

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΟΜΗΣ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ.

Βασιλική Θ. Σκαμνάκη

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Περίληψη

Η μελέτη των σχέσεων δομής και λειτουργίας των βιομορίων και ο καθορισμός του βιολογικού τους ρόλου προϋποθέτει τη λεπτομερή γνώση της δομής τους. Στο πρώτο μέρος παρουσιάζονται οι βασικές τεχνικές ανάλυσης της δομής των μακρομορίων ενώ στο δεύτερο μέρος παρουσιάζεται ο αναπτυσσόμενος τομέας της δομικής ενζυμολογίας και συζητούνται παραδείγματα των εφαρμοζόμενων τεχνικών του σε ένζυμα ιδιαίτερου φαρμακευτικού ενδιαφέροντος

ΒΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΟΜΗΣ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ

Τα τελευταία χρόνια έγιναν δύο επιστημονικές επαναστάσεις που επηρέασαν άμεσα τις βιολογικές επιστήμες. Η **επανάσταση στη γενομική** (genomic revolution) και η **‘δομική’ επανάσταση** (structural revolution) ή επανάσταση στη δομική βιολογία. Η πρώτη περιλαμβάνει την αλληλούχιση των γονιδίων ολόκληρων οργανισμών από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο. Ο συσχετισμός της γενετικής πληροφορίας με το λειτουργικό ρόλο των προϊόντων κωδικοποίησης των γονιδίων αποτελεί πρόκληση για τη μετα-γενομική βιολογία. [Petsko, G.A., Ringe, D. Primers in Biology. Protein Structure and Function. New Science Press Ltd, 2004]

Η δομική επανάσταση περιλαμβάνει την εξέλιξη και ανάπτυξη τεχνικών για την επίλυση δομών των βιολογικών μακρομορίων. Η λεπτομερής περιγραφή των δομών αποτέλεσε την εκλογικευμένη βάση της διερεύνησης του ρόλου των βιολογικών μακρομορίων και βοήθησε στην ανάπτυξη σημαντικών τομέων της βιοχημείας όπως η **δομική ενζυμολογία** με σημαντικές εφαρμογές όπως π.χ. **στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων.**

Έτσι, δεν είναι υπερβολή να πούμε ότι σήμερα θα μπορούσε να αναδιατυπωθεί το κεντρικό δόγμα της βιολογίας ως;

Η αλληλουχία καθορίζει την δομή η οποία καθορίζει τη λειτουργία. [Petsko, G.A., Ringe, D. Primers in Biology. Protein Structure and Function. New Science Press Ltd, 2004.

Τα βιολογικά μακρομόρια είναι μόρια μεγάλου μοριακού βάρους όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, πολυσακχαρίτες και σύμπλοκα αυτών που απαντώνται στα βιολογικά συστήματα [The New Penguin Dictionary of Biology, Eighth Edition]

Οι κύριες τεχνικές επίλυσης της δομής των μακρομορίων είναι η **κρυσταλλογραφία ακτίνων-X**, ο **πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR)** και η **ηλεκτρονική μικροσκοπία**. Θα λέγαμε ότι η κρυσταλλογραφία ακτίνων X βρίσκεται στη βάση της πυραμίδας το δομικών τεχνικών καθώς είναι η παλαιότερη ιστορικά και έχει χρησιμοποιηθεί στην επίλυση των περισσότερων μακρομοριακών δομών.

Φυσικά όλες οι τεχνικές παρουσιάζουν διαφορετικές δυνατότητες αλλά και περιορισμούς. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X μπορεί να επιλύσει μακρομοριακές δομές (πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) σε υψηλή ανάλυση (ευκρίνεια 0.5-3 Å) όμως προϋποθέτει την κρυστάλλωση του μακρομορίου που δεν είναι πάντοτε εφικτή. Η τεχνική του NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μακρομόρια (πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) με μοριακό βάρος μέχρι 50KD, ενώ με την τεχνική της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας δεν επιτυγχάνεται υψηλή ευκρίνεια αλλά επιλύονται δομές μεγάλων σε χαμηλή ευκρίνεια μακρομοριακών συμπλόκων.

