N, C; Leu136 N; Wat154 O; Wat158 O	6
<b>O8</b>	Leu136 CD1; Thr378 CG2	2
<b>N1</b>	Leu136 CB, N; Asp283 OD1; Asn284 ND2; Wat142 O, Wat143 O	6
<b>N2</b>	Leu136 CD1; Asn284 CG, CA, N, ND2; Wat158 O	6
<b>S1</b>	Asn284 OD1; His377 CB, C, O	4
<b>Σύνολο</b>		<b>109</b>

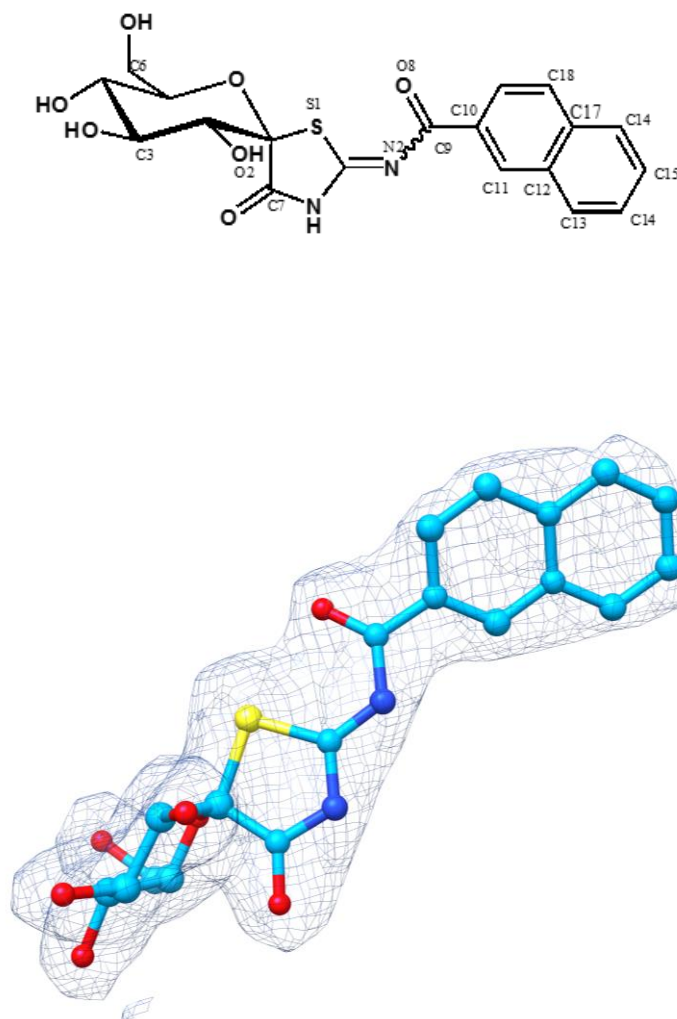
Ειδικότερα, το νερό Wat60 O του RMGP*b*:CK417 δεν είναι παρόν στη νέα δομή του συμπλόκου αποσταθεροποιώντας την πλευρική αλυσίδα του Asp339 (η δίεδρη γωνία  $\chi_2$  περιστρέφεται κατά  $\sim 40^\circ$ ) και το νερό Wat55 O μετακινείται κατά  $\sim 1.0 \text{ \AA}$  προκειμένου να απομακρυνθεί από τον αρωματικό δακτύλιο. Μικροαλλαγές παρατηρούνται επίσης στην πλευρική αλυσίδα της His341 (τα άτομα του δακτυλίου του ιμιδαζολίου μετατοπίζονται κατά  $\sim 0.3 \text{ \AA}$  to  $\sim 0.5 \text{ \AA}$  (Σχήμα 28). Το αυξημένο πλήθος των van der Waals αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται με τα αμινοξέα στο περιβάλλον της ένωσης εμφανίζεται να αντισταθμίζει τις απώλειες στη συνολική ενέργεια σύνδεσης από τις παραπάνω αλλαγές και η CK418 παραμένει ως μια ελκυστική πρόδρομος ένωση για περαιτέρω βελτίωση με εφαρμογή του κατευθυνόμενου-από τη δομή-σχεδιασμού.



Σχήμα 28: Υπέρθεση των κρυσταλλικών δομών των RMGPb: CK418 (κυανό) και αυτής της σπειροϋδαντοΐνη της γλυκοπυρανόζης (πορτοκαλί) στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών *MolSoft* [63].

### Γ. Ένωση CK421.

Αντικατάσταση του φαινολικού δακτυλίου της CK418 με μια ομάδα ναφθυλίου έδωσε την ένωση CK421 οποία επίσης χρησιμοποιήθηκε για τον σχηματισμό συμπλόκου με το ένζυμο. Τα δεδομένα περίθλασης που συλλέχθηκαν για αυτό το σύμπλοκο ήταν σε ευκρίνεια 2.1 Å ελαφρώς χαμηλότερη έναντι των προηγούμενων δύο συμπλόκων. Οι χάρτες διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας υπέδειξαν ότι και αυτή η ένωση συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου όπως αναμενόταν με την ομάδα ναφθυλίου να φιλοξενείται στο β-υποκέντρο.



Σχήμα 29. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o-F_c$  της ένωσης CK421 στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb σε 1σ. Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>].

Πίνακας 10. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης CK421 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb.

<b>Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων</b>	
Πείραμα	Κρύσταλλοι T-διαμόρφωσης GPb εμπλατίζονται σε διάλυμα αναστολέα με συγκέντρωση 20mM σε 20% DMSO για 4 ώρες
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	Daresbury PX10.1, 16-19/11/2007
Μήκος κύματος (Å)	1.04498

Απόσταση (mm)	160
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.8
Αριθμός περιθλασιγραμμμάτων (°)	80
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.0 Å, c=115.8 Å α=β=γ=90°
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	35.646-1.85
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	660330
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	55833(8085)
R <sub>merge</sub> <sup>a</sup> (εξωτερική στοιβάδα)	0.086(0.428)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	99.2(99.75)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.21-2.10
<I /σ(I) > (εξωτερική στοιβάδα)	15.9(4.6)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	5.0(4.9)
Τιμή του παράγοντα θερμότητας B (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot)	32.85
<b>Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου</b>	
Ευκρίνεια (Å)	32.03-2.1
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 5%)	52967(2836)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	(12-251)(261-314)(324-836)
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6553
Αριθμός μορίων ύδατος	163
Αριθμός ετεροατόμων.0	32(CK421) 8(DTT) 4(DMS)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R (R <sub>free</sub> )	0.18119(0.21837)
R (R <sub>free</sub> ) (εξωτερική στοιβάδα)	0.239(0.263)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	006
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	1.053
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα:	41.3

Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O):	39.1
Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	43.5
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα ετεροάτομα	31.0 (CK421) 30.5 (PLP) 69.8 (DDT) 64.4 (DMS)
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα μόρια ύδατος	38.0

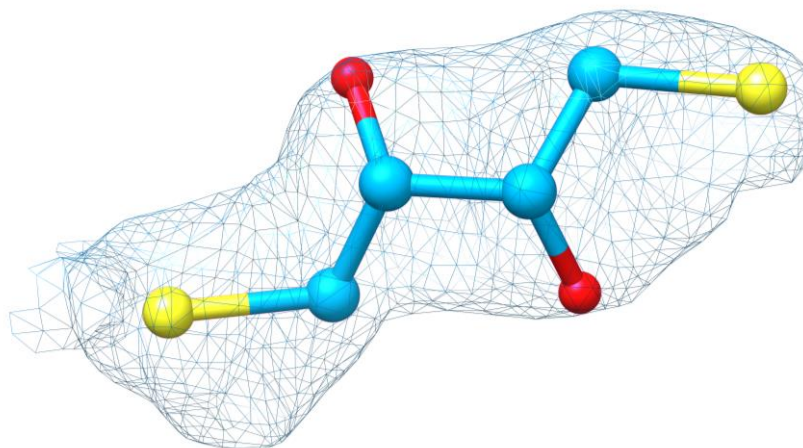
<sup>a</sup> $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$ , όπου  $\langle I_h \rangle$  και  $I_{ih}$  είναι η μέση και η  $i^{\text{th}}$  μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων  $h$ , αντιστοίχως. <sup>b</sup> $\sigma (I)$  είναι η τυπική απόκλιση  $I$ . <sup>c</sup>Κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας  $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως.  $R_{\text{free}}$  είναι η αντίστοιχη τιμή  $R$  value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στη βελτιστοποίηση.

Ασθενής πρόσθετη πυκνότητα παρατηρήθηκε και στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου, η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί στην ομάδα ναφθυλίου. Σε προηγούμενες μελέτες έχει ήδη δείχθει άλλωστε ότι παράγωγα γλυκόζης που φέρουν την ναφθυλομάδα ως υποκαταστάτη συνήθως συνδέονται τόσο στο καταλυτικό όσο και στο νέο αλλοστερικό κέντρο. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη περίπτωση παρά την προσπάθεια που έγινε να εμπλουτιστεί το μοντέλο με την ένωση και στο δεύτερο κέντρο, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα δεν ήταν ικανοποιητική μετά τη βελτιστοποίηση. Έτσι μπορεί να αποτυπωθεί μόνο το ενδεχόμενο να συνδέεται ασθενώς η ένωση και στο νέο αλλοστερικό κέντρο. Για περαιτέρω διερεύνηση θα ήταν δόκιμο να πραγματοποιηθεί συγκρυστάλλωση του ενζύμου με την CK421.

Στο στάδιο βελτιστοποίησης του πρωτεϊνικού μοντέλου της συμπλόκου δομής έναντι των πειραματικών δεδομένων πάντα πραγματοποιείται ενδελεχής έλεγχος όλων των αμινοξέων και των μορίων ύδατος που περιλαμβάνονται σε αυτό. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, στην ευρύτερη περιοχή του β-υποκέντρου του ενζύμου (στο χώρο πάνω από την ομάδα ναφθυλίου), παρατηρήθηκε πρόσθετη, συνεχής ηλεκτρονιακή πυκνότητα η οποία δεν μπορούσε να αποδοθεί σε περισσότερα του ενός μόρια ύδατος. Ακολούθησε επικοινωνία με τον Prof. Somsak, ο οποίος και συνέθεσε τις ενώσεις CKs για τη διερεύνηση κάποιας πρόσμιξης στην ένωση η οποία θα

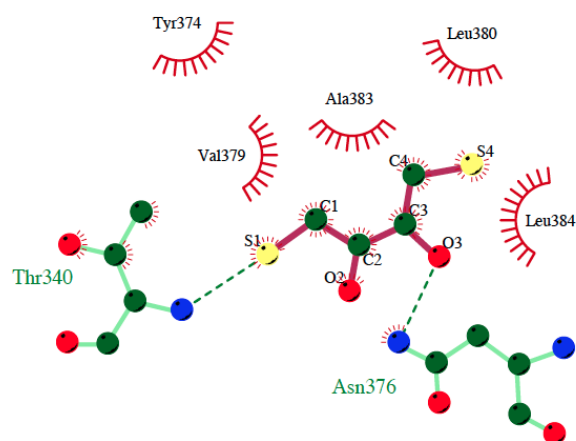


εμφανιζόταν κατά τον χαρακτηρισμό της ένωσης μετά το στάδιο της σύνθεσης έδειξε ότι το φάσμα NMR που είχαν πάρει δεν υποδήλωνε την παρουσία κάποιας πρόσμιξης. Για περαιτέρω έλεγχο χρησιμοποιήθηκε και υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC-MS) και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ένωση δεν περιέχει κάποια πρόσμιξη. Έχοντας βεβαιωθεί για την καθαρότητα της CK421 το μόνο που απέμενε ήταν να εξετασθούν ξανά όλα τα συστατικά του διαλύματος κρυστάλλωσης και απομόνωσης/καθαρισμού ενζύμου. Μετά από συστηματική μελέτη αποδείχθηκε ότι η πυκνότητα μπορούσε να αποδοθεί σε ένα μόριο διθειοθρεϊτόλης, DTT το οποίο χρησιμοποιείται τόσο κατά την παρασκευή όσο και κατά την κρυστάλλωση του ενζύμου. Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί σε άλλη γνωστή δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μυες κουνελιού η εν λόγω ένωση συνδεδεμένη. Λαμβάνοντας υπόψη επίσης ότι οι συντελεστές θερμοκρασίας B factors για την ένωση αυτή είναι  $\sim 65 \text{ \AA}^2$  φαίνεται πως το DTT συνδέεται μεν αλλά όχι ισχυρά στο ένζυμο.



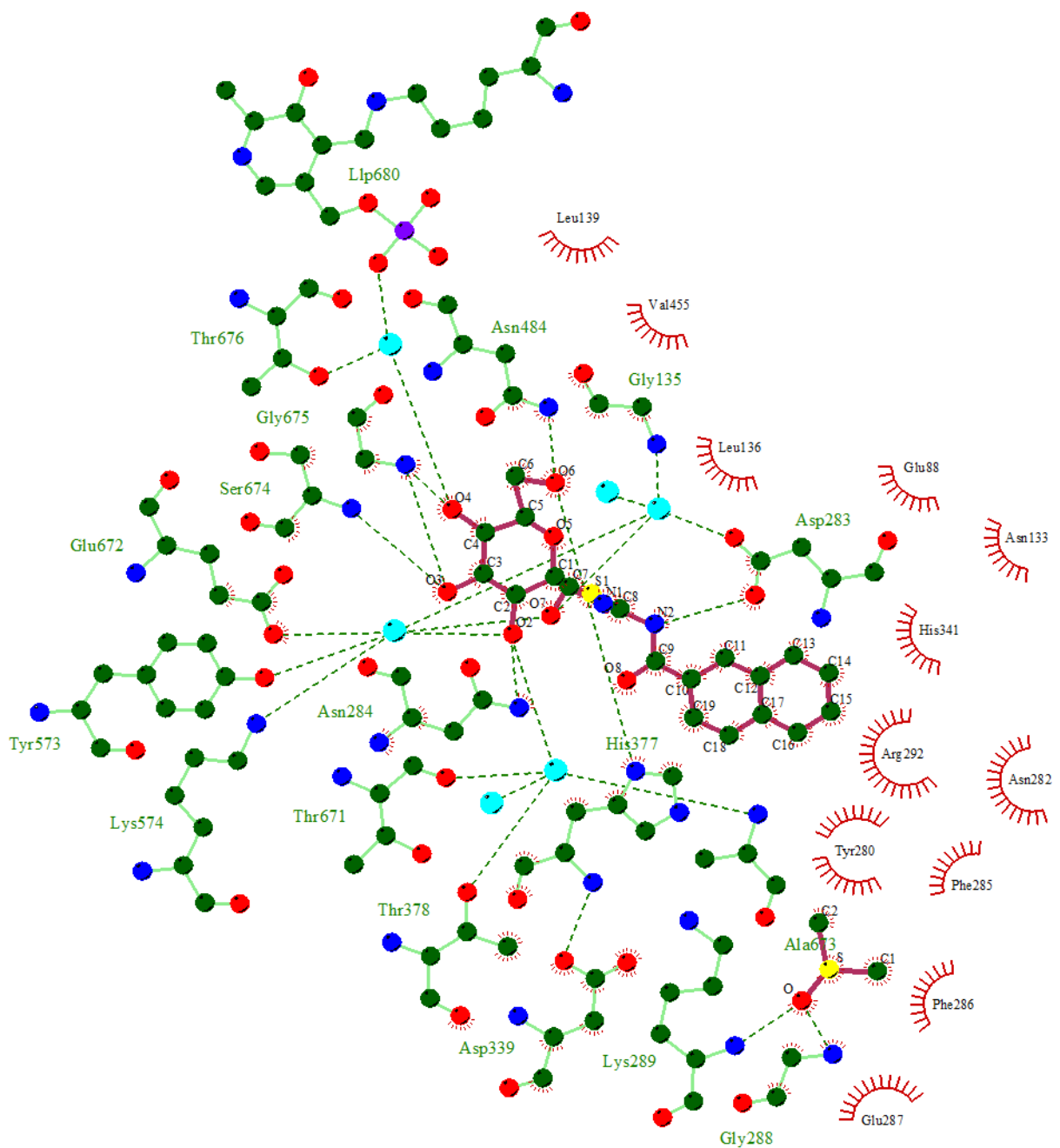
**Σχήμα 30.** Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας  $2F_o-F_c$  της ένωσης DTT στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb σε  $1\sigma$ . Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera

[\[http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/\]](http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/).



