

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΟΜΗΣ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΑΣΙΛΙΚΗ Θ. ΣΚΑΜΝΑΚΗ

Επανάσταση στη γενομική (genomic revolution)

- αλληλούχιση των γονιδίων ολόκληρων οργανισμών από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο

Επανάσταση της δομής (structural revolution)

- εξέλιξη και ανάπτυξη τεχνικών για την επίλυση δομών των βιολογικών μακρομορίων

αλληλουχία-δομή-λειτουργία

*Biology in the age of genomics is a journey from sequence to
consequence*

Dagmar Ringe

Βιολογικά μακρομόρια

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]

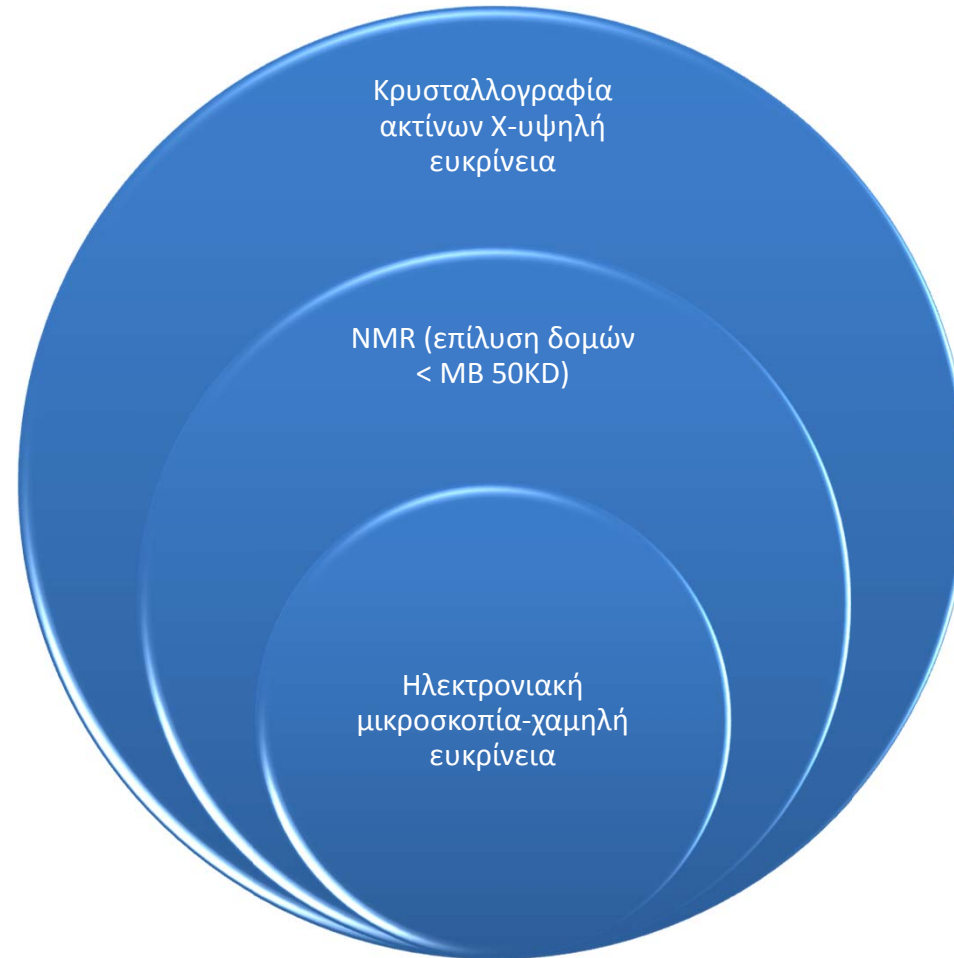


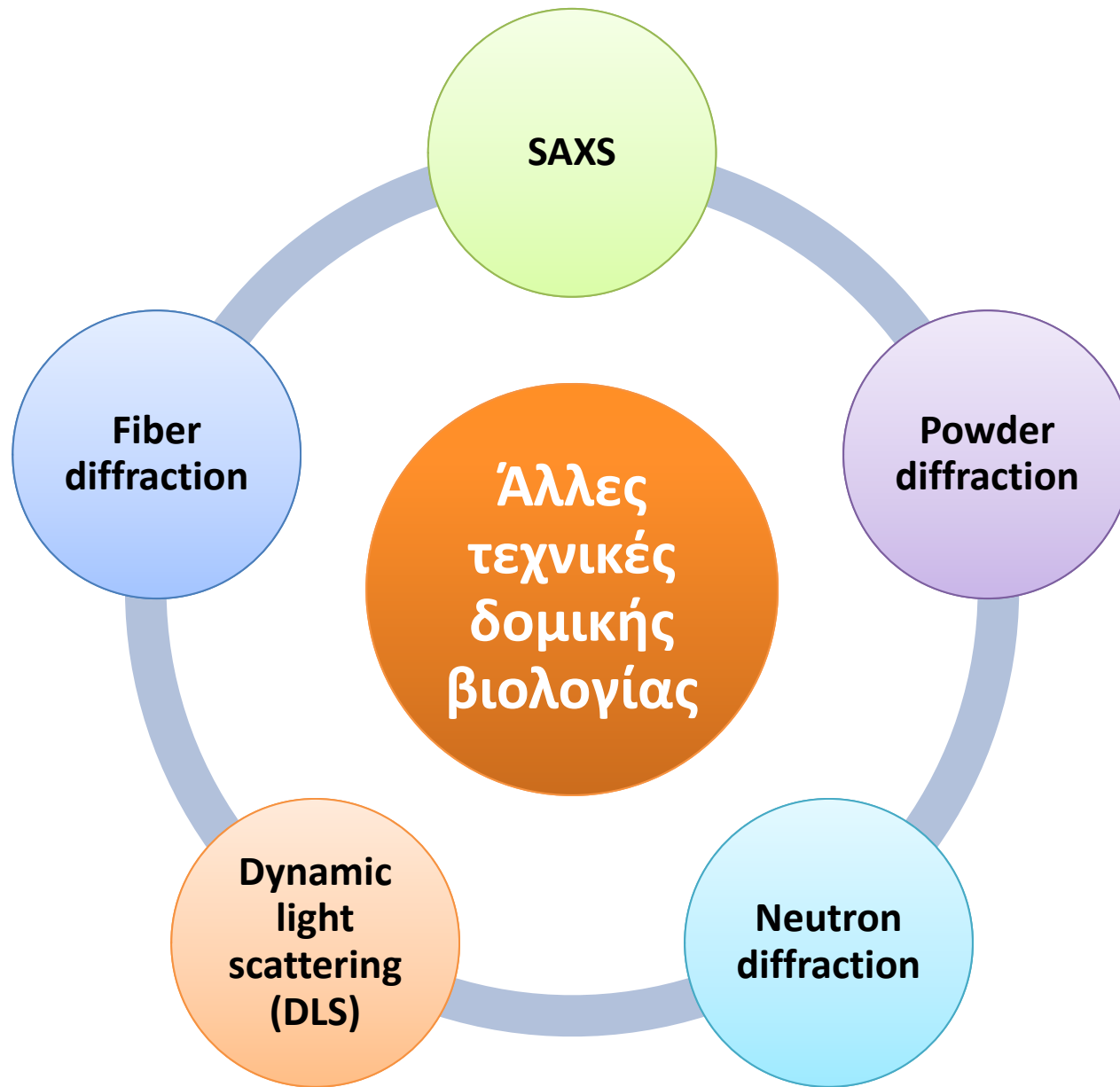
ηλ. μικροσκοπία

**πυρηνικός μαγνητικός
συντονισμός (NMR)**

**κρυσταλλογραφία
ακτίνων Χ**

Δυνατότητες και περιορισμοί





Τεχνική	Εφαρμογές
Περίθλαση νετρονίων (neutron diffraction)	Δομή μακρομορίων
Περίθλαση σκόνης (powder diffraction)	Δομή μακρομορίων
Περίθλαση ινών μακρομορίων (fiber diffraction)	Δομή μακρομορίων
Σκέδαση ακτίνων μικρής γωνίας (small angle scattering, SAXS)	Υπολογισμός μέσου μεγέθους μακρομορίων πληροφορίες για το σχήμα και σχέση επιφάνειας- όγκου
Δυναμική σκέδαση φωτός (dynamic light scattering, DLS)	Χαρακτηρισμός βιομορίων, διασπορά, δημιουργία συσσωματωμάτων
Κυκλικός διχρωϊσμός (circular dichroism)	Πληροφορίες για τη διαμόρφωση βιολογικών μορίων, δευτεροταγή δομή , αλληλεπιδράσεις μορίων υπολογισμός σταθερών διάστασης KD.

Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ

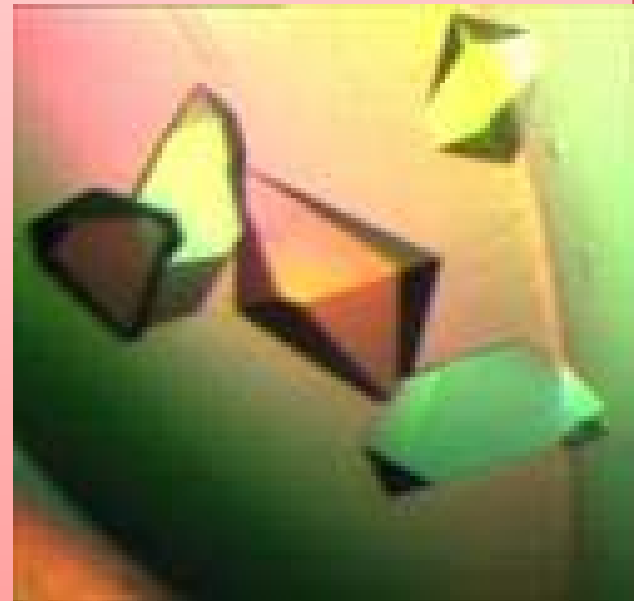
Με την κρυσταλλογραφία ακτίνων -X είναι δυνατός ο προσδιορισμός των ατομικών συντεταγμένων των ατόμων ενός μακρομορίου. Η τεχνική στηρίζεται στην επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης ακτίνων- X από κρυστάλλους μακρομορίων.

Τι είναι κρύσταλλοι;

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]

www.hamptonresearch.com

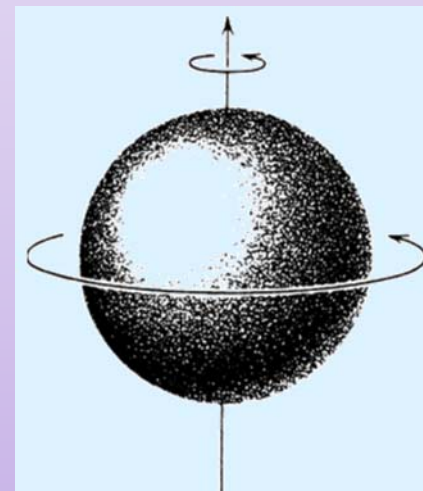


Στάδια επίλυσης της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ

- Κρυστάλλωση
- Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων
- Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων
δημιουργία και βελτιστοποίηση δομικού
μοντέλου

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.