Στην επίλυση των μακρομοριακών δομών σημαντικό ρόλο παίζει η **ευκρίνεια (resolution)** που εκφράζει το πόσο καλά (σε λεπτομέρεια) μπορούμε να 'δούμε' μια δομή. Ορίζει τη μικρότερη απόσταση όπου δύο αντικείμενα είναι διακριτά ως ξεχωριστά αντικείμενα.

Άλλες τεχνικές που παρέχουν δομικές πληροφορίες είναι η **περίθλαση ινών μακρομορίων (fiber diffraction)**, **περίθλαση νετρονίων (neutron diffraction)**, **περίθλαση σκόνης μακρομορίων (powder diffraction)**, **σκέδαση ακτίνων μικρής γωνίας (SAXS)**, **δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)**, **κυκλικός διχρωϊσμός(CD)**

Κρυσταλλογραφία ακτίνων X

Η **κρυσταλλογραφία ακτίνων-X** αποτελεί την πιο συνηθισμένη τεχνική επίλυσης μακρομοριακής δομής σε ατομικό επίπεδο. Πάνω από 8000 πρωτεϊνικές δομές και

δομές νουκλεϊκών οξέων έχουν επιλυθεί με αυτή τη μέθοδο. [Rodes,G. Crystallography Made Crystal Clear. Academic Press, Second Edition]. Η θέση στον τρισδιάστατο χώρο του ατόμου ενός μακρομορίου σε σχέση με όλα τα άλλα άτομα του μορίου ονομάζεται ατομική συντεταγμένη (atomic coordinate). Με την κρυσταλλογραφία ακτίνων $-X$ είναι δυνατός ο **προσδιορισμός των ατομικών συντεταγμένων των ατόμων ενός μακρομορίου**. Η τεχνική στηρίζεται στην επεξεργασία των **δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X** από κρυστάλλους μακρομορίων. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες τα μόρια (και τα βιολογικά μακρομόρια) μπορούν να περάσουν από την διαλυτή σε κρυσταλλική κατάσταση. **Οι κρύσταλλοι αποτελούνται από κανονικές τρισδιάστατες συστοιχίες μορίων που συγκρατούνται μεταξύ τους με μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις**. [Rodes,G. Crystallography Made Crystal Clear. Academic Press, Second Edition].

Τα στάδια επίλυσης της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων X περιλαμβάνουν κρυστάλλωση, τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων σε συμβατικές ή συγχροτρονικές πηγές ακτίνων X , και τη δημιουργία ενός ατομικού δομικού μοντέλου (επίλυση φάσεων και κατασκευή χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας που δείχνουν την κατανομή των ηλεκτρονίων γύρω από τα άτομα των ατόμων σε ένα μόριο) και τη βελτιστοποίηση του σε συμφωνία με τα κρυσταλλογραφικά πειραματικά δεδομένα με τη χρήση .

Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

Η τεχνική της φασματοσκοπίας NMR ανακαλύφθηκε το 1946 από τους Bloch και Purcell (Bloch, E., Nuclear Induction. (1946) Physical Rev. 70,460-474) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των αποστάσεων των ατομικών πυρήνων σε ένα μόριο οδηγώντας έτσι σε **ένα τρισδιάστατο μοντέλο του μακρομορίου** και παρέχοντας πληροφορίες για **τη δυναμική του**. Στηρίζεται στο φαινόμενο της διέγερσης ατομικών πυρήνων με περιττό ατομικό αριθμό όπως ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , που διαθέτουν στροφορμή (spin) υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας όταν βρίσκονται σε μαγνητικό πεδίο. Για παράδειγμα όταν τα μόρια μιας πρωτεΐνης τοποθετούνται σε ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο τα spin των ατόμων υδρογόνου ευθυγραμμίζονται με το πεδίο (κατάσταση ισορροπίας). Παλμοί ραδιοσυχνοτήτων (RF) διεγείρουν τους πυρήνες οι οποίοι όταν επανέρχονται σε κατάσταση ισορροπίας εκπέμπουν ακτινοβολία RF. Η συχνότητα αυτής της ακτινοβολίας εξαρτάται από το

μοριακό περιβάλλον του πυρήνα [Branden, C., Tooze, J., Εισαγωγή στη Δομή των πρωτεϊνών. (2006) Ακαδημαϊκές εκδόσεις. 2^η έκδοση].