**Σχήμα 31. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων DTT κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT* [62].**

Λεπτομερέστερη μελέτη του τρόπου σύνδεσης της CK421 και σύγκριση αυτής με την CK418 αποκαλύπτει ότι παρατηρούνται δομικές αλλαγές στο καταλυτικό κέντρο οι οποίες ενδέχεται να διευκολύνουν τη σύνδεση και του DTT. Πιο συγκεκριμένα, η CK421 σχηματίζει 17 δεσμούς υδρογόνου και 126 Van der Waals αλληλεπιδράσεις οι οποίες παρουσιάζονται γραφικά στο σχήμα 32 και παραθέτονται στους πίνακες 11 έως 13.



Σχήμα 32. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων της CK421 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT* [62].

Πίνακας 11: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης CK421 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb.

Ατομο αναστολέα	Ατομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
<b>O2</b>	Asn284 ND2	3.18	153.7
	Tyr573 OH	3.13	147.4
	Glu672 OE1	3.25	179.2
	Wat160 O	3.12	0
	Wat56 O	2.76	0
<b>O3</b>	Glu672 OE1	2.68	121.5
	Gly675 N	3.09	146.5
	Ser674 N	3.13	174.1
<b>O4</b>	Gly675 N	2.87	129.2
	Wat22 O	2.60	0
<b>O6</b>	Asn484 ND2	2.75	152.3
	His377 ND1	2.76	177.8
<b>O7</b>	Wat21 O	3.07	0
	Wat160 O	2.88	0
<b>O8</b>	Asp339 OD2	2.83	145.2
<b>N2</b>	Asp283 OD2	2.78	147.6
<b>S1</b>	His377 O	3.21	110.0
<b>Σύνολο</b>	<b>17</b>		

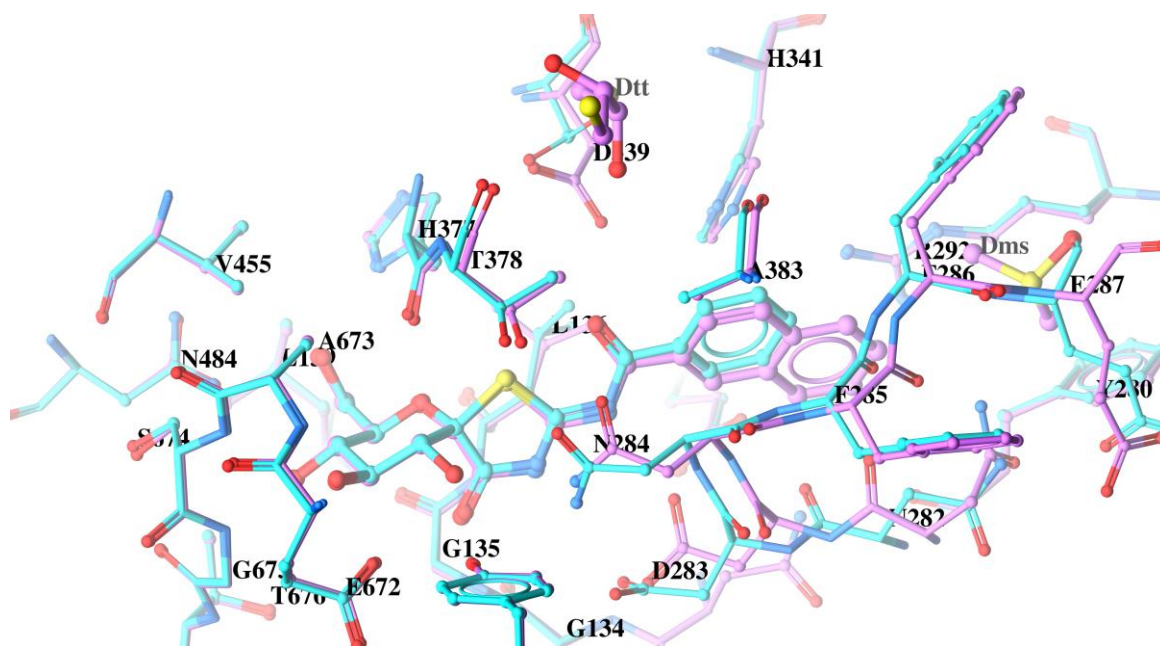
Πίνακας 12: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση CK421 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της RMGPb

<b>O2</b>	<b>...Wat56 O</b>	...Thr378 OG1 ...Thr671 O ...Ala673 N <b>...Wat55 O</b>	...VI379 N ...Thr671 O <b>...Wat54 O</b>	...Gly670 O <b>...Wat53 O</b>
<b>O4</b>	<b>...Wat22 O</b>	...Thr676 OG1		
<b>O7</b>	<b>...Wat21 O</b>	...Gly135 N ...Asp283 OD1 <b>...Wat20 O</b>	...PLP680 OP2 ...Arg569 N	
		<b>...Wat160 O</b>		

Πίνακας 13: Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης CK421 και των αμινοξέων και των νερών του καταλυτικού κέντρου της RMGPb.

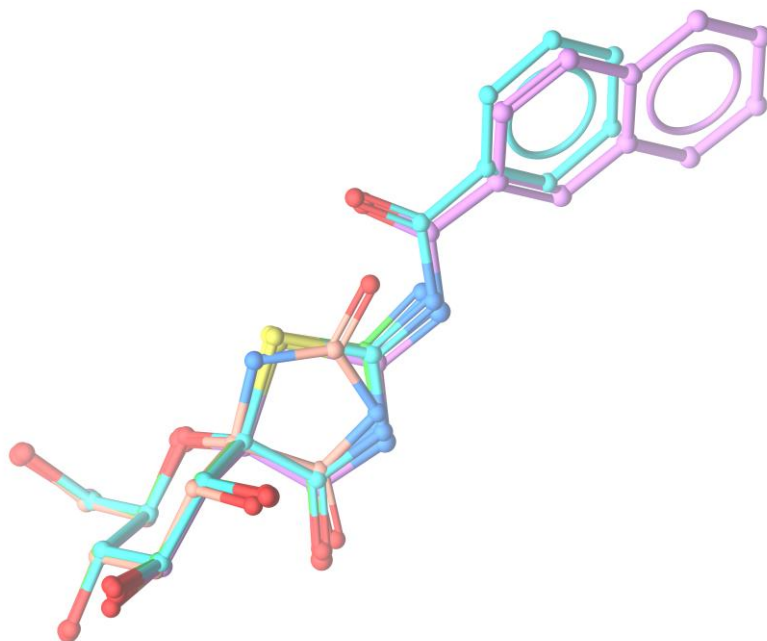
Ατομο αναστολέα	Άτομο πρωτεΐνης/διαλύτη	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
C1	His377 O	1
C2	His377 O; Glu672 OE1; Wat160 O; Wat56 O	4
C3	Glu672 OE1; Gly675 N; Wat22 O; Wat160 O	4
C4	Gly675 N; Wat22 O	2
C5	Gly135 C; Leu136 N; Wat22 O	3
C6	Gly135 O; Leu139 CD2; His377 ND1; Asn484 ND2	4
C7	Leu136 N; Wat21 O; Wat160 O	3
C8	Leu136 CB; Asn284 ND2; Asp283 OD2	3
C9	Asp283 OD2; Asn284 OD1,N; Asp339 OD2	4
C10	Asp283 OD2; Asp339 OD2; His341 CE1; Asn284 N,CA	5
C11	Asp283 OD2; Asn284 N; His341 CE1	3
C12	Asn284 N; His341 CE1; Wat121 O	3
C13	Glu88 OE1; Asn133 ND2; Asn282 O; Wat121 O	4
C14	Tyr280 O; Asn282 O; Arg292 NH2, NH1, CZ; Wat121 O	6
C15	Arg292 CZ, NH2; Asn282 ND2, O; Wat151 O; Dms991 C1	6
C16	Asn282 O; Arg292 NH2; Phe285 O; Dms991 C1; Wat151 O	5
C17	His341 CE1, NE2; Asn282 O	3
C18	His341 NE2; Wat123 O; Asn284 N	3
C19	Asn284 CA, N; Asp339 OD2; His341 NE2; Wat123 O	5
O2	His377 O	1
O3	Ser674 CA, C; Gly675 CA; Glu672 CG, CD, C; Ala673 CA, CB, N; Wat56 O	10
O4	Gly675 C, O, CA; Asn484 ND2; Ser674 N, CB, C	7
O5	Leu136 CA, CB, N; His377 ND1, CB, O	6
O6	Leu139 CD2; His377 CB, CG, CE1; Val455 CG1, CG2, CB; Asn484 CG	8
O7	Gly135 N, CA, C; Leu136 N; Wat22 O	5
O8	Asp339 CG; Asn284 OD1; Thr378 CG2	3
N1	Leu136 CB, N; Asn284 ND2; Asp283 OD2; Wat21 O; Wat153 O; Wat160 O	7
N2	Asn284, ND2, CG, N; Asp283 CG	4

S1	His377 CB,C,O; Thr378 CB	4
Σύνολο		126



Σχήμα 33: Υπέρθηση των κρυσταλλικών δομών των *RMGPb* ως συμπλόκου με την CK421 (μβ) και της *RMGPb*:CK418 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών MolSoft [63].

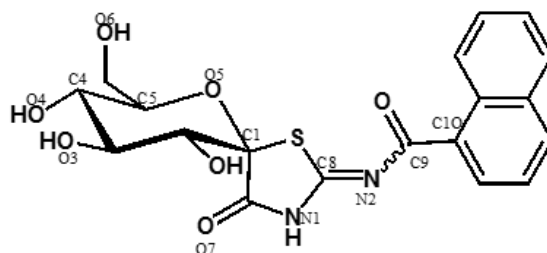
Υπέρθηση και των τριών νέων συμπλόκων στη δομή της σπειρο-υδαντοΐνης έδειξε ότι ενώ η θέση της γλυκόζης διατηρείται οι προσδέτες διαφοροποιούνται στο σημείο εισαγωγής των νέων υποκαταστατών.

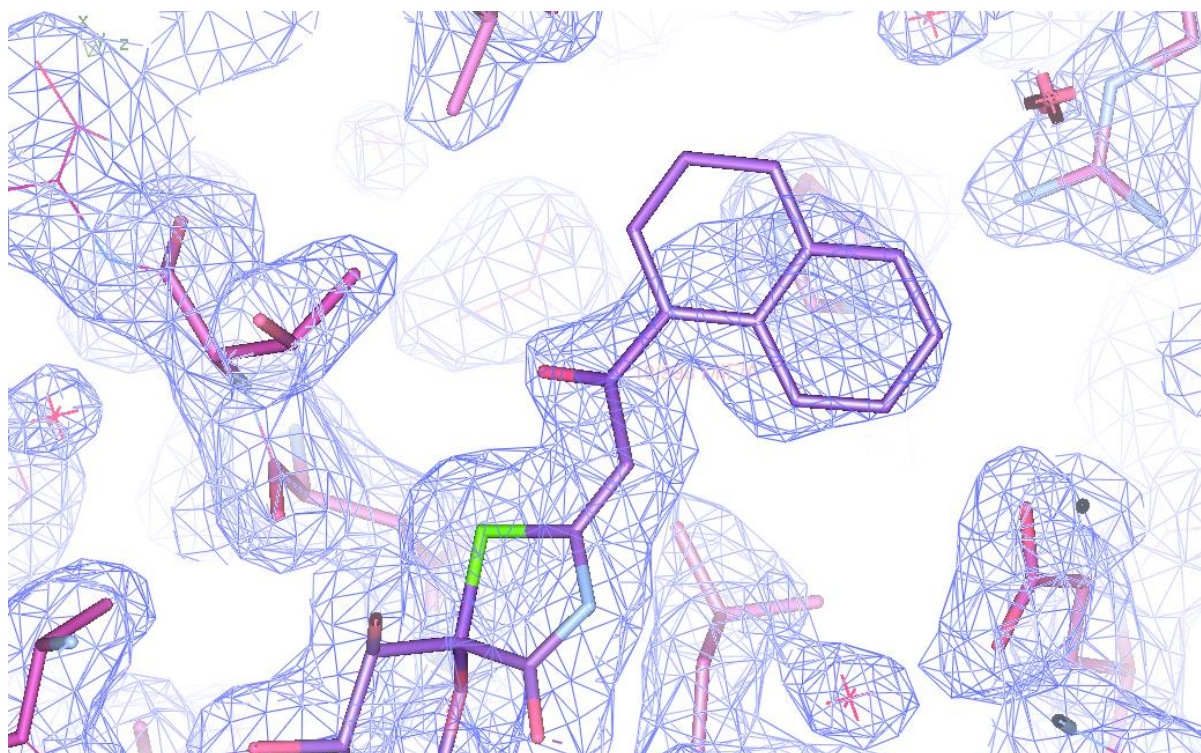


Σχήμα 34. Σχηματική αναπαράσταση σύγκρισης των CK417, CK418 και CK421.

#### Δ. Ένωση CK422.

Στην περίπτωση της ένωσης **CK422** η ομάδα ναφθυλίου αντικαθίσταται από την 1-ναφθυλομάδα. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα υψηλής ευκρίνειας συλλέχθηκαν και για αυτήν την ένωση. Ο υπολογισμός χαρτών διαφοράς 2Fo-Fc ηλεκτρονιακής πυκνότητας έδειξε πρόσθετη πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου η οποία όμως δεν φαίνεται να αντιστοιχεί στον 1-νάφθυλο υποκαταστάτη Σχήμα 35.





**Σχήμα 35.** Η ένωση CK422 στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου μετά τον πρώτο κύκλο βελτιστοποίησης[64].

**Πίνακας 14.** Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης CK422 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb.

<b>Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων</b>	
Πείραμα	Κρύσταλλοι T-διαμόρφωσης GPb εμπλαπίζονται σε διάλυμα αναστολέα με συγκέντρωση 20mM σε 10% DMSO για 4.5 ώρες
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	Daresbury PX10.1,16-19/11/2007
Μήκος κύματος (Å)	0.97976
Απόσταση (mm)	160
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.8
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	80
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2



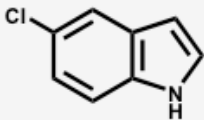
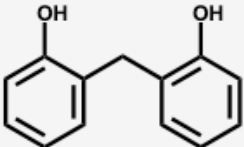
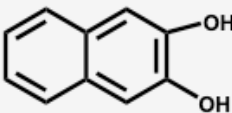
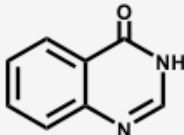
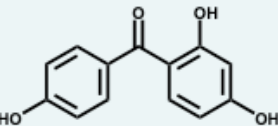
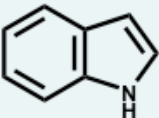
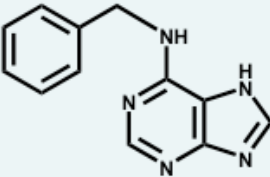
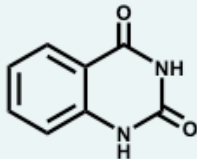
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128.0 Å, c=116.5 Å α=β=γ=90°
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	30.0-1.94
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	840625
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	71490 (3474)
R <sub>merge</sub> <sup>a</sup> (εξωτερική στοιβάδα)	0.054 (0.465)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	98.2 (97.1)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.97.-1.94
<I /σ(I) > (εξωτερική στοιβάδα)	26.3 (4.6)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	5.3 (5.0)
Τιμή του παράγοντα θερμ/σίας B (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot)	31.1

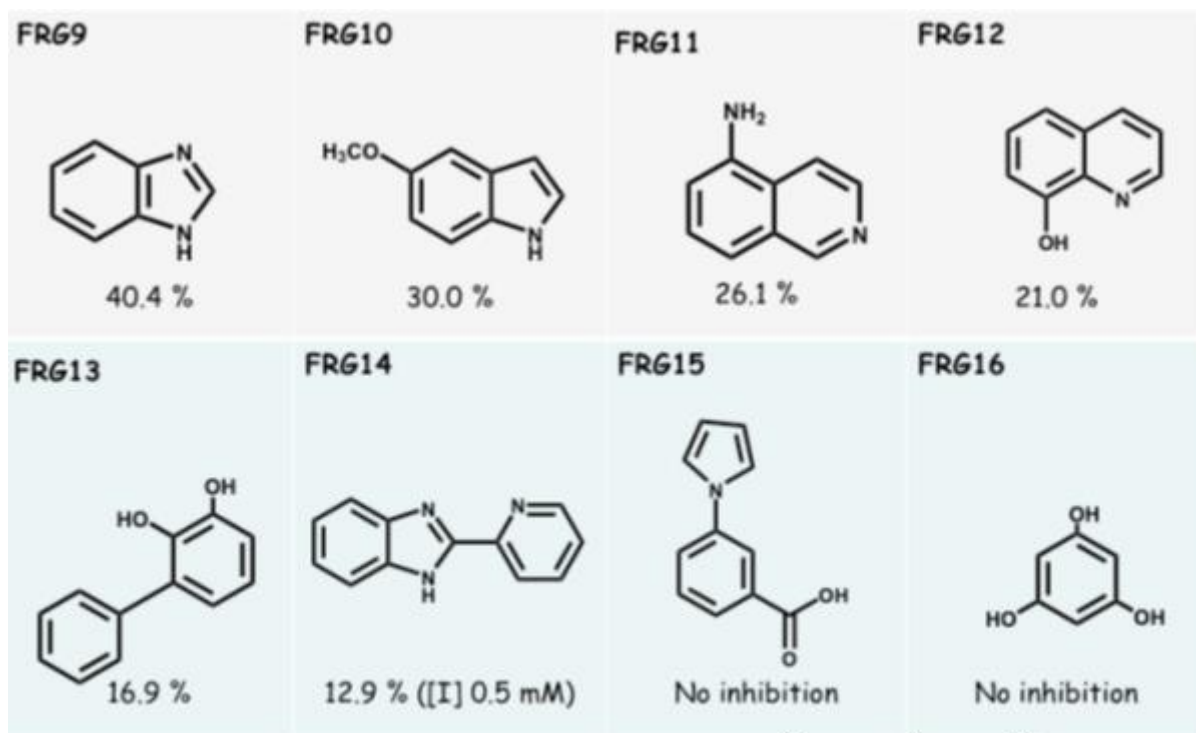
<sup>a</sup> $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$ , όπου  $\langle I_h \rangle$  και  $I_{ih}$  είναι η μέση και η  $i^{\text{th}}$  μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων  $h$ , αντιστοίχως. <sup>b</sup> $\sigma(I)$  είναι η τυπική απόκλιση  $I$ . <sup>c</sup>Κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας  $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως.  $R_{\text{free}}$  είναι η αντίστοιχη τιμή  $R$  value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στη βελτιστοποίηση.

Μετά από προσωπική επικοινωνία με τον Prof. Somsak και περαιτέρω αξιολόγηση της ποιότητας των ενώσεων που είχαν συντεθεί διαπιστώθηκε ότι τόσο το NMR όσο και το LC-MS δεν έδιναν ικανοποιητικά αποτελέσματα για την καθαρότητα της ένωσης. Έτσι αν και είχαν ήδη πραγματοποιηθεί κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες, αποφασίσθηκε να μην συνεχιστεί ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου μέχρι να συντεθεί εκ νέου η ένωση CK422 σε υψηλή καθαρότητα.

## 5.2 Δομικές μελέτες για θραύσματα οργανικών μορίων προερχόμενα από υπάρχοντες αναστολείς

Σκοπός των μελετών που αφορούν σε θραύσματα γνωστών αναστολέων είναι η αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων αυτών με τα αμινοξέα στο κέντρο σύνδεσης και στη συνέχεια η αξιοποίηση της πληροφορίας αυτής για το σχεδιασμό δυνάμει αναστολέων με μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης. Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες θραυσμάτων οργανικών ενώσεων ως συμπλόκων με τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου είχαν ήδη πραγματοποιηθεί για μια σειρά ενώσεων στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (σχήμα 36). Οι ενώσεις αυτές είναι εμπορικά διαθέσιμες και είχαν σταλεί από τους Dr Isabelle Krimm και Prof. Jean-Marc Lancelin από το Laboratoire des Sciences Analytiques, Université de Lyon, Université de Claude Bernard, Lyon 1, Domaine Scientifique de la Doua, Villeurbanne της Γαλλίας. Η έρευνα που αφορούσε σε αυτές τις ενώσεις είχε διεξαχθεί από την κα Αικατερίνη Χατζησταματίου, MSc στο πλαίσιο της εργασίας της για την απόκτηση διπλώματος ειδίκευσης στη βιοχημεία υπό την επίβλεψη της Δρ Ε. Χρυσίνα (ΕΙΕ) και με κύρια υπεύθυνη την καθ. Α. Σιαφάκα-Καπάδα (ΕΚΠΑ). Έμφαση είχε δοθεί στην αξιολόγηση των θραυσμάτων με κινητικά πειράματα και για κάποια από αυτά είχαν γίνει και δομικές μελέτες.

<p><b>FRG1</b></p>  <p><math>53.7 \pm 0.8</math></p>	<p><b>FRG2</b></p>  <p><math>117.6 \pm 6.5</math></p>	<p><b>FRG3</b></p>  <p><math>294.0 \pm 9.3</math></p>	<p><b>FRG4</b></p>  <p><math>467.0 \pm 0.7</math></p>
<p><b>FRG5</b></p>  <p><math>502.2 \pm 15.9</math></p>	<p><b>FRG6</b></p>  <p><math>638.9 \pm 24.8</math></p>	<p><b>FRG7</b></p>  <p><math>874.5 \pm 27.9</math></p>	<p><b>FRG8</b></p>  <p>41.6% inhibition in 1mM</p>
<p>IC50 σε <math>\mu\text{M}</math></p>			

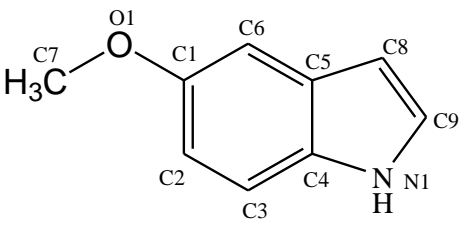
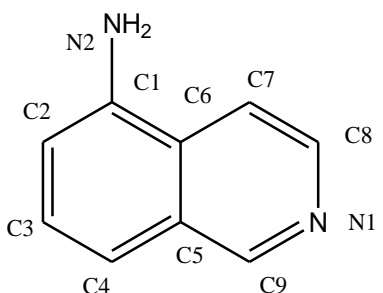
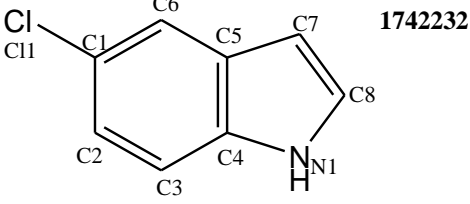
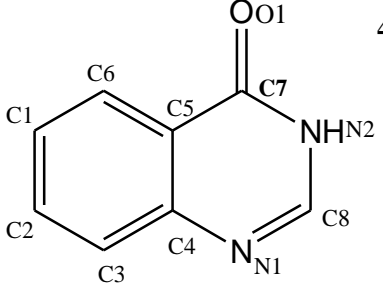
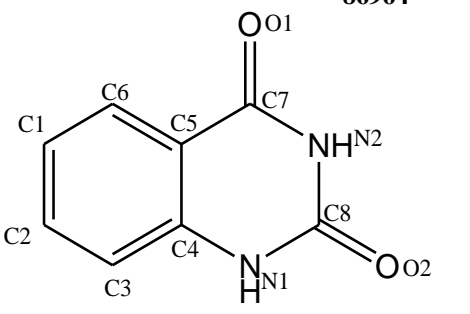


Το ποσοστό αναστολής αναφέρεται σε συγκέντρωση ίση με 1 mM

**Σχήμα 36.** Χημικές δομές και κινητικά αποτελέσματα για τα θραύσματα που μελετήθηκαν.

Στην παρούσα εργασία, τα θραύσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 15 χρησιμοποιήθηκαν για δομικές μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί ο τρόπος σύνδεσης αυτών στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου αν και η αναστολή που προκάλεσαν στη δράση του ενζύμου δεν υποδεικνύει ισχυρή σύνδεση αυτών πλην ενός θραύσματος.

**Πίνακας 15 :** Θραύσματα οργανικών ενώσεων που μελετήθηκαν δομικά. Υποδεικνύεται ο τρόπος αρίθμησης των επί μέρους ατόμων.

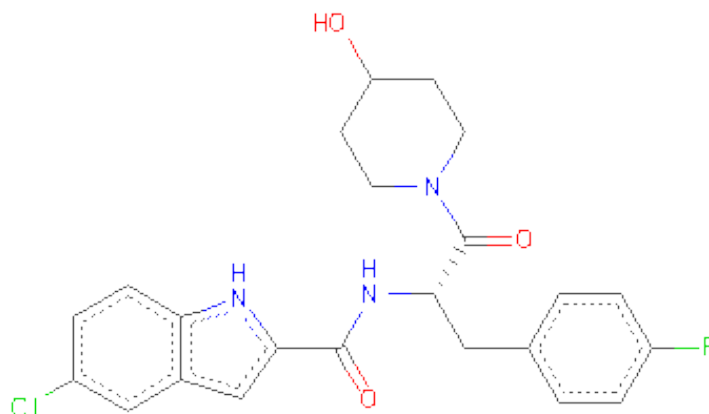
<p style="text-align: right;"><b>1006946</b></p> 	<p style="text-align: right;"><b>1125606</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>5-μεθόξυ-ινδόλιο</b></p> <p style="text-align: center;"><b>30.0% αναστολή στο 1mM</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>5-αμινο-ισοκινολίνη</b></p> <p style="text-align: center;"><b>26.1% αναστολή στο 1mM</b></p>
<p style="text-align: right;"><b>17422321</b></p> 	<p style="text-align: right;"><b>491361</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>5-χλωρο-ινδόλιο</b></p> <p style="text-align: center;"><b>IC<sub>50</sub> = 53.7 ± 0.8 μ M</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>4-υδροξυ-κιναζολίνη</b></p> <p style="text-align: center;"><b>IC<sub>50</sub> = 467.0 ± 0.7 μ M</b></p>
<p style="text-align: right;"><b>86964</b></p> 	
<p style="text-align: center;"><b>Βενζυλενουρία</b></p> <p style="text-align: center;"><b>41.6% αναστολή στο 1mM</b></p>	

Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο σταθμό συγχροτρονικής ακτινοβολίας PETRA III, στο σταθμό εργασίας P14 στο EMBL, Αμβούργο Γερμανίας κάτω από τις εξής συνθήκες : κρύσταλλοι T-διαμόρφωσης GPb εμβαπτίζονται σε διάλυμα αναστολέα συγκέντρωσης 20 Mm σε 20 % DMSO. Ο προσδιορισμός της τριδιάστατης δομής του συμπλόκου πραγματοποιήθηκε στο IBΦXB/EIE υπό την επίβλεψη της Δρ Ευαγγελίας Χρυσίνα.

Ειδικότερα:

Τα μελετώμενα θραύσματα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες σύμφωνα με το κέντρο σύνδεσης του ενζύμου στο οποίο συνδέονται α) θραύσματα που συνδέονται στο κέντρο αναστολής (5-αμινο-ισοκινολίνη, 4-υδροξυ-κινολίνη, βενζυλενουρία) και β) θραύσματα που συνδέονται στο νέο αλλοστερικό κέντρο (5-μεθοξυ-ινδόλιο, 5-χλωρο-ινδόλιο)

Όσον αφορά στα θραύσματα που στόχο είχαν το νέο αλλοστερικό κέντρο χρησιμοποιήθηκε η ένωση CP320626 η οποία οδήγησε και στην ανακάλυψη αυτού (PDB code: 1C8K) [96]



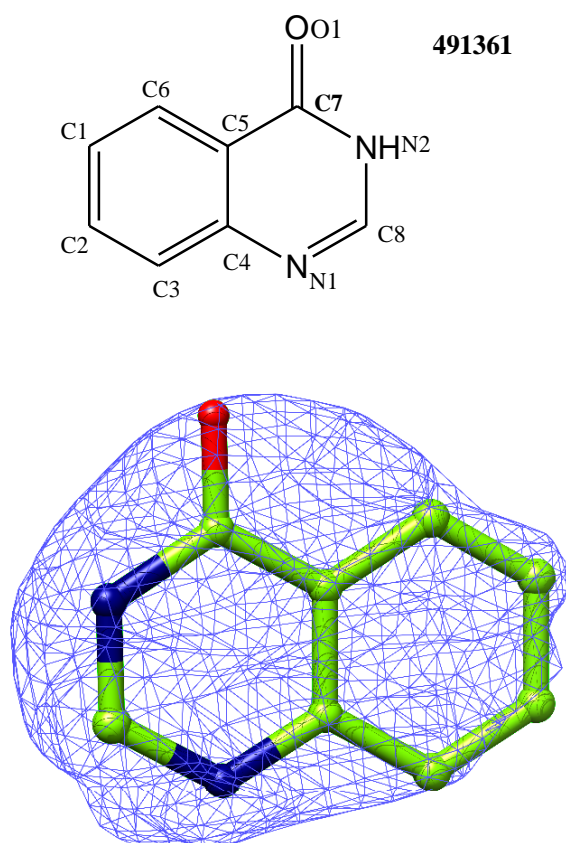
Σχήμα 37. Η ένωση CP320626

Συγκεκριμένα, το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην κεντρική κοιλότητα μεταξύ των δύο συμμετρικών υπομονάδων του ενζύμου και βρίσκεται 15 Å μακριά από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο

αναστολής. Για το σχηματισμό αυτού συμμετέχουν αμινοξέα από την κάθε υπομονάδα του διμερούς, τα οποία αλληλεπιδρούν με την ένωση.

#### A. 491361 (FRG4)

Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου RMGP*b*:491361 σε ευκρίνεια 2.19 Å έδειξε ότι η ένωση συνδέεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου (Σχήμα 39).



Σχήμα 38. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o-F_c$  του θραύσματος 491361 (FRG4) στο κέντρο αναστολής της RMGP*b* σε 1σ. Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>].

Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων του θραύσματος με τα αμινοξέα που συνθέτουν το κέντρο αναστολής περιλαμβάνει έναν μόνο δεσμό υδρογόνου μεταξύ του ατόμου του οξυγόνου του αναστολέα και του νερού 168 του διαλύτη και 62 Van der Waals

αλληλεπιδράσεις. Αυτές συνοψίζονται στους Πίνακες 17-19 και σχηματικά αποτυπώνονται στο Σχήμα 40.

**Πίνακας 16. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGPb:491361.**

<b>Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων</b>	
Πείραμα	Κρύσταλλοι T-διαμόρφωσης GPb εμβαπτίζονται σε διάλυμα αναστολέα με συγκέντρωση 20 Mm σε 20 % DMSO για 94.5 ώρες.
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	EMBL,P14,10-12-2012*
Μήκος κύματος (Å)	1.25953
Απόσταση (mm)	228.951
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.1°
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	597
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128,54, c=116,29 α=β=γ=90°
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	86.23 -2.19
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	218965 (31790)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	47897 (6952)
R <sub>merge</sub> <sup>a</sup> (εξωτερική στοιβάδα)	0.068 (0.548)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	95.6 (96.0)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.31 -2.19
<I /σ(I) > (εξωτερική στοιβάδα)	16.4 (3.6)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	4.6 (4.6)
Τιμή του παράγοντα θερμ/σίας B (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot)	44.5
<b>Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου</b>	
Ευκρίνεια (Å)	71.61-2.19
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 5%)	45428 (2457)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	(12-251)(261-314)(324-836)
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6749
Αριθμός μορίων ύδατος	188
Αριθμός ετεροατόμων	11(FRG4)4(DMSO)24(PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R (R <sub>free</sub> )	0.17002(0.20910)
R (R <sub>free</sub> ) (εξωτερική στοιβάδα)	0.253(0.289)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.006
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	1.031

Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα: Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O): Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	40.6 38.5 42.6
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα ετεροάτομα	71.3(DMSO) 51.6(FRG4) 27.5(PLP)
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα μόρια ύδατος	39.0

<sup>a</sup> $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$ , όπου  $\langle I_h \rangle$  και  $I_{ih}$  είναι η μέση και η  $i^{\text{th}}$  μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων  $h$ , αντιστοίχως. <sup>b</sup> $\sigma(I)$  είναι η τυπική απόκλιση  $I$ . <sup>c</sup>Κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας  $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως.  $R_{\text{free}}$  είναι η αντίστοιχη τιμή  $R$  value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στη βελτιστοποίηση.