Τα σήματα της ακτινοβολίας καταγράφονται ως φάσματα διαφόρων τύπων (όπως COSY correlation spectroscopy φασματοσκοπία συσχέτισης, NOESY (nuclear Overhauser effect) επεξεργάζονται και ταυτοποιούνται. Το τελικό αποτέλεσμα είναι μία λίστα με περιορισμούς στην απόσταση (distance constraints) μεταξύ συγκεκριμένων ζευγών ατόμων υδρογόνου από όπου μπορούν να αναγνωρισθούν π.χ. δομικά στοιχεία δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης και να κατασκευασθεί ένα τρισδιάστατο δομικό μοντέλο. Το τελικό αποτέλεσμα είναι **μια ομάδα πιθανών δομών** και όχι μία μοναδική δομή.

Σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι μπορούν να μελετηθεί **η δυναμική συμπεριφορά μακρομορίων** (χημική ισορροπία, κινητικότητα, υπολογισμός τιμών Kd προσδετών, unfolding). Επίσης σε σύγκριση με την κρυσταλλογραφία ακτίνων X δεν απαιτείται κρυστάλλωση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εύρος πειραματικών συνθήκων (θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύ). Στα βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται ο περιορισμός στο μέγεθος των μακρομορίων που πρέπει να είναι μικρότερα από 50 KD και η αδυναμία χαρακτηρισμού μιας μοναδικής δομής αφού δίνει ως αποτέλεσμα ένα σετ πολλαπλών δομών.

Ηλεκτρονική μικροσκοπία.

Η τεχνική της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μας επιτρέπει να περιγράψουμε τη δομή κυτταρικών οργανιδίων, ιών, μακρομορίων και συμπλόκων τους σε ατομική ευκρίνεια. Υπάρχουν διάφορα είδη ηλεκτρονικής μικροσκοπίας όπως ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας (TEM. Transmission electron microscopy), μικροσκοπία σάρωσης (SEM, scanning electron microscopy) ή EELS (electron energy loss microscopy) με πιο συνηθισμένη την TEM.

Η αρχή λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι ανάλογη του οπτικού μικροσκοπίου. Στο οπτικό μικροσκόπιο εάν αντικαταστήσουμε το φως με ακτίνα ηλεκτρονίων που παράγεται από θερμαινόμενο μεταλλικό νημάτιο σε υψηλό κενό και το γυάλινο φακό με ηλεκτρομαγνητικό πεδίο ώστε να επιτυγχάνεται η εστίαση των ηλεκτρονίων ενώ η εικόνα του αντικειμένου ανιχνεύεται σε ειδική κάμερα (CCD detector). Η πιο σημαντική διαφορά ανάμεσα στο οπτικό και το ηλεκτρονικό

μικροσκόπιο είναι η ανάλυση (ευκρίνεια) της εικόνας που μπορεί να επιτευχθεί με τις δύο τεχνικές. Αυτό που καθορίζει την ανάλυση της εικόνας είναι το μήκος κύματος της πηγής ακτινοβολίας. Όσο πιο μικρό το μήκος κύματος τόσο μεγαλύτερη η ανάλυση. Στην περίπτωση του οπτικού μικροσκοπίου τα μήκη κύματος μας επιτρέπουν να δούμε καθαρά ως 0.2 μm ενώ με ένα κλασικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαπερατότητας (TEM) 0.15 nm. Είναι λοιπόν δυνατό να δούμε βιολογικά μακρομόρια με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και αυτό επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά το 1975 με την επίλυση της δομής βακτηριοροδοψίνης σε ευκρίνεια 7 \AA [Henderson R, Unwin PN. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. Nature. 1975; 257:28–32.]. Ένα άλλο παράδειγμα δομής μεμβρανικής πρωτεΐνης που επιλύθηκε σε ατομική ευκρίνεια είναι η υδατοπορίνη (aquaporin) αλλά και πλήθος εικοσάεδρων ιών. Ένα μεγάλο μειονέκτημα της τεχνικής είναι η βλάβες (ρήξη χημικών δεσμών και δημιουργία ελεύθερων ριζών) που προκαλούνται στα βιολογικά δείγματα λόγω της ηλεκτρονιακής ακτινοβολίας. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με τη **μέθοδο της αρνητικής χρώσης**. Τα βιολογικά δείγματα εμβαπτίζονται σε διαλύματα χρωστικής πχ. οξικό ουράνιο που περιέχουν βαριά άτομα και έτσι οι προσβάσιμες μοριακές επιφάνειες επικαλύπτονται από τη χρωστική και προστατεύονται από τις βλάβες λόγω ακτινοβολίας. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατή η μελέτη της δομής κυττάρων, ιών και πρωτεϊνών σε ευκρίνεια μέχρι 20 \AA .

Δύο τεχνολογικές προσεγγίσεις επέτρεψαν την ανάπτυξη της μικροσκοπίας υψηλής ευκρίνειας δίνοντας λύση και στο πρόβλημα της βλάβης λόγω ακτινοβολίας. Η συλλογή πολλαπλών εικόνων (πανομοιότυπων μορίων) με χαμηλή δόση ακτινοβολίας και η επεξεργασία του μέσου όρου τους και η μικροσκοπία σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (κρυο-ηλεκτρονιακή μικροσκοπία) χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο ή υγρό ήλιο.

Τα τελευταία χρόνια δύο τεχνικές αναπτύχθηκαν ραγδαία στηριζόμενες στις παραπάνω προσεγγίσεις. Η **κρυο-ηλεκτρονιακή μικροσκοπία μονού σωματιδίου** (single particle electron microscopy) και η **ηλεκτρονιακή τομογραφία** (electron tomography). Στην τεχνική κρυο-ηλεκτρονιακής μικροσκοπία μονού σωματιδίου δεδομένα από πλήθος προβολών 2D εικόνων ενός μορίου σε διαφορετικό προσανατολισμό συνδυάζονται για να δημιουργήσουν το 3D μοντέλο της δομής του μορίου. Η κατασκευή του τρισδιάστατου μοντέλου είναι μία διαδικασία που περιλαμβάνει

πολύπλοκους μαθηματικούς υπολογισμούς που στηρίζονται **στο κεντρικό θεώρημα προβολής** μετασχηματισμών Fourier.

Η **ηλεκτρονική τομογραφία** επιτρέπει τη μελέτη της δομής κυτταρικών και υποκυτταρικών δομών και μακρομοριακών συμπλόκων. Περιλαμβάνει τη συλλογή μιας σειράς εικόνων με διαφορετική κλίση σε σχέση με την κατεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και συνδυασμό των εικόνων με υπολογιστικές μεθόδους ώστε να κατασκευασθεί η τρισδιάστατη εικόνα του βιολογικού δείγματος.

[Jacqueline L. S. Milne, Mario J. Borgnia, Alberto Bartesaghi, Erin E. H. Tran, Lesley A. Earl, David M. Schauder, Jeffrey Lengyel, Jason Pierson, Ardan Patwardhan, and Sriram Subramaniam Cryo-electron microscopy: A primer for the non-microscopist *FEBS J.* 2013 January ;280(1): 28–45]

Καινούργια κατεύθυνση αποτελεί η μικροσκοπία ενσωμάτωσης (**integrative microscopy**). Είναι ένας συνδυασμός τεχνικών όπου ενσωματώνονται δεδομένα υψηλής ευκρίνειας δομής από κρυσταλλογραφικά πειράματα ή NMR με δεδομένα σε τρισδιάστατα μοντέλα μορίων που υπολογίσθηκαν από εικόνες κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΔΟΜΙΚΗΣ ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ.

Τα ένζυμα είναι λειτουργικές πρωτεΐνες ιδιαίτερης σπουδαιότητας αφού ελέγχουν πλήθος βιολογικών διεργασιών δράοντας **ως βιολογικοί καταλύτες**. Η μελέτη τους αποτελεί αντικείμενο της ενζυμολογίας. Τα τελευταία χρόνια, οι τεχνολογικές εξελίξεις στις βιολογικές επιστήμες και κυρίως στη δομική βιολογία οδήγησαν σε ανάπτυξη τομείς όπως η δομική ενζυμολογία.