**Πίνακας 17: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 491361 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο κέντρο αναστολής της RMGPb.**

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
O1	Wat168 O	2.78	0.0
<b>Σύνολο</b>		1	

**Πίνακας 18: Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση 491361 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του κέντρου αναστολής της RMGPb**

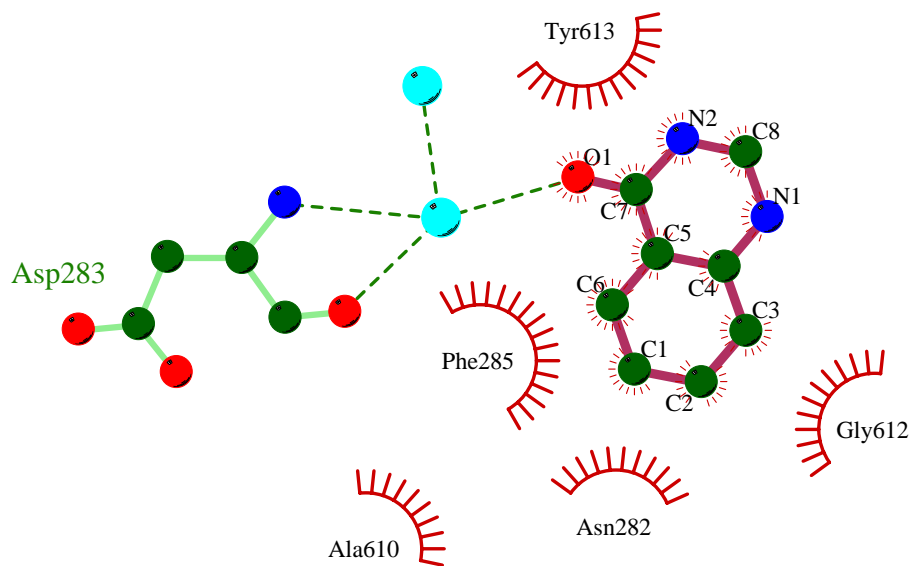
O1	...Wat168 O	...Asp283 N	
		...Asp283 O	
		...Wat169 O	...Arg569 NH1
			...Ile570 O



		...Ala610 N
--	--	-------------

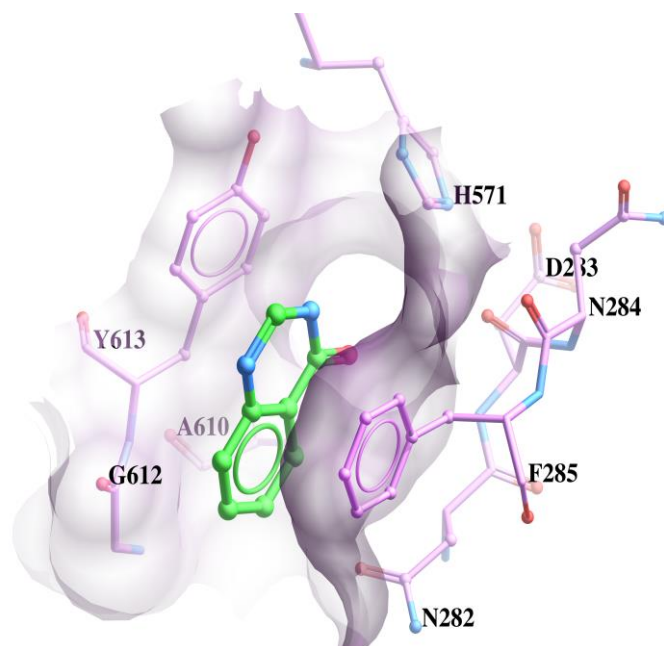
Πίνακας 19. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 491361 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο κέντρο αναστολής της RMGPb.

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
<b>C1</b>	Phe285 CD2,CE2;Asn282 OD1; Gly612 C	4
<b>C2</b>	Phe285 CE2;Tyr613 N;Gly612 C,O,CA	5
<b>C3</b>	Phe285 CZ,CE2;Gly612 C,O	4
<b>C4</b>	Phe285 CE1,CZ,CE2,Tyr613 CB,CG	5
<b>C5</b>	Phe285 CG,CD1,CD2,CE2;Tyr613 CB,CG	6
<b>C6</b>	Phe285 CG,CD2,CE2;Asn282 OD1;Ala610 CB;Tyr613 CB	6
<b>C7</b>	Phe285 CB,CG,CD1,CD2;Wat168 O;Tyr613 CE2,CB,CG,CD2	9
<b>C8</b>	Phe285 CD1,CE1;Tyr613 CE1,CZ,CG,CD1	6
<b>N1</b>	Phe285 CE1,CZ;Tyr613 CD1	3
<b>N2</b>	Phe285 CG,CD1,CE1;Tyr613 CE1,CZ,CE2,CG,CD1,CD2	9
<b>O1</b>	Phe285 CB,CG,CD1;Tyr CE2,CD2	5
<b>Σύνολο</b>		62



**Σχήμα 39. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων του θραύσματος 491361 FRG4 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT* [62]**

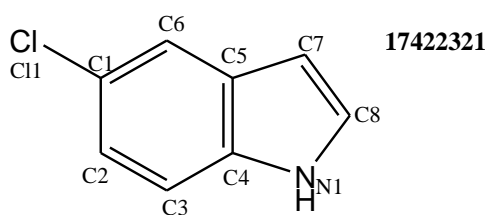
Ο προσανατολισμός της ένωσης μεταξύ των δύο αρωματικών δακτυλίων του κέντρου αναστολής απεικονίζεται στο σχήμα 40. Οι χαρακτηριστικές αλληλεπιδράσεις επιστοίβασης π-π (π-π stacking interactions) που σχηματίζονται είναι ανάλογες αυτών που παρατηρούνται σε όσες ενώσεις συνδέονται σε αυτό το κέντρο όπου ο επίπεδος δακτύλιος της ένωσης που προσδέεται διατάσσεται μεταξύ των δύο αρωματικών δακτυλίων των αμινοξέων Phe285 και Tyr613.

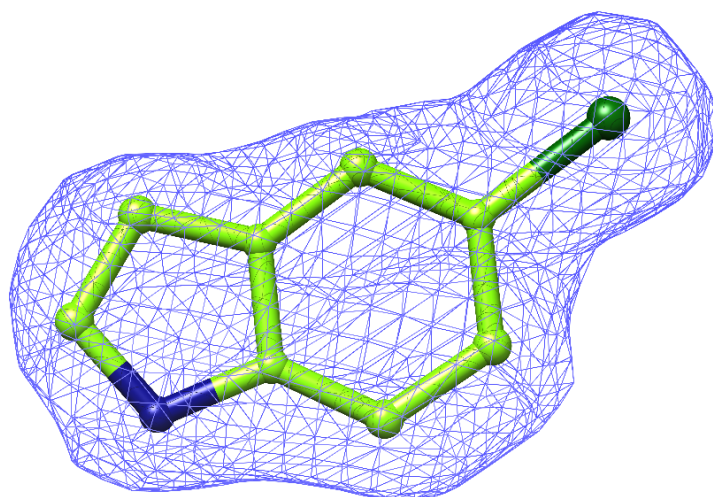


Σχήμα 40: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του θραύσματος 491361 FRG4 στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών MolSoft [63].

### B.17422321(FRG1)

Η τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου RMGP*b*:17422321 αποκάλυψε ότι η ένωση συνδέεται στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου όπως υπέδειξε ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o - F_c$ .





**Σχήμα 41** Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o - F_c$  του θραύσματος 17422321 (FRG1) στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGPb σε 1σ. Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>].

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται μεταξύ των δύο συμμετρικών υπομονάδων του ενζύμου και σχηματίζεται από αμινοξέα τόσο της μίας όσο και της άλλης υπομονάδας. Τα αμινοξέα που είναι καθοριστικής σημασίας για την πρόσδεση των ενώσεων στο κέντρο είναι τα αμινοξέα Arg60, Trp67, Pro190 τα οποία δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον για την πρόσδεση ενώσεων με έντονο αρωματικό χαρακτήρα όπως ενώσεις που φέρουν ομάδες ναφθυλίου [65].

Η τριδιάστατη δομή του ενζύμου ως συμπλόκου με την ένωση 17422321 προσδιορίστηκε σε ευκρίνεια 2.03 Å με χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας ακτίνων Χ (Πίνακας 20).

**Πίνακας 20.** Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGPb 17422321.

<b>Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων</b>	
Πείραμα	Κρύσταλλοι T-διαμόρφωσης GPb εμβαπτίζονται σε διάλυμα αναστολέα με συγκέντρωση 20 Mm σε 20 % DMSO για 95.25 ώρες.

Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	EMBL,P14,10-12-2012*
Μήκος κύματος (Å)	1.25953
Απόσταση (mm)	228.951
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.1°
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	882
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128,73 c=116,27 α=β=γ=90°
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	86.29 -2,03
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	408248 (59658)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	62462 (8955)
R <sub>merge</sub> <sup>a</sup> (εξωτερική στοιβάδα)	0.054 (0.548)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	98.6 (98.0)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.14 -2.03
<I /σ(I) > (εξωτερική στοιβάδα)	19.6 (3.8)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	6.5 (6.7)
Τιμή του παράγοντα θερμ/σίας B (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot)	37.2
<b>Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου</b>	
Ευκρίνεια (Å)	86.29-2.03
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 5%)	59279 (3159)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	(12-251)(261-314)(324-836)
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6556

Αριθμός μορίων ύδατος	175
Αριθμός ετεροατόμων	10(FRG1) 4(CO <sub>3</sub> ) 4(ACY)24(PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R (R <sub>free</sub> )	0.17387(0.20612)
R (R <sub>free</sub> ) (εξωτερική στοιβάδα)	0.262(0.291)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	1.023
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα: Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O): Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	42.9 40.8 45.0
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα ετεροάτομα	56.5(ACY) 57(CO <sub>3</sub> ) 39.3(FRG1) 30.4(PLP)
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα μόρια ύδατος	42.3

<sup>a</sup> $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$ , όπου  $\langle I_h \rangle$  και  $I_{ih}$  είναι η μέση και η  $i^{\text{th}}$  μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων  $h$ , αντιστοίχως. <sup>b</sup> $\sigma(I)$  είναι η τυπική απόκλιση  $I$ . <sup>c</sup>Κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας  $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως.  $R_{\text{free}}$  είναι η αντίστοιχη τιμή  $R$  value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στη βελτιστοποίηση.

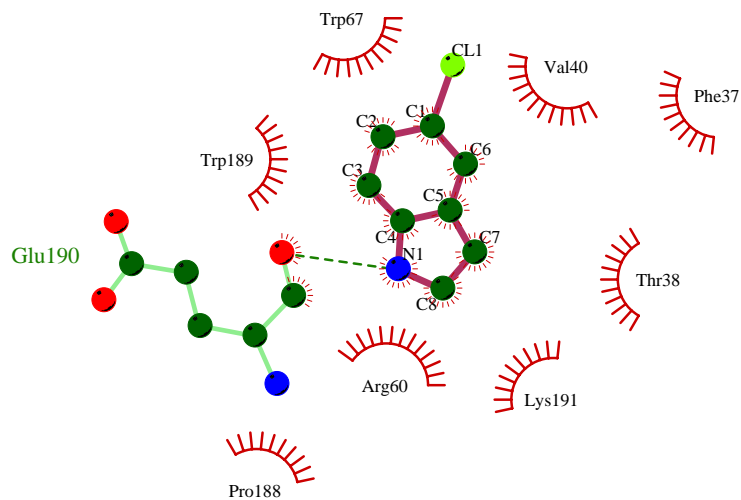
Κατά την πρόσδεση του θραύσματος στο νέο αλλοστερικό κέντρο σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του ατόμου του αζώτου του αναστολέα και ατόμου του οξυγόνου του αμινοξέως Glu190. Επιπλέον αναπτύσσονται 49 Van der Waals αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της υπομονάδας απ' όπου προέρχεται ο προσδέτης αλλά και 6 αλληλεπιδράσεις με τη συμμετρική. Οι αλληλεπιδράσεις συνοψίζονται στους Πίνακες 21-22 και στο Σχήμα 42.

Πίνακας 21: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 17422321 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGPb.

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (ο)
N1	Glu190 O	3.11	120.0
<b>Σύνολο</b>		1	

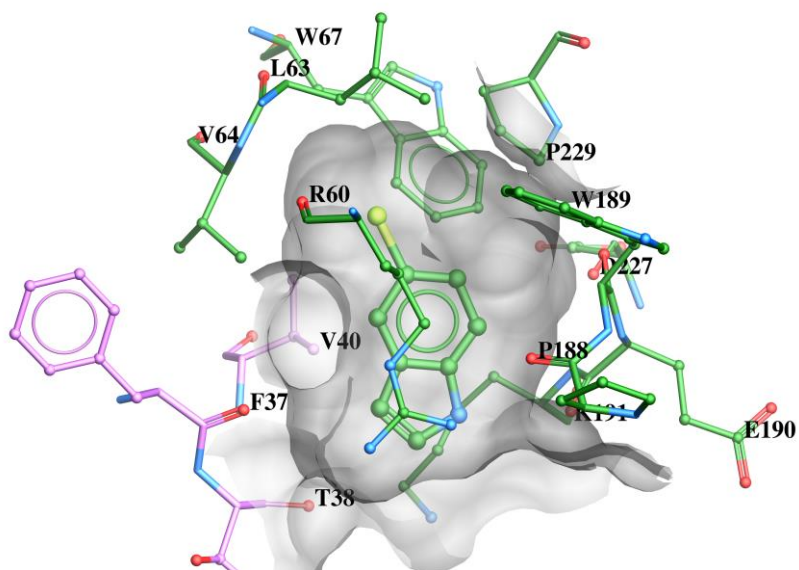
Πίνακας 22. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 17422321 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGPb.