Η **δομική ενζυμολογία** περιλαμβάνει το συνδυασμό πλήθους τεχνικών από διάφορους τομείς της σύγχρονης βιοχημείας για τη **μελέτη της σχέσης δομής και λειτουργίας των ενζύμων**. Οι τεχνικές περιλαμβάνουν **τεχνικές επίλυσης δομής, ενζυμική κινητική, μελέτες πρόσδεσης τροποποιητών, in silico μοντελοποίηση, πρωτεϊνική μηχανική, τεχνικές πρωτεομικής κ.α.** Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών μπορούν να αξιοποιηθούν π.χ. για την επιλογή και βελτίωση ενζύμων με κλινικές και

βιομηχανικές εφαρμογές (όπως π.χ. ένζυμα βιομηχανίας τροφίμων ή βιοαισθητήρες). Τα οικονομικά οφέλη από την πληθώρα τεχνολογικών εφαρμογών των ενζύμων είναι τεράστια.

Σε πολλές περιπτώσεις ο σχεδιασμός φαρμάκων απαιτεί τη γνώση του μηχανισμού δράσης τους (ενζυμικού μηχανισμού) ο οποίος απαιτεί να έχουν καθορισθεί (i) η σειρά σχηματισμού των ενζυμικών συμπλόκων καθώς το υπόστρωμα (ή τα υποστρώματα) μετατρέπεται σε προϊόν (ή προϊόντα), (ii) οι ταχύτητες αλληλομετατροπής των συμπλόκων και (iii) οι δομές αυτών των συμπλόκων. Ο ορισμός συνεπάγεται την αναζήτηση κινητικών και δομικών πληροφοριών, συνεπώς δεν είναι περίεργο που οι τεχνικές που αφορούν τη κινητική και δομική μελέτη έχουν συνεισφέρει τα μέγιστα στην κατανόηση των ενζυμικών μηχανισμών. Πολύτιμες πληροφορίες επίσης αποκομίζονται από μελέτες που περιλαμβάνουν ανίχνευση ενδιάμεσων προϊόντων χημική τροποποίηση των αμινοξικών πλευρικών αλυσίδων θέση-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση. [Price, N.C., Stevens, L. Fundamentals of Enzymology. The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins. Oxford University Press, Third Edition.

Ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων αποτελεί μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές της δομικής ενζυμολογίας. Τα ένζυμα ελέγχουν τα βιοχημικά μονοπάτια καθώς καταλύουν σημαντικές βιοχημικές αντιδράσεις. **Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι μια κατηγορία ενζύμων (EC 2.7) ιδιαίτερου φαρμακευτικού ενδιαφέροντος.** Καταλύουν τη φωσφορυλίωση δηλαδή την μεταφορά της γ φωσφορικής ομάδας του ATP σε μια σερίνη, θρεονίνη ή τυροσίνη των πρωτεϊνικών τους υποστρωμάτων. Η ομοιοπολική τροποποίηση των πρωτεϊνών με **φωσφορυλίωση** όπως καταλύεται από τις πρωτεϊνικές κινάσες αποτελεί έναν βασικό μηχανισμό ρύθμισης για τα βιολογικά συστήματα. Τα τελευταία χρόνια οι πρωτεϊνικές κινάσες χρησιμοποιούνται ως **μοριακοί στόχοι** για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη φαρμάκων. Η ορθολογικότητα της προσέγγισης βρίσκεται στο γεγονός ότι η σύνδεση μικρών μορίων (προσδετών) σε συγκεκριμένα κέντρα των κινασών έχει σαν αποτέλεσμα τον έλεγχο της δραστηρότητας τους. Αυτό προϋποθέτει την γνώση της τρισδιάστατης δομής των κινασών και την λεπτομερή περιγραφή των δομικών χαρακτηριστικών και της αρχιτεκτονικής των κέντρων σύνδεσης ενζύμων και προσδετών. Με άλλα λόγια απαιτείται η μελέτη της **δομικής βάσης της ρύθμισης των ενζύμων** και αυτό αποτελεί αντικείμενο της δομικής ενζυμολογίας.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 518 πρωτεϊνικές κινάσες και όλες υιοθετούν ένα κοινό δομικό μοτίβο που περιλαμβάνει μια αμινο τελική περιοχή (domains) αποτελούμενη από β-πτυχωτές επιφάνειες και μια καρβοξυτελική περιοχή αποτελούμενη από α-έλικες. Το κέντρο σύνδεσης υποστρωμάτων (κέντρο σύνδεσης) βρίσκεται στην αύλακα μεταξύ των δύο αυτών περιοχών. Το κέντρο σύνδεσης του ATP παρουσιάζει παρόμοια αρχιτεκτονική σε όλες τις κινάσες και αποτελεί τον κύριο στόχο για το σχεδιασμό ενώσεων φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Πράγματι οι περισσότεροι αναστολείς κινασών που υπάρχουν σήμερα προσδένονται σε αυτό το κέντρο. Πολλοί αποτελούν ενώσεις πρότυπα (lead compounds) για το σχεδιασμό φαρμάκων και οι κινάσες πλέον αποτελούν κύριους στόχους για την ανάπτυξη φαρμάκων που αφορούν κυρίως τον καρκίνο. Αρκετοί αναστολείς κινασών που συνδέονται στο κέντρο σύνδεσης του ATP βρίσκονται στο στάδιο των κλινικών μελετών ενώ πάνω από 10 έχουν περάσει σε επόμενες φάσεις. με πιο γνωστό το αντικαρκινικό Imatinib (Glivec που είναι αναστολέας της ABL κινάσης τυροσίνης. [Johnson LN. kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. Q Rev Biophys. 2009 Feb;42(1):1-40].

Παρακάτω παρουσιάζεται η περίπτωση ενζύμων του μεταβολισμού του γλυκογόνου ως παράδειγμα (case study) για το πώς ο συνδυασμός τεχνικών της δομική ενζυμολογίας μπορεί να βοηθήσει στο σχεδιασμό ενώσεων φαρμακολογικού ενδιαφέροντος.

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μάστιγα της εποχής μας. Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι διαβήτη. Ο διαβήτης τύπου 1 οφείλεται σε ανεπάρκεια παραγωγής ινσουλίνης ενώ πιο συνηθισμένος διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται από αντίσταση στην ινσουλίνη σε συνδυασμό με ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης. Ανεξάρτητες μελέτες σε Ευρώπη και Αμερική για τον διαβήτη τύπου 1 και 2 έδειξαν ότι εάν οι διαβητικοί διατηρούν χαμηλά τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα αποφεύγουν τις μακροχρόνιες επιπλοκές της νόσου, όπως καρδιαγγιακές παθήσεις, αθηροσκλήρυνση, νεφροπάθειες κ.α.

Συνεπώς τα ένζυμα που ελέγχουν το μεταβολισμό του γλυκογόνου (αποθήκη γλυκόζης) όπως φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GPb), κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) και συνθετάση του γλυκογόνου μπορούν να αποτελέσουν μοριακούς στόχους για την ανάπτυξη αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων. Θα

εστιάζουμε την προσοχή μας στα δύο πρώτα που ελέγχουν την γλυκογονική διάσπαση (γλυκογονόλυση).

Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) καταλύει το πρώτο στάδιο της αποικοδόμησης του γλυκογόνου και αποτελεί μοριακό στόχο για τη ανάπτυξη αντιδιαβητικών φαρμάκων. Η δομική μελέτη της GP με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X οδήγησε στον χαρακτηρισμό τουλάχιστον έξι εν δυνάμει ρυθμιστικών κέντρων, το κέντρο αναγνώρισης της φωσφορυλιωμένης Ser, τα αλλοστερικά κέντρα σύνδεσης του AMP και της G-6-P, το καταλυτικό κέντρο, το κέντρο σύνδεσης αναστολέων όπως η καφεΐνη, το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου ενώ πρόσφατα αναγνωρίστηκε ένα καινούργιο αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης μη φυσιολογικών συνθετικών ουσιών (drug binding site). Οι ενώσεις CP320626 και φλαβοπιριδόλη είναι μερικοί από τους αναστολείς της GP που μελετήθηκαν με κρυσταλλογραφία ακτίνων -X.

Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK)

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) που ανακαλύφθηκε το 1955, ήταν η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που αναγνωρίστηκε και χαρακτηρίστηκε από τους Fischer & Krebs, (βραβείο Nobel). Για τα επόμενα 10 χρόνια ο έλεγχος της πρωτεϊνικής λειτουργίας μέσω αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης θεωρούνταν ιδιαιτερότητα του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ακολούθησε, το 1968, η ανακάλυψη της εξαρτώμενης από το κυκλικό AMP πρωτεϊνικής κινάσης ενός ενζύμου ευρύτερης εξειδίκευσης και ικανότητας να φωσφορυλιώνει έναν αριθμό ξεχωριστών πρωτεϊνών για να αναγνωρισθεί η σπουδαιότητα της φωσφορυλίωσης σε άλλους μηχανισμούς ρύθμισης.