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
<b>C1</b>	Trp67 CZ3;Arg60 CG,CD	3
<b>C2</b>	Trp67 CZ3; Arg60 CG, CD	3
<b>C3</b>	Arg60 CD; Pro188 O;Trp189 C,O;Glu190 N,C,O; Lys191 N	8
<b>C4</b>	Arg60 CD,NE,NH1,CZ ;Pro188 O;Glu190 O;Lys191 CB	7
<b>C5</b>	Arg60 CD,NE,NH1,CZ; Val40' CG2	4
<b>C6</b>	Arg60 CG,CD,NE;Wat178 O; Val40' CG2	4
<b>C7</b>	Arg60 NE,NH1,CZ,NH2; Val40' CG2;Phe37' O; Thr38' O	4
<b>C8</b>	Arg60 CZ,NH1;NH2;Lys191 CD; Thr38' O	4
<b>N1</b>	Arg60 NH1,CZ;Glu190 C,;Lys 191 CA,CB,CD	6
<b>CL1</b>	Arg60 O,CG;Val64 CG2;Leu63 CB;Trp67 CE3,CZ3	6
<b>Σύνολο</b>		55



**Σχήμα 42.** Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων του θραύσματος 17422321 FRG1 κατά τη σύνδεσή του στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT* [62]

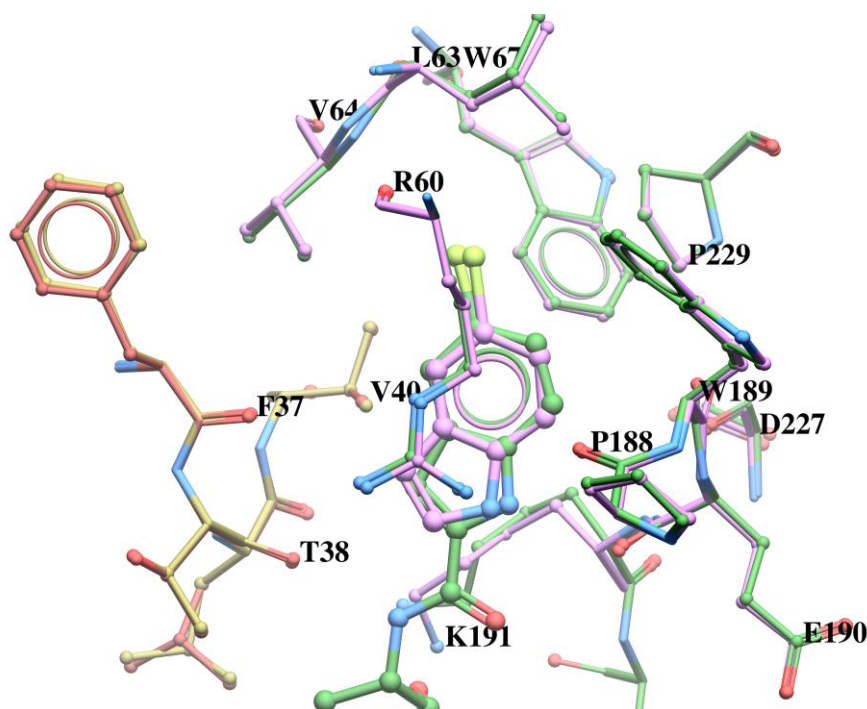
Ο τρόπος πρόσδεσης του θραύσματος στο νέο αλλοστερικό κέντρο παρουσιάζεται στο Σχήμα 43





**Σχήμα 43:** Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του θραύσματος 17422321 FRG1 στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται τα αμινοξέα της υπομονάδος που προέρχεται ο αναστολέας ενώ με μωβ τα αμινοξέα της συμμετρικής υπομονάδος. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών MolSoft [63].

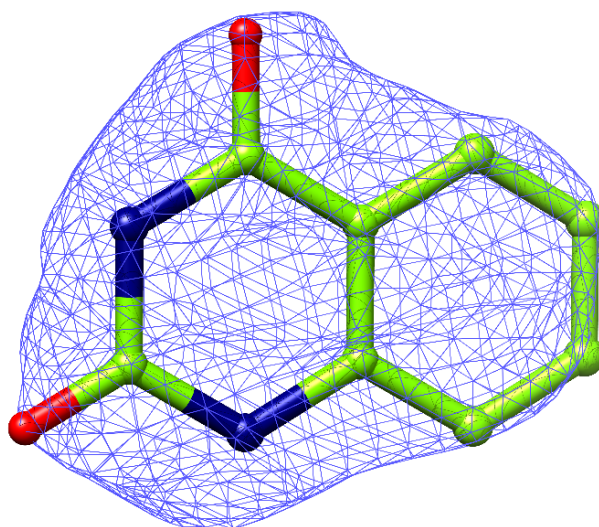
Σύγκριση της δομής του θραύσματος 17422321 ως συμπλόκου με το ένζυμο με αυτήν της ένωσης CP320626 έδειξε ότι το θραύσμα συνδέεται ακριβώς στην ίδια θέση και προσανατολισμό όπως και η πρόδρομος ένωση αυτού (Σχήμα 44). Τα δε αμινοξέα που συνθέτουν το νέο αλλοστερικό κέντρο (τόσο από τη μία όσο και από τη συμμετρική υπομονάδα) δεν αλλάζουν κατά τη σύνδεση του θραύσματος. Επίσης, η αναστολή που επιδεικνύει το θραύσμα είναι της τάξης των  $\mu\text{M}$ , αρκετά ικανοποιητική έναντι της ένωσης CP320626 δίνοντας έμφαση στη δυνατότητα σύνθεσης νέων παραγώγων τα οποία θα αποτελούνται μόνο από τα σημαντικά για τη σύνδεση τμήματα του αναστολέα.



**Σχήμα 44.** Υπέρθωση των τριδιάστατων δομών του θραύσματος 17422321 με την ένωση CP320626 ως συμπλόκων με την *RMGPb*. Με μώβ χρώμα απεικονίζεται η δομή της *RMGPb*:17422321 και με πράσινο η δομή της *RMGPb*:CP320626. Τα αμινοξέα της συμμετρικής υπομονάδος υποδεικνύονται με πορτοκαλί και ελαφρώς κόκκινο χρώμα [<http://www.idf.org/diabetesatlas>].

## Γ. 86964 (FRG8)

Η μελέτη της ένωσης 86964 ως συμπλόκου με το ένζυμο έδειξε ότι αυτή συνδέεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου όπως υπέδειξε ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o-F_c$ . (Σχήμα 45) Τα στατιστικά στοιχεία που αφορούν στη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων συνοψίζονται στον Πίνακα 23.



Σχήμα 45. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o-F_c$  του θραύσματος 86964 (FRG8) στο κέντρο αναστολέστης RMGPb σε  $1\sigma$ . Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>].

Πίνακας 23. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGPb:86964.

<b>Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων</b>	
Πείραμα	Κρύσταλλοι T-διαμόρφωσης GPb εμβαπτίζονται σε διάλυμα αναστολέα με συγκέντρωση 20 Mm σε 20 % DMSO για 94 ώρες.
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	EMBL,P14,10-12-2012

Μήκος κύματος (Å)	1.25953
Απόσταση (mm)	228.951
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.1°
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	849
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128,45, c=116,24 α=β=γ=90°
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	116.24 -1.8
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	508635 (73211)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	79197 (11199)
R <sub>merge</sub> <sup>a</sup> (εξωτερική στοιβάδα)	0.042 (0.375)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	97.1 (95.4)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.96 -1.86
<I /σ(I) > (εξωτερική στοιβάδα)	238 (5.1)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	6.4 (6.5)
Τιμή του παράγοντα θερμ/σίας B (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot)	26.5
<b>Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου</b>	
Ευκρίνεια (Å)	86.19 – 1.8
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 5%)	82752 (4378)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	(12-251)(261-314)(324-836)
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6563
Αριθμός μορίων ύδατος	269

Αριθμός ετεροατόμων	12(FRG8),15(PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R ( $R_{free}$ )	0.17184 (0.19669)
R ( $R_{free}$ ) (εξωτερική στοιβάδα)	0.258 (0.274)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	0.959
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα: Άτομα κύριας αλυσίδας (Cα,C,N,O): Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	33.396 31.669 35.066
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα ετεροάτομα	59.392(frag86964) , 22.067(PLP)
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα μόρια ύδατος	38.16

<sup>a</sup> $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$ , όπου  $\langle I_h \rangle$  και  $I_{ih}$  είναι η μέση και η  $i^{\text{th}}$  μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων  $h$ , αντιστοίχως. <sup>b</sup> $\sigma(I)$  είναι η τυπική απόκλιση  $I$ . <sup>c</sup>Κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας  $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως.  $R_{free}$  είναι η αντίστοιχη τιμή  $R$  value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στη βελτιστοποίηση.

Πιο συγκεκριμένα το θραύσμα 86964 προσδένεται στο κέντρο αναστολής με ανάλογο τρόπο με αυτόν του θραύσματος 491361, σχηματίζοντας αλληλεπιδράσεις επιστοίβασης με τα αμινοξέα Phe285 και Tyr613. Κατά τη σύνδεση σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου, ο ένας εκ των οποίων μεταξύ του ατόμου του οξυγόνου 1 του αναστολέα και ατόμου του νερού Wat162 O. Ο δεύτερος αναπτύσσεται μεταξύ του ατόμου O2 του αναστολέα και του Wat203 O (Πίνακας 24-25). Επιπρόσθετα, η πρόσδεση του θραύσματος στο κέντρο αναστολής ευνοείται από το σχηματισμό 72 Van der Waals αλληλεπιδράσεων με το μόριο στόχο (Πίνακας 26) (Σχήματα 46-47).

Πίνακας 24. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 89964 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο κέντρο αναστολής της RMGPb

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
O1	Wat162 O	2.61	0.0
O2	Wat203 O	3.28	0.0
<b>Σύνολο</b>		2	

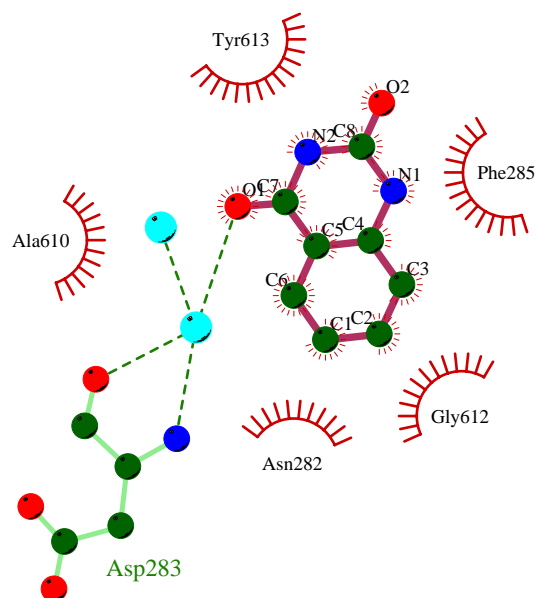
Πίνακας 25. Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση 86964 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του κέντρου αναστολής της RMGPb.

O1	...Wat162 O	...Asp283 N	
		...Asp283 O	
		...Wat161 O	...Ile570 O
			...Ala 610 N
O2	...Wat203 O	...Asn282 OD1	
		...Gly612 N	

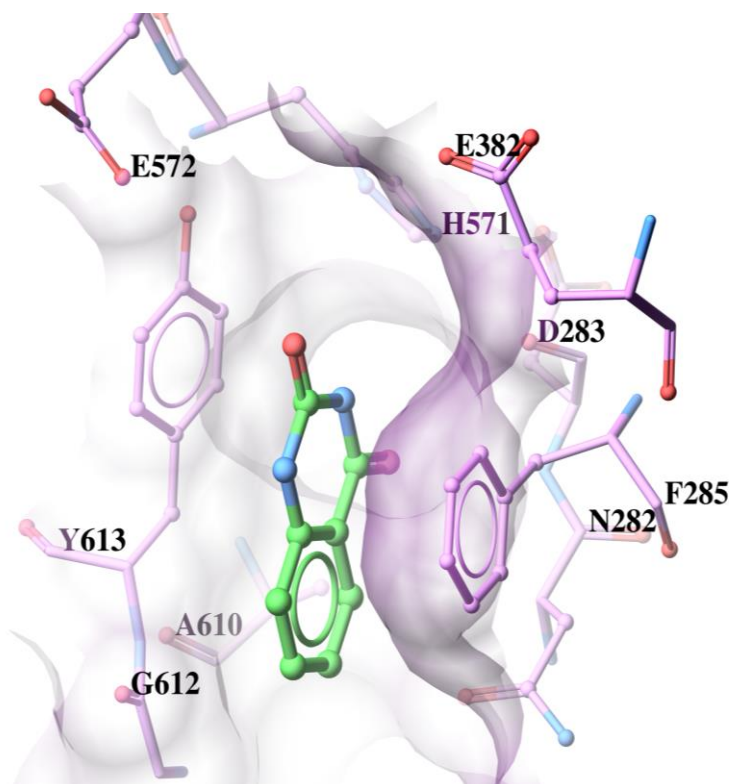
Πίνακας 26. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 86964 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο κέντρο αναστολής της RMGPb.

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
<b>C1</b>	Phe285 CD1; Tyr613 CE1, CZ, OH, CD1, CE2, CD2	7
<b>C2</b>	Phe285 CE1; Tyr613 N, CE1,	3
<b>C3</b>	Phe285 CE1, CZ, Tyr613 CD1	3
<b>C4</b>	Phe285 CD1, CZ, CE1, CE2 ; Tyr613 CB, CG, CD1	7

<b>C5</b>	Phe285 CG , CD1 , CD2, CE1, CB; Tyr613 CB, CG, CD2	8
<b>C6</b>	Phe285 CG, CD1, CE1;Tyr613 CZ, CG, CE2, CD2	7
<b>C7</b>	Phe285 CB, CG, CD1, CD2 ; Ala610 CB; Tyr613 CB, CG ,CD2;Wat162 O,	9
<b>C8</b>	Phe285 CD2 , CE2; Tyr613 N, CA;Gly612 O, C	6
<b>N1</b>	Phe285 CE2, CZ ; Tyr613 CA;Gly612 O, C	5
<b>N2</b>	Wat203 O;Asn282 OD1;Phe285 CD2, CG, CE2;Ala610 CB;Tyr613 CB	7
<b>O1</b>	Phe285 CB, CG, CD2; Ala610 CB; Tyr613 CD2	5
<b>O2</b>	Tyr613 N;Gly612 N, CA, O, C	5
<b>Σύνολο</b>		72



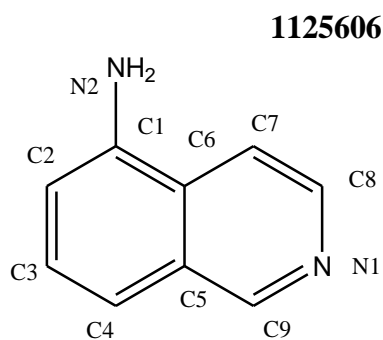
**Σχήμα 46.** Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων του θραύσματος 86964 FRG8 κατά τη σύνδεσή της στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT* [62]

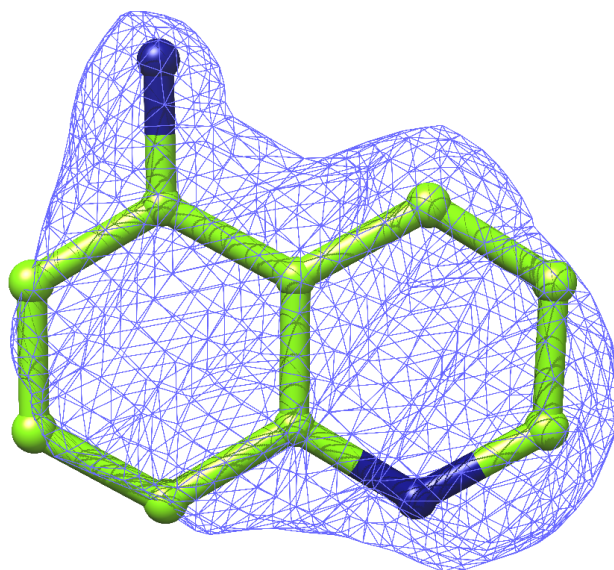


Σχήμα 47. Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του θραύσματος 86964 FRG4 στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών MolSoft [63].

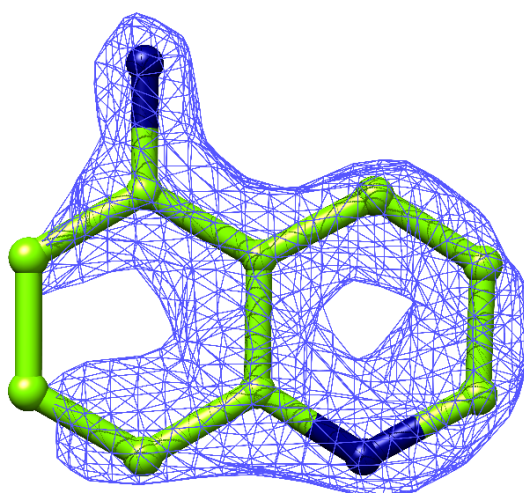
#### Δ. 1125606 (FRG11)

Η τριδιάστατη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου RMGPb:1125606 προσδιορίστηκε σε ευκρίνεια 1.62 Å. Ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o - F_c$  έδειξε ότι η ένωση συνδέεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου αλλά και στο νέο αλλοστερικό κέντρο. Ωστόσο στο τελευταίο η σύνδεση φαίνεται να είναι ασθενέστερη (Σχήματα 48-49).