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (ATP: φωσφορυλάση b φωσφοτρανσφεράση, EC 2.7.1.38) είναι ένα ένζυμο του μεταβολισμού του γλυκογόνου που καταλύει την φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης b (EC 2.4.1.1), μετατρέποντας την στην μορφή a που είναι ενεργή και απουσία AMP. Η PhK βρίσκεται στα περισσότερα σωματικά κύτταρα των ανωτέρων ευκαρυωτικών οργανισμών αλλά εντοπίζεται ως επί το πλείστον στους μυς και το ήπαρ, όπου κύρια μεταβολίζεται το γλυκογόνο.

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) είναι δομικά πολύπλοκο ένζυμο με μοριακό βάρος 1.3×10^3 Da. Είναι ετεροτετραμερές μόριο και αποτελείται από 4

υπομονάδες με στοιχειομετρία δεκαεξαμερούς (α,β,γ,δ)₄ Η γ υπομονάδα είναι η καταλυτική. Οι α και β και υπομονάδες έχουν ρυθμιστικό ρόλο και υπόκεινται σε πολλαπλές φωσφορυλιώσεις ενώ η δ υπομονάδα που είναι παρόμοια με την καλμοδουλίνη και έχει την ικανότητα να συνδέει μόρια ασβεστίου προσδίδοντας έτσι στο ένζυμο ευαισθησία στις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις ασβεστίου. Μέσω των ρυθμιστικών υπομονάδων το ένζυμο υπόκειται σε νευρικό και ορμονικό έλεγχο.

Ο σχεδιασμός αναστολέων του ενζύμου προϋποθέτει η γνώση της δομής του και του ενζυμικού του μηχανισμού. Παρότι η PhK ήταν αντικείμενο βιοχημικών μελέτων για δεκαετίες η πολυπλοκότητα της δομής εμπόδιζε τη μελέτη της τρισδιάστατης δομής της. Η **ετερόλογη έκφραση** πριν από μερικά χρόνια της καταλυτικής υπομονάδα σε *E.coli* επέτρεψε την επίλυση **με κρυσταλλογραφία ακτίνων X της τρισδιάστατης δομής** σε σύμπλοκο με ένα πεπτιδικό υπόστρωμα σε ευκρίνεια 2.6 Å. Η μελέτη αυτή επέτρεψε την περιγραφή του ενεργού κέντρου του ενζύμου αλλά και των δομικών χαρακτηριστικών που καθορίζουν την αναγνώριση των υποστρωμάτων. **Οι παραπάνω μελέτες σε συνδυασμό με κινητικές μελέτες και μελέτες μεταλλαξιγένεσης οδήγησαν** στο να διατυπωθεί ο καταλυτικός μηχανισμός του ενζύμου. Οι πληροφορίες που προέκυψαν από το συνδυασμό των παραπάνω τεχνικών βοηθούν τον ορθολογικό σχεδιασμό αναστολέων. Ήδη έχουν μελετηθεί δύο αναστολείς του ενζύμου, η σταυροσπορίνη και ο εξειδικευμένος αναστολέας KT5720 ενώ πρόσφατα επιλύθηκε η δομή του συμπλόκου του ενζύμου με την ένωση Sunitinib (pdb 2Y75)

Συνδυασμός τεχνικών **κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και *in silico* μοντελοποίησης** βοηθούν **στη βελτιστοποίηση και ανάπτυξη πιο εξειδικευμένων αναστολέων** για την PhK.

Η ρύθμιση του ενζύμου προϋποθέτει και την επίλυση των δομών των ρυθμιστικών υπομονάδων α και β του ολοενζύμου. Με δεδομένη την αντικειμενική δυσκολία έκφρασης των υπομονάδων σε διαλυτή μορφή ακολουθήθηκε μια προσέγγιση όπου **δεδομένα υψηλής ευκρίνειας από πειράματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X συνδυάστηκαν με δεδομένα από τεχνικές αρνητικής χρώσης και κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας μονού σωματιδίου (μικροσκοπία ενσωμάτωσης)** και οδήγησαν στην επίλυση της δομής του ολοενζύμου σε ευκρίνεια 9.9Å