**Σχήμα 48.** Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o-F_c$  του θραύσματος 1125606 FRG11 στο κέντρο αναστολής της RMGPb σε 1σ. Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>].



**Σχήμα 49.** Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o-F_c$  του θραύσματος 1125606 FRG11 στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGPb σε 1σ. Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>].

Συγκεκριμένα, δημιουργείται ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα που απαρτίζουν το νέο αλλοστερικό κέντρο και το κέντρο αναστολής. Ειδικότερα, για το νέο



αλλοστερικό κέντρο σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου. Ο ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του ατόμου του αζώτου 1 του αναστολέα και ατόμου του οξυγόνου του αμινοξέως Glu190 και ο άλλος μεταξύ του ατόμου του αζώτου 2 του αναστολέα και του οξυγόνου του νερού 161. Επιπλέον, αναπτύσσονται 60 Wan der Vaals αλληλεπιδράσεις με το μόριο στόχο. Όσον αφορά στο κέντρο αναστολής αναπτύσσονται 53 Wan der Vaals αλληλεπιδράσεις με το μόριο στόχο οι οποίες αποικονίζονται στο Σχήμα 50.

**Πίνακας 27. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGPb:1125606.**

<b>Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων</b>	
Πείραμα	Κρύσταλλοι T-διαμόρφωσης GPb εμβαπτίζονται σε διάλυμα αναστολέα με συγκέντρωση 20 Mm σε 20 % DMSO για 190 ώρες.
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	EMBL, P14, 10-12-2012*
Μήκος κύματος (Å)	1.25953
Απόσταση (mm)	228.951
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.1°
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	900
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128,47, c=116,18 α=β=γ=90°
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	86,17 -1.62
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	759271 (75381)

Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	119987 (15668)
$R_{\text{merge}}^a$ (εξωτερική στοιβάδα)	0.067 (1.342)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	98.2 (88.8)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.71 -1.62
$\langle I / \sigma(I) \rangle$ (εξωτερική στοιβάδα)	14.2 (1.4)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	6.3 (4.8)
Τιμή του παράγοντα θερμ/σίας B (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot)	26.1
<b>Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου</b>	
Ευκρίνεια (Å)	56.21-1.76
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 5%)	86995 (4645)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	(12-251)(254-314)(324-836)
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6569
Αριθμός μορίων ύδατος	247
Αριθμός ετεροατόμων	4(DMS) 4(ACY) 22(FRG11) 24(PLP))
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R ( $R_{\text{free}}$ )	0.17947(0.20041)
R ( $R_{\text{free}}$ ) (εξωτερική στοιβάδα)	0.276(0.279)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	0.956
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> )	
Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα:	34.1
Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O):	32.4
Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	35.7

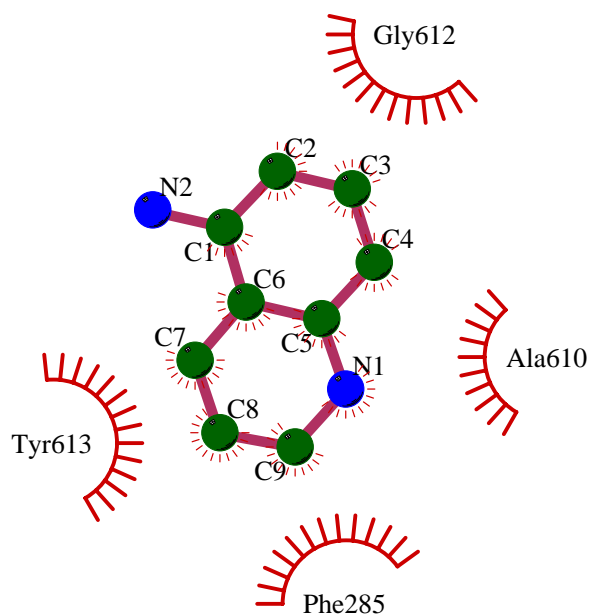
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα ετεροάτομα	60.9(DMSO) 59.7(ACY) 44.2(FRG11) 22(PLP)
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα μόρια ύδατος	37.5

<sup>a</sup> $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_{ih}$ , όπου  $\langle I_h \rangle$  και  $I_{ih}$  είναι η μέση και η  $i^{\text{th}}$  μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων  $h$ , αντιστοίχως. <sup>b</sup> $\sigma(I)$  είναι η τυπική απόκλιση  $I$ . <sup>c</sup>Κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας  $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως.  $R_{\text{free}}$  είναι η αντίστοιχη τιμή  $R$  value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στην βελτιστοποίηση.

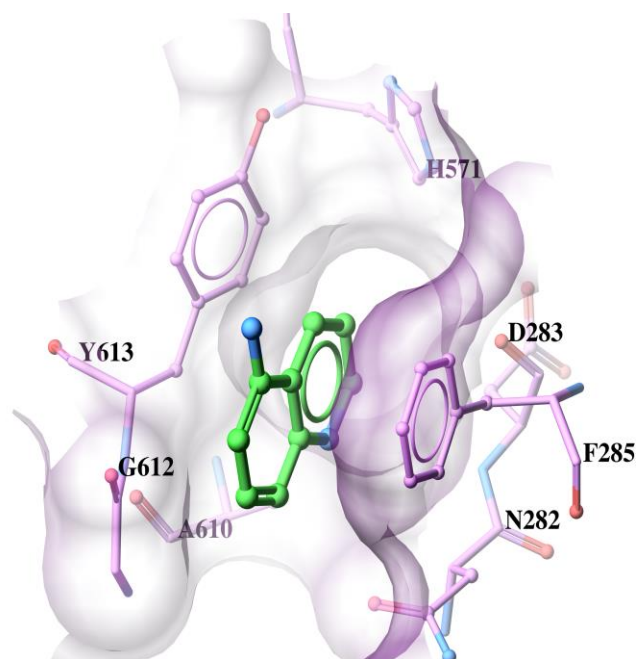
**Πίνακας 28. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 1125606 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο κέντρο αναστολής της RMGPb.**

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
<b>C1</b>	Phe285 CE1,CZ	2
<b>C2</b>	Phe285 CZ;Gly612 C,O	3
<b>C3</b>	Phe285 CE2;Gly612 C,CA,O	4
<b>C4</b>	Phe285 CD2,CE2;Gly612 C,O;Tyr613 N;Wat193 O	6
<b>C5</b>	Phe285 CG,CD2,CE2;Tyr613 CB	
<b>C6</b>	Phe285 CG,CD1,CD2,CE1,CZ,CE2;Tyr613 CB,CG	8
<b>C7</b>	Phe285 CG,CD1,CE1;Tyr613 CE1,CE2,CG,CD1,CD2	8
<b>C8</b>	Phe285 CB,CG,CD1;Wat154 O;Tyr613 CE2,CG,CD2	7

<b>C9</b>	Phe285 CB,CG,CD2;Wat154 O;Ala610 CB;Tyr613 CG,CD2	7
<b>N1</b>	Phe285 CB,CG,CD2;Wat154 O,Asn282 OD1;Ala610 CB;Tyr613 CB	7
<b>N2</b>	Phe285 CE1	1
<b>Σύνολο</b>		53



**Σχήμα 50. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων του θραύσματος 1125606 FRG11 κατά τη σύνδεσή της στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με, πράσινες διακεκομμένες γραμμές, οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT* [62]**



Σχήμα 51: Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του θραύσματος 1125606 FRG11 στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών MolSoft [63].

Πίνακας 29: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 1125606 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGPb

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
N1	Glu190 O	3.16	114.7
N2	Wat161 O	3.09	0.0
<b>Σύνολο</b>		<b>2</b>	

Πίνακας 30. Δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει η ένωση 1125606 μέσω μορίων ύδατος με αμινοξέα του νέου αλλοστερικού κέντρου της RMGPb.

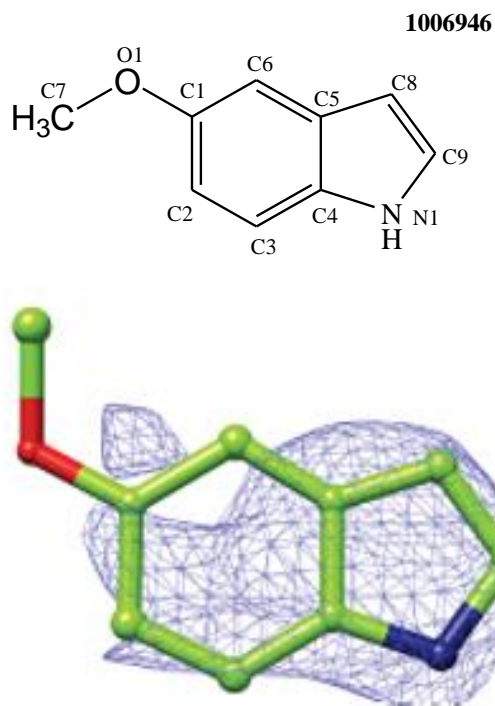
N2	...Wat161 O	...Asp61 OD1
		...Phe37' O

Πίνακας 31. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 1125606 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο αναστολής της RMGPb

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
<b>C1</b>	Arg60 CG,CD,NE; Wat161 O	4
<b>C2</b>	Arg60 CG;Trp67 CZ3; Pro229 CG	3
<b>C3</b>	Trp67 CZ3;Trp189 C,O,CA; Pro188 O; Pro229 CD,CG	7
<b>C4</b>	Trp189 CA,C,O; Glu190 N,C,O;Pro188 O	7
<b>C5</b>	Arg60 NE,CZ,NH2; Glu190 O; Pro188 O	5
<b>C6</b>	Arg60 CG,CD,NE,CZ; Val 40' CG	5
<b>C7</b>	Arg 60 CD,NE,CZ,NH1; Wat161 O;Val40' CG2; Phe37' O	7
<b>C8</b>	Arg 60 CZ,NH1;Val40' CG2;Phe37' O;Thr38' O	5
<b>C9</b>	Arg60 CZ,NH1,NH2; Lys191 CD;Thr38' O	5
<b>N1</b>	Arg60 NE,CZ,NH1,NH2;Pro188 O;Glu190 C;Lys191 CB,CD	8
<b>N2</b>	Arg60 CD,CG,O;Val64 CG2	4
<b>Σύνολο</b>		60

#### E.1006946(FRG10)

Η τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου RMGPb:1006946 αποκάλυψε ότι η ένωση συνδέεται στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου όπως υπέδειξε ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o - F_c$ .



**Σχήμα 52.** Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o-F_c$  του θραύσματος 1006946 στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGPb σε 1σ. Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>].

Συγκεκριμένα, δημιουργείται ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα που απαρτίζουν το νέο αλλοστερικό κέντρο. Ειδικότερα σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του ατόμου του αζώτου 1 του αναστολέα και του αζώτου του αμινοξέως Arg60, ο οποίος ωστόσο αν και πληροί τις προϋποθέσεις που αφορούν στην απόσταση σχηματισμού ενός δεσμού υδρογόνου δεν αποτυπώνεται από τα προγράμματα μοριακών γραφικών λόγω της θεωρητικής θέσης υδρογόνων που χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση αυτών. Επιπλέον αναπτύσσονται 57 Wan der Vaals αλληλεπιδράσεις με το μόριο στόχο (Πίνακας 33-34, Σχήμα 53).

Πίνακας 32. Στατιστικά στοιχεία συλλογής και επεξεργασίας κρυσταλλογραφικών δεδομένων και βελτιστοποίησης του συμπλόκου RMGPb1006946.

<b>Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων</b>	
Πείραμα	Κρύσταλλοι T-διαμόρφωσης GPb εμβαπτίζονται σε διάλυμα αναστολέα με συγκέντρωση 20 mM σε 20 % DMSO για 122 ώρες.
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	EMBL,P14,10-12-2012*
Μήκος κύματος (Å)	1.25953
Απόσταση (mm)	228.951
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.1
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων (°)	899
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας	a=b=128,45, c=116,24 α=β=γ=90°
Αριθμός μορίων / ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	116.24 -1.8
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	588635 (84807)
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (εξ. στοιβάδα)	87165 (12319)
R <sub>merge</sub> <sup>a</sup> (εξωτερική στοιβάδα)	0.046 (0.548)
Πληρότητα (εξωτερική στοιβάδα) (%)	97.0 (95.1)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	1.9 -1.8
<I /σ(I) > (εξωτερική στοιβάδα)	21.9 (3.8)
Πολλαπλότητα (εξωτερική στοιβάδα)	6.8 (6.9)
Τιμή του παράγοντα θερμ/σίας B (Å <sup>2</sup> ) (Wilson plot)	
<b>Βελτιστοποίηση και ποιότητα μοντέλου</b>	
Ευκρίνεια (Å)	64.26-1.98
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (free, 5%)	64394(3408)
Αμινοξέα που συμπεριελήφθησαν	(12-251)(261-314)(325-836)
Αριθμός ατόμων πρωτεΐνης	6557
Αριθμός μορίων ύδατος	245
Αριθμός ετεροατόμων	11(FRG10) 24(PLP) 5(PO4)4 (DMS)4 (CO <sub>3</sub> )
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R (R <sub>free</sub> )	0.16848(0.19322)
R (R <sub>free</sub> ) (εξωτερική στοιβάδα)	0.236(0.258)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) μήκους δεσμών (Å)	0.005
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) γωνίας δεσμών (°)	1.027
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> )	
Όλα τα πρωτεϊνικά άτομα:	36.3
Άτομα κύριας αλυσίδας (Ca,C,N,O):	34.4
Άτομα πλευρικής αλυσίδας:	38.1



Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα ετεροάτομα	58.4(PO <sub>4</sub> ) 51.8(DMSO) 51.2(CO <sub>3</sub> ) 60.4(FRG10) 24.7(PLP)
Μέση τιμή του παράγοντα θερμοκρασίας B (Å <sup>2</sup> ) για τα μόρια ύδατος	39.3

<sup>a</sup> $R_m = \sum_i \sum_h | \langle I_h \rangle - I_{ih} | / \sum_i \sum_h I_h$ , όπου  $\langle I_h \rangle$  και  $I_{ih}$  είναι η μέση και η  $i^{\text{th}}$  μέτρηση της έντασης των περιθλάσεων  $h$ , αντιστοίχως. <sup>b</sup> $\sigma(I)$  είναι η τυπική απόκλιση  $I$ . <sup>c</sup>Κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας  $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ , όπου  $|F_o|$  και  $|F_c|$  είναι το εύρος του παρατηρούμενου και υπολογιζόμενου παράγοντα δομής, αντιστοίχως.  $R_{\text{free}}$  είναι η αντίστοιχη τιμή  $R$  value για τυχαία επιλογή 5 % των περιθλάσεων οι οποίες δεν συμπεριελήφθησαν στη βελτιστοποίηση.

**Πίνακας 33. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της ένωσης 1006946 και των αμινοξέων και μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGPb.**

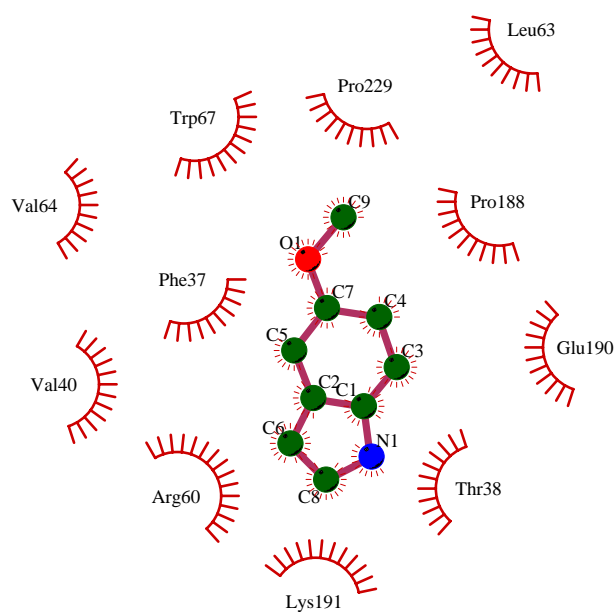
Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
N1	Arg60 NH1	3.24	
<b>Σύνολο</b>	<b>1</b>		

Σημείωση: Αν και ο παραπάνω δεσμός υδρογόνου δεν αποτυπώνεται στις αλληλεπιδράσεις που υπολογίζονται από τη θεωρητική θέση των ατόμων υδρογόνου τόσο με το πρόγραμμα CONTACT (CCP4, 1994) όσο και με το πρόγραμμα LigPlus [62] παρατίθεται λόγω απόστασης.

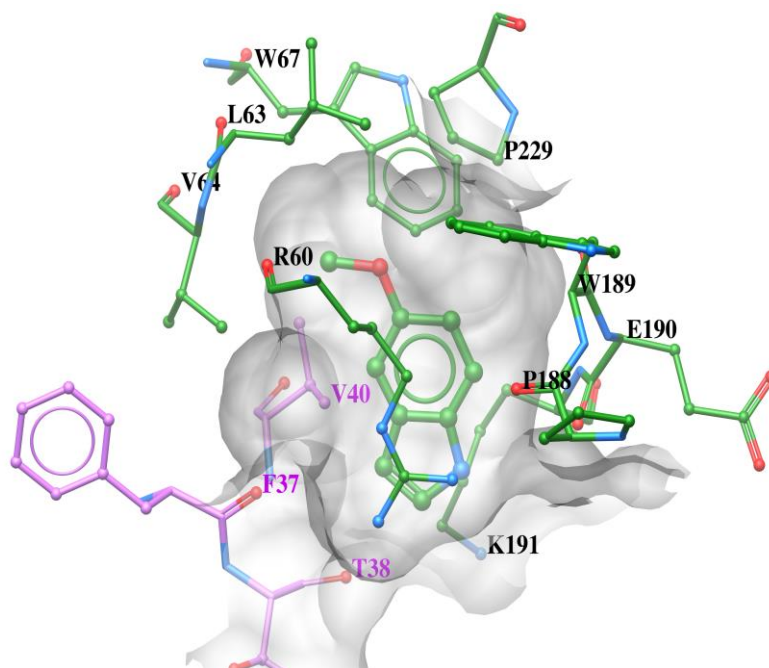
**Πίνακας 34. Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης 1006946 και των αμινοξέων και των μορίων ύδατος στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGPb**

Άτομο αναστολέα	Άτομο στόχος	Αριθμός αλληλεπιδράσεων
<b>C1</b>	Glu190 O;Lys191 CB,CD;Arg60 CD,NE,CZ,NH1;Pro188 O	8
<b>C2</b>	Arg60 CD,NE,CZ,NH1,NH2;Wat222 O	6
<b>C3</b>	Trp189 C,Glu190 N,C,O;Lys191 N,CB;Arg60 CD,NH1;Pro188 O	9
<b>C4</b>	Trp67 CZ3;Arg60 CG,CD;Pro188 O	4
<b>C5</b>	Arg60 NE,CD,CG;Wat222 O	4

<b>C6</b>	Arg60 NH2,NH1,CZ,NE;Lys191 CD;Wat222 O	6
<b>C7</b>	Arg60 NE,CD,CG;Trp67 CZ3	4
<b>C8</b>	Arg60 CZ,NH1,NH2;Lys191 CD	4
<b>C9</b>	Trp67 CE3,CZ3;Leu63 CB;Arg60 O,CG;Val64 N,CA,CG2	8
<b>N1</b>	Arg60 NH2,CZ;Lys191 CD;Glu190 O	4
<b>Σύνολο</b>		<b>57</b>



**Σχήμα 53. Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου και van der Waals αλληλεπιδράσεων της ένωσης 1006946 FRG10 κατά τη σύνδεσή της στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Οι Van der Waals αλληλεπιδράσεις με κόκκινα ημικύκλια, τα δε μόρια ύδατος με κυανό. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα *LIGPLOT* [62]**



**Σχήμα 54:** Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης του θραύσματος 1006946 FRG10 στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Η εικόνα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών MolSoft [63].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

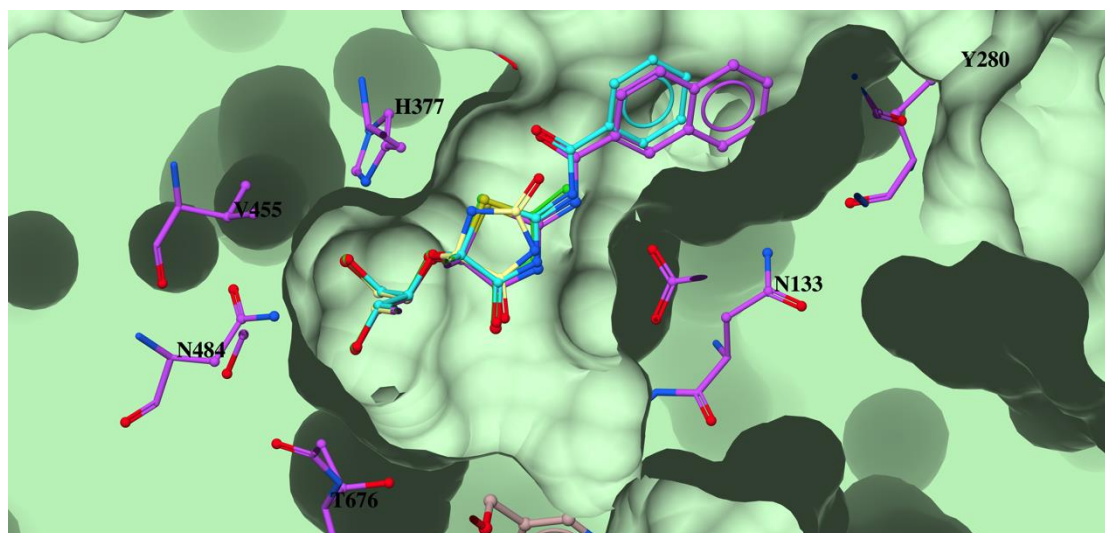
### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί ένα ένζυμο με εξέχουσα σημασία για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2, μιας και η βιολογική λειτουργία της ρυθμίζεται από ένα πολύπλοκο μηχανισμό ορμονών [32]. Ειδικότερα, τέσσερα από τα πέντε κέντρα σύνδεσης υποκαταστατών που έχουν ταυτοποιηθεί (καταλυτικό, αλλοστερικό, νέο αλλοστερικό και κέντρο αναστολής) αποτελούν στόχο για το σχεδιασμό δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Στόχος των ερευνών είναι, να ρυθμιστεί η λειτουργία της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μελετώντας ενώσεις με ισχυρή συγγένεια σύνδεσης σε ένα ή περισσότερα από τα διακριτά του κέντρα, παρέχοντας ισχυρή μεν αναστολή αλλά και εκλεκτικότητα για το μακρομοριακό στόχο ως προς αυτό προκειμένου να μειωθούν οι παρενέργειες που ταλαιπωρούν τους ασθενείς.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν ενώσεις με ισχυρή ανασταλτική δράση αλλά και θραύσματα ενώσεων με μέτρια αναστολή, οι οποίες είναι δυνατόν να μετατοπίζουν την ισορροπία αποικοδόμησης / σύνθεσης γλυκογόνου προς την κατεύθυνση της σύνθεσης και ως εκ τούτου να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στην αντιμετώπιση της νόσου ως δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα [32].

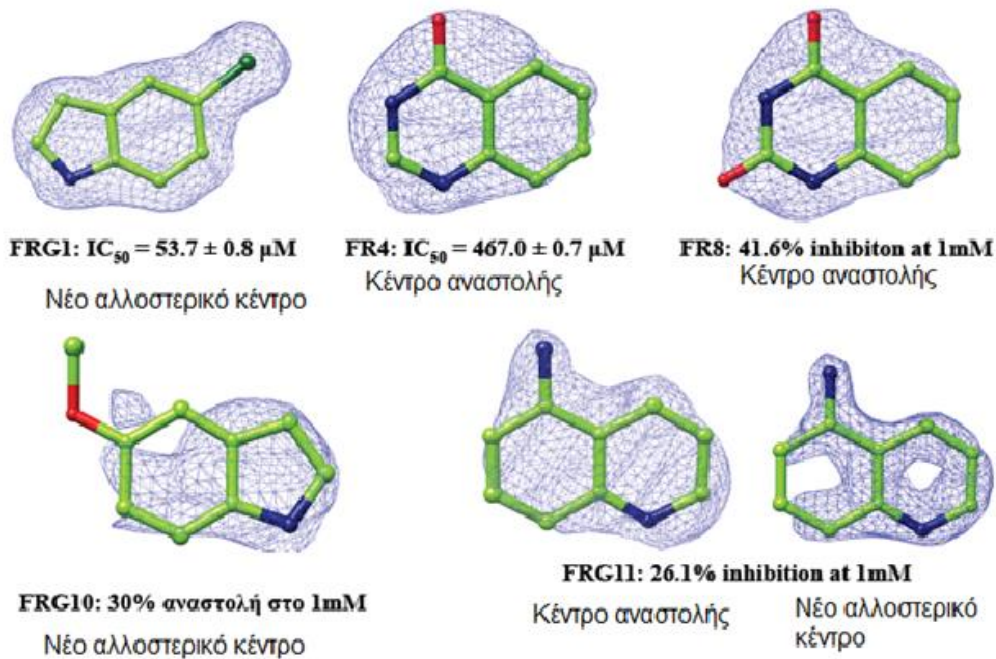
Οι πρώτες ενώσεις που είχαν στόχο το καταλυτικό κέντρο της *RMGPb* ήταν παράγωγα γλυκόζης τα οποία συνδέονταν κατά μήκος του β-καναλιού στο β-υποκέντρο. Συγκεκριμένα, τα παράγωγα γλυκόζης, τα οποία προέρχονται από υποκατάσταση της α-ανωμερικής θέσης του δακτυλίου και φέρουν το δακτύλιο της σπειροϋδαντοΐνης καθώς και παράγωγα αυτής με αρωματικούς ή φαινυλικούς δακτυλίους, παρουσίασαν σύνδεση στο καταλυτικό κέντρο της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αναστέλλοντας τη δράση της. Τη μεγαλύτερη παρεμπόδιση της *RMGPb* επέδειξε η ένωση CK421, η οποία έφερε την αρωματική ομάδα ναφθυλίου ως υποκαταστάτη, με τιμή  $IC_{50}$  7.1  $\mu$ M ενώ την ασθενέστερη η ένωση CK417. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η προσθήκη αρωματικών υποκαταστατών στο N2 του σπειρο- δακτυλίου, παρά την ογκοδέστερη ομάδα ναφθυλίου και το πιθανό ενεργειακό κόστος κατά τη σύνδεση αυτής, ευνοεί την ανασταλτική δράση της ένωσης. Πρέπει ωστόσο να ληφθεί υπ' όψιν ότι ευνοείται η

σύνδεση εφόσον οι αρωματικοί υποκαταστάτες προσανατολίζονται κατά μήκος του καταλυτικού κέντρου.



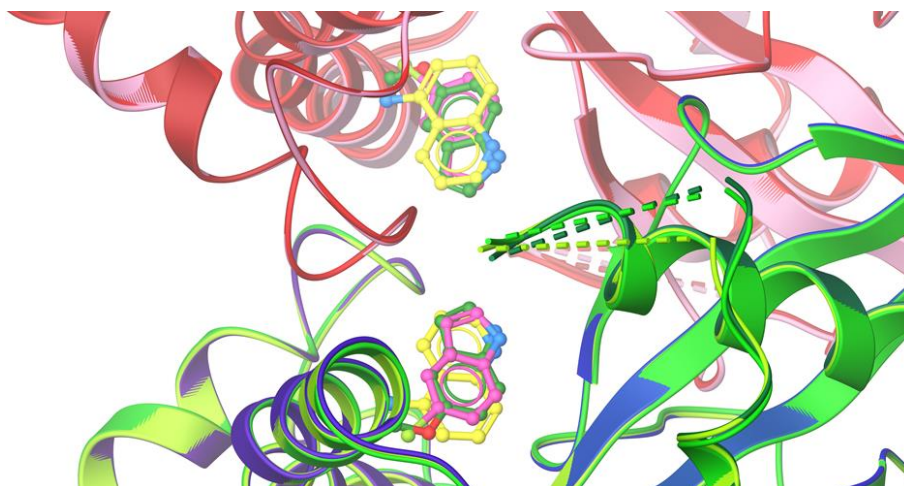
**Σχήμα 55.** Τομή (κατά μήκος του άξονα που βρίσκεται κάθετος στο επίπεδο της σελίδας από τον αναγνώστη προς το σχήμα) της επιφάνειας του καταλυτικού κέντρου της RMGPb όπου παρουσιάζεται ο τρόπος σύνδεσης των ενώσεων CKs κατά μήκος του ενεργού κέντρου. Παρατηρείται ότι η θέση του δακτυλίου της γλυκοπυρανόζης διατηρείται ενώ οι αρωματικοί υποκαταστάστες εντοπίζονται στο β-υποκέντρο.

Προκειμένου να αποσαφηνισθεί αν είναι κρίσιμα όλα τα τμήματα ενός προσδέτη για τη σύνδεσή του σε ένα κέντρο του ενζύμου διερευνήθηκε μια σειρά θραυσμάτων, τα περισσότερα εκ των οποίων αποτελούσαν τμήματα γνωστών προσδετών, που είχαν ήδη βρεθεί ότι ήταν ισχυροί αναστολείς της δράσης του ενζύμου. Την ευνοϊκότερη σύνδεση για το μακρομοριακό στόχο επέδειξε το θραύσμα χλωροινδολίου 17422321 για το οποίο τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα ακτίνων-Χ έδειξαν ότι συνδέεται ισχυρά στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία τόσο με τα κινητικά πειράματα (επέδειξε αναστολή της τάξης των  $\mu\text{M}$ ) καθώς και με την ένωση CP320626, η οποία αποτέλεσε την πρόδρομο ένωση αυτής. Οι παρατηρήσεις που αφορούν στη μελέτη των θραυσμάτων συνοψίζονται στο Σχήμα 56.



Σχήμα 56. Σχηματική απεικόνιση του χάρτη διαφοράς χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2F_o - F_c$  των θραυσμάτων που μελετήθηκαν. Υποδεικνύεται το κέντρο σύνδεσης καθώς και η ανασταλτική δράση αυτών στην *RMGPb* σε 1σ. Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών UCSF Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>].

Στο σχήμα 57 απεικονίζεται η υπέρθεση των θραυσμάτων 17422321, 1006946 και 1125606 στο νέο αλλοστερικό κέντρο στην κετρική όσο και στην συμμετρική υπομονάδα του ενζύμου. Μετά από παρατήρηση φαίνεται πως ο βενζοϊκός δακτύλιος και των τριών θραυσμάτων συνδέεται στην ίδια θέση στο μόριο της *RMGPb*.



**Σχήμα 57.Υπέρθωση των θραυσμέτων που στο νέο αλλοστερικό κέντρο της RMGPb.Με κίτρινο απεικονίζεται το 1125606 και κυανή η υπομονάδα του ενζύμου καθώς και ροζ η συμμετρική υπομονάδα αυτού.Με πράσινο απεικονίζεται το 1006946 και με πράσινο ανοιχτό η υπομονάδα του ενζύμου καθώς και κόκκινη η συμμετρική υπομονάδα αυτού.Με κόκκινο απεικονίζεται το 17422321 καθώς και με πράσινο η υπομονάδα του ενζύμου καθώς και κεραμιδί η συμμετρική υπομονάδα αυτού. . Η εικόνα σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών Molsoft[63].**

Συμπερασματικά, η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ πέραν της γνώσης που παρέχει για τον τρόπο πρόσδεσης μιας ένωσης αποτελεί μοναδικό εργαλείο για την ταυτοποίηση τόσο των δομικών χαρακτηριστικών όσο και των επί μέρους παραγόντων που υποβοηθούν το σχηματισμό του συμπλόκου. Χαρακτηριστικά, στην περίπτωση της ένωσης CK421 η παρουσία της διθειοθρεϊτόλης έγινε αντιληπτή μετά τον προσδιορισμό της τριδιάστατης κρυσταλλικής δομής.

Εκτός από την αξία της παραπάνω μεθόδου ως ένα εργαλείο για τον κατευθυνόμενο-από τη δομή- σχεδιασμό δυνάμει φαρμάκων, αξίζει να σημειωθεί η συνεισφορά της στην αποσαφήνιση των σχέσεων δομής-δράσης/ λειτουργίας πολλών μακρομοριακών στόχων. Αυτό οδηγεί στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού που διέπει τη λειτουργία των πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται σε πλήθος μεταβολικών οδών. Ειδικότερα, πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει πως υπάρχει μία περίπλοκη σχέση μεταξύ του δικτύου των μεταβολικών οδών του διαβήτη και του δικτύου κυτταρικής σηματοδότησης.Συγκεκριμένα, η αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου επάγει μεταβολές στην ζωή του κυττάρου και τη σηματοδότηση μονοπατιών στα παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα.

Η παραπάνω πληροφορία δίνει την δυνατότητα στους ερευνητές να διεξάγουν πειράματα με σκοπό την ενδεχόμενη αντιμετώπιση του καρκίνου, μέσω ρύθμισης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, μιας και το ισοένζυμο της γλυκογονικής φωσφορυλάσης του εγκεφάλου εντοπίζεται σε πάσχουσες από καρκίνο περιοχές του εντέρου [33].





## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΑ

AMP	Adenosine Monophosphate
Wat	Water
ATP	Adenosine Triphosphate
β-GP	<i>β-Glycerophosphate</i>
cAMP	Κυκλικό AMP
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
EM	Electron Microscopy
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GTP	Guanosine Triphosphate
GLUT	Glucose transporter
G-1-P	Glucose-1-phosphate
GP	Glycogen Phosphorylase
IMP	<u>Inosine Monophosphate</u>
MAD	Multiwavelength Anomalous diffraction
MERC	Mercaptoethanol
NaN <sub>3</sub>	Sodium azide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PhK	Κινάση της φωσφορυλάσης
Pi	Ορθοφωσφορικό ιόν

PKA	Πρωτεϊνική κινάση A
PLP	Pyridoxal 5'-Phosphate
pdb	Protein Data Bank
RMGP <i>b</i>	Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase <i>b</i>
r.m.s.d.	Root mean square deviation (ρίζα των τετραγώνων των αποκλίσεων από τη μέση τιμή)
<i>R</i>	<i>R</i> διαμόρφωση
<i>T</i>	<i>T</i> διαμόρφωση
Ala (A)	Αλανίνη
Arg (R)	Αργινίνη
Asn (N)	Ασπαραγίνη
Asp (D)	Ασπαραγινικό οξύ
Cys (C)	Κυστεΐνη
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)	Θρυπτοφάνη
Tyr (Y)	Τυροσίνη
Val (V)	Βαλίνη
ACY	Οξικό οξύ

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Bernard Munos, Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation, December **2009**,8:959-966
2. Gregory L. Warren<sup>1</sup>, Thanh D, Brian P. Kelley, Anthony Nicholls and Stephen D. Warren, Gregory L. June **2012**, 1270-81
3. Subha Kalyaanamoorthy, Yi-Ping Phoebe Chen ,Structure-based drug design to augment hit discovery Drug discovery today, **2011**,Volume 16 numbers 17/18,
4. Roderick E Hubbard,Can drugs be designed?,Department of Chemistry of York Heslilton Current Opinion of Biotechnology **1997**,8:696-700
5. E.D. Chrysina, A. Chajistamatiou and M. Chegkazi, From Structure-Based to Knowledge-Based Drug Design Through X-Ray Protein Crystallography: Sketching Glycogen Phosphorylase Binding Sites, *Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry*,Current Medicinal Chemistry, **2011**,18:2620-2629
6. V.Srinivasa Rao and K. Srinivas, Modern drug discovery process: An in silico, Department of Computer Science and Engineering, V. RSiddhartha, **2011**
7. Roderick E.Hubbard,Fragment approaches in structure-based drug discovery,Journal of synchrotron radiation, **2007**,(15) 227–230
8. Isabelle Krimm, Jean-Marc Lancelin, Jean-Pierre Praly, Binding Evaluation of Fragment-Based Scaffolds for Probing,Allosteric Enzymes, Institut des Sciences Analytiques,France **2012**,(55), 1287–1295
9. Harry Jubb, Alicia P. Higuero, Anja Winter and Tom L. Blundell,Structural biology and drug discovery for protein-protein interactions, Trends in Pharmacological Sciences, **2012**, (5),241-8
10. Daniel W Kulp and William R Schief, Advances in structure-based vaccine design, Current Opinion in Virology, 3:322–331, **2013**
11. Miles Congreve,Christopher W.Murray and Tom L.Blundell, Structural biology and drug discovery, **2005**, DDT ,Volume10
12. Monya Baker, Fragment-based lead discovery grows up, **2013**, (1),5-7

13. Gregory L. Warren, Thanh D. Brian P. Kelley, Anthony Nicholls, Stephen D. Warren, Essential considerations for using protein-ligand structures in drug discovery, **2012**, (23-24),1270-81
14. K Ravi Acharya and Matthew D.Lloyd, The advantages and limitations of protein crystal structures, TRENDS in Pharmacological Sciences Vol.26 No.1, **2005**
15. Rhodes, G. Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models. 2nd. ed. Academic Press: San Diego, **2000**, (2),401-14
16. H.Fuess,T.H, H.Wondratschek U. Müller U.Shmueli, E.Prince,A.Authier,V. Kopský, D.Litvin and M. Rossmann, International Tables for Crystallography ,**2005**,(17), 2005 - 606
17. Bernhard Rupp, B. *Biomolecular crystallography*, **2010**
18. Zbigniew Dauter, Mariusz Jaskolski and Alexander Wlodawer, Impact of synchrotron radiation on macromolecular crystallography: a personal view,Journal of Synchrotron Radiation, **2010**, (4),433-44
19. H. Fuess, T.H. Wondratschek, U. Müller, U. Shmueli, E. Prince, A. Authier, V. Kopský, D. Litvin and M. Rossmann. *International Tables of Crystallography*. Springer publications, **2005**
20. Sameer Talreja, Sarah L. Perry, Sudipto Guha, Venkateswarlu Bhamidi, Charles F. Zukoski, Paul J.A. Kenis, Department of Chemical & Biomolecular Engineering, ReVised Manuscript ReceiVed: February 23, **2010**, (13), 4432-41
21. Rupp B. *Biomolecular Crystallography : principles, practice, and application to structural biology*. Garland Science: New York, **2010**
22. Helliwell, J.R. *Macromolecular crystallography with synchrotron radiation*. 1st paperback ed. **2004**,(11),1-3
23. McDonald I.K, Thornton, J.M, Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. J Mol Biol, **1994**, 238, (5), 777-793
24. Berg J.M, Tymoczko, J.L, Stryer L, *Biochemistry*. 6th ed. W.H. Freeman: New York, **2007**
25. John Wiley & Sons Inc All rights reserved, **2008**
26. M.V. Chakravarthy; Semenkovich, C.F., The ABCs of beta-cell dysfunction in type 2 diabetes,. Nat Med, **2007**, vol. 13, (3), pp. 241-242

27. Ν.Γ.Οικονομάκος, Εθνικό ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, Χημικά Χρονικά, Σεπτέμβριος, **2011**, Τεύχος 9, 258-260
28. Manu V Chakravarthy & Clay F Semenkovich, The ABCs of  $\beta$ -cell dysfunction in type 2 diabetes, NATURE MEDICINE VOLUME 13 | NUMBER 3, **2007**
29. Lisa S. Rotenstein, BA, Benjamin M. Kozak, BA, Joseph P. Shivers, BA, Mark Yarchoan, BA, John Close, MBA, and Kelly L. Close, MBA, The Ideal Diabetes Therapy: What Will It Look Like? How Close Are We?, Volume 30, Number 2, 45-50, **2012**
30. Jason R. Young and Carrie McAdam-Marx, Treatment of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus with Insulin Detemir, a Long-Acting Insulin Analog, Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes, Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes **2010**, (3), 65-80
31. Oikonomakos\_CHEMICA\_CHRONICA\_review **2001**, (6), 501-8
32. Edmond H. Fischer Department of Biochemistry, Phosphorylase and the origin of reversible protein phosphorylation, Biol. Chem, **2010** Vol. 391, 131–137
33. Danjun Ma Ph.D, Jiarui Wang MD, Yingchun Zhao Ph.D, Wai-Nang Paul Lee MD, Jing Xiao Ph.D, Vay Liang W. Go MD, Qi Wang MD, Robert Recker MD, Gary Guishan Xiao PhD, Pancreas. **2012** 41(3): 397–408
34. Lorraine Agius BSc, DPhil, D, New hepatic targets for glycaemic control in diabetes, **2007**, Vol. 21, No. 4, 587–605,
35. Lorraine Agius, Physiological control of Liver Glycogen Metabolism: Lessons from Novel Glycogen Phosphorylase Inhibitors, Mini-Reviews of Medical Chemistry **2010** ,(10) , 1175-1187
36. Brunham L.R, Kruit J.K, Pape T.D, Timmins J.M, Reuwer A.Q, VasANJI Z, Marsh B.J, Rodrigues B, Johnson J.D, Parks J.S, Verchere C.B, Hayden M.R, Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment, Nat Med, **2007**, 13, (3), 340-347
37. D.Barford & L.N.Jonshon, Laboratory of Molecular Biophysics, of, The allosteric transition of glycogen phosphorylase, **1989**, 609-16
38. Lehninger, A.L.Nelson, D.L. Cox, M.M. Lehninger principles of biochemistry. 5th ed. W.H. Freeman: New York, **2008**

39. K.R.Acharya, D.I.S, K.M.Varvill and L.N.Johnson, Glycogen phosphorylase b, Description of the protein structure, **1991**
40. Virginia L Rath, Mark Ammirati, Dennis E Danley, Jennifer L Ekstrom, E Michael Gibbs, Thomas R Hynes, Alan M Mathiowetz, R Kirk McPherson, Thanh V Olson, Judith L Treadway, Dennis J Hoover, **2000**, (9), 677-82
41. Johnson, L.N., The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc T*, **2009**, 37, 627-641
42. Parrish, R.F.; Uhing, R.J.; Graves, D.J., Effect of phosphate analogs on activity of pyridoxal reconstituted glycogen-phosphorylase. *Biochemistry*, **1977**, 16, (22), 4824-4831
43. Green, A.A.; Cori, G.T.; Cori, C.F., Crystalline muscle phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, **1942**, 142, (1), 447-448; [65a] Barford D, Hu SH, Johnson LN, Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP, **1991** Mar 5;218(1):233-60
44. 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*, **2005**, 14, (4), 873-888
45. Nikos G. Oikonomakos, Vicky T Skamnaki, Katerina E Tsitsanou, Nikos G Gavalas, Louise N. Johnson, A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions, **2000**, (6), 575-84
46. Virginia L Rath, Mark Ammirati, Dennis E Danley, Jennifer L Ekstrom, E Michael Gibbs, Thomas R Hynes, Alan M Mathiowetz, R Kirk McPherson, Thanh V Olson, Judith L Treadway, Dennis J Hoover, Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site, *Chemistry & Biology* **2000**, (7), 677-682
47. Oikonomakos N.G, Kosmopoulou M, Zographos S.E, Leonidas, D.D, Chrysina E.D, Somsak L, Nagy V, Praly J.P, Docsa T, Toth B, Gergely P, **2002**, (6), 1684-96
48. Somsak L, Czifrak K, Toth M, Bokor E, Chrysina E.D, Alexacou K.M, Hayes, J.M, Tiraidis C, Lazoura E, Leonidas D.D, Zographos S.E, Oikonomakos

- N.G, New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents, **2008**, (28),2933-83
- 49.**Zographos S.E, Oikonomakos N.G, Tsitsanou K.E, Leonidas D.D, Chrysina E.D, Skamnaki V.T, Bischoff H, Goldmann S, Watson K.A, Johnson L.N, The structure of glycogen phosphorylase b with an alkyldihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor, **1997**, (11),1413-2
  - 50.**Johnson L.N, Hu S.H, Barford D, Katalytic mechanism of glycogen phosphorylase ,Faraday descuuss,**1992**,93,131-142
  - 51.**J.P Praly and S.Vidal, Inhibition of Glycogen Phosphorylase in the Context of Type 2 Diabets with Focus on Recent Inhibitors Bound at the Active Site, **2010**, (12), 1102-26
  - 52.**E.H. Fischer, E.G. Krebs, Muscle Phosphorylase-B, Methods in Enzymology, vol. 5, **1962**, 369-373
  - 53.**Oikonomakos N.G, Skamnaki V.T, Osz E, Szilagyi L, Somsak L, Docsa T, Toth B, Gergely P, Kinetic and crystallographic studies of glucopyranosylidene spirothiohydantoin binding to glycogen phosphorylase B. Bioorg Med Chem, **2002**, 10, (2), 261-268
  - 54.**Bokor E, Docsa T, Gergely P, Somsak L, Synthesis of 1-(D-glucopyranosyl)-1,2,3-triazoles and their evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors. Bioorgan Med Chem, **2010**, 18, (3), 1171-1180
  - 55.**Cheng Y, Prusoff W.H, Relationship between Inhibition Constant (K1) and Concentration of Inhibitor Which Causes 50 Per Cent Inhibition (I50) of an Enzymatic-Reaction, Biochem Pharmacol, **1973**, 22, (23), 3099-3108
  - 56.**Collaborative, The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallographica Section D, **1994**, 50, (4), 760-763
  - 57.**Chen V.B, Arendall W.B, Headd J.J, Keedy D.A, Immormino R.M, Kapral G.J, Murray L.W, Richardson J.S, Richardson DC.W, MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, **2010**, Acta Crystallography D Biol Crystallography, 12-21
  - 58.**Katalin Czifrák, Szabina Deák, András Páhi, Katalin E. Kövér, Tibor Docsa, Pál Gergely, Kyra-Melinda Alexacou, Evangelia D. Chrysina, László Somsák, Papakonstantinou M.Maria, Glucopyranosylidene-spiro-iminothiazolidinone, a New Bicyclic Ring System: Synthesis, Derivatization,



and Evaluation as Glycogen Phosphorylase Inhibitors by Enzyme Kinetic and Crystallographic Methods, (to be published)

59. M.Gregoriou, M.E.Noble, K.A Watson, E,F German, T.M.Krulle, C.de laFuente, G.W.Fleet, N.G Oikonomakos, L.N.Johnson, The structure of a glycogen phosphorylase glucopyranose spirohydantoin complex at 1.8 Å resolution and 100 K: The role of the water structure and its contribution to binding. *Protein Science*, **1998**, 7, (4), 915-927.
60. Watson K.A, Chrysina E.D, Tsitsanou K.E, Zographos S.E, Archontis G, Oikonomakos N.G, Kinetic and crystallographic studies of glucopyranose spirohydantoin and glucopyranosylamine analogs inhibitors of glycogen phosphorylase, *Proteins* , **2005**,61(4):966-83
61. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. Wallace, A. C., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. **1995**. *Protein Eng.* 8, 127–134.
62. Raush E, Totrov M, Marsden B. D, Abagyan R.A, New method for publishing three-dimensional content, **2009**, (4), e7394
63. Emsley, P, Lohkamp, B, Scott W.G, Cowtan, K, Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **2010**, 66, 486-501
64. Abagyan, R, Totrov M, Kuznetsov D, A New Method for Protein Modeling and Design - Applications to Docking and Structure Prediction from the Distorted Native Conformation. *J Comput Chem*, **1994**, 15, (5), 488-506
65. L. Somsák, K. Czifrák, M. Tóth, É. Bokor, E.D. Chrysina, K.M. Alexacou, J.M. Hayes, C.Tiraidis, E. Lazoura, D.D. Leonidas, S.E. Zographos, N.G. Oikonomakos, New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Current Medicinal Chemistry*, **2008**, 15, 2933-2983
66. Oikonomakos NG, Skammaki VT, Tsitsanou KE, Gavalas NG, Johnson LN, A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions, **2000**, (6), 575-84.