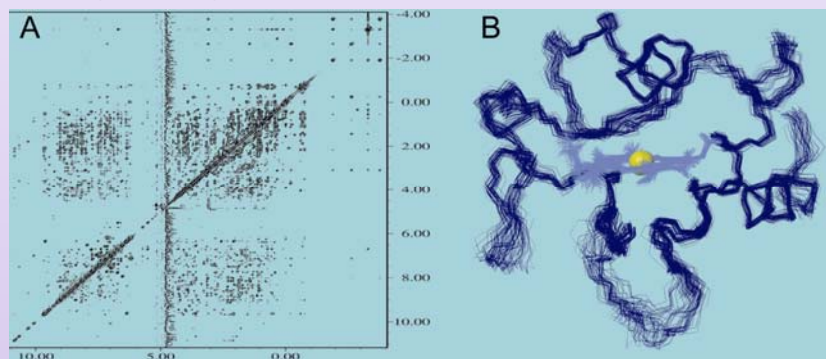


Στάδια επίλυσης δομής με NMR

- Προετοιμασία δείγματος



- Συλλογή και επεξεργασία φασμάτων

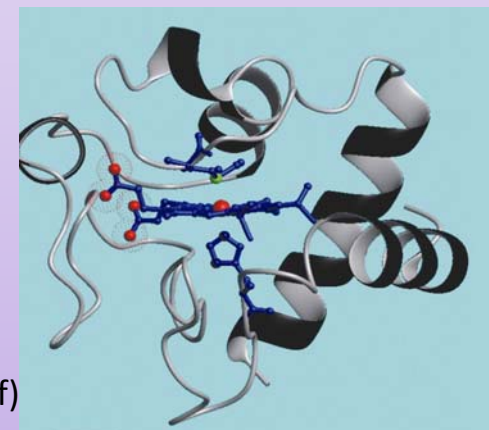


- Κατασκευή τρισδιάστατου μοντέλου

[πηγές www.duran-group.com

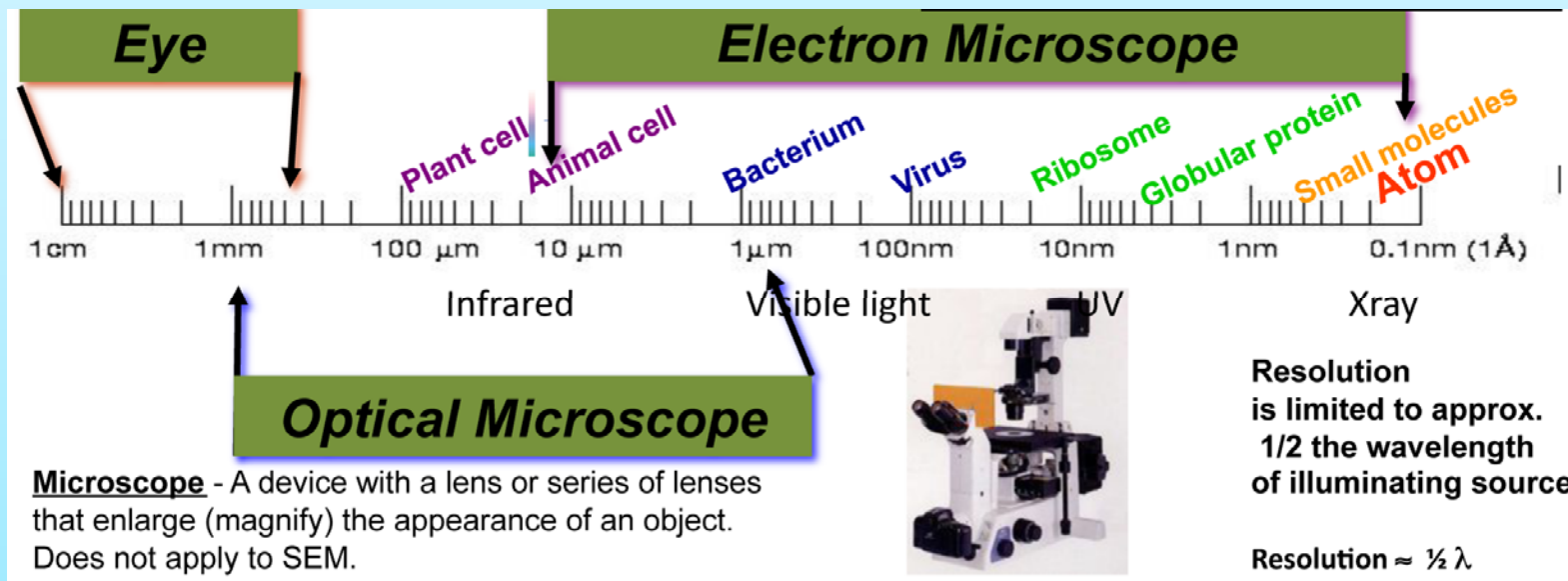
www.eie.gr

www.hecra.gr/education.gr htm (NMR_Hecra-GASPyroulias-18Jan20111.pdf)

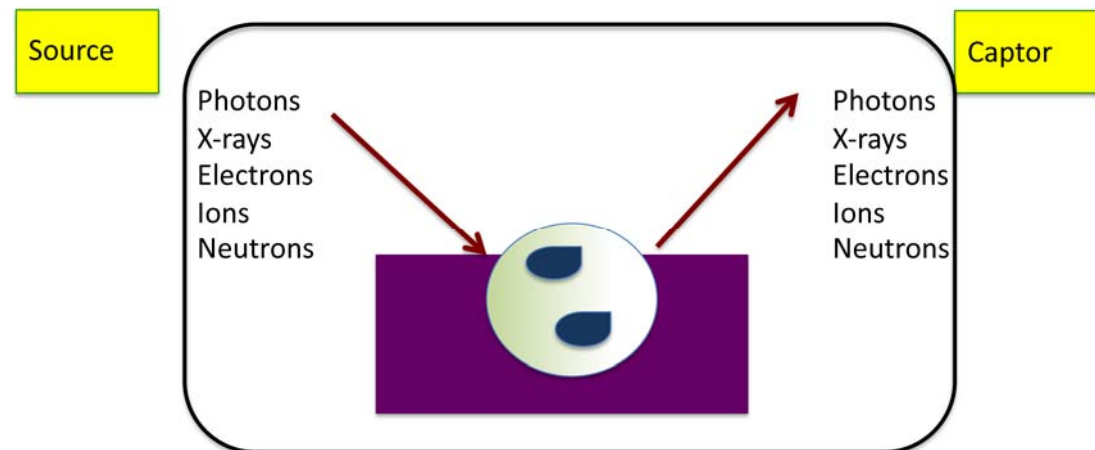


Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία μελετάμε τη δομή κυττάρων και κυτταρικών οργανιδίων, ιών αλλά και τη τρισδιάστατη δομή βιολογικών μακρομορίων και συμπλόκων τους.

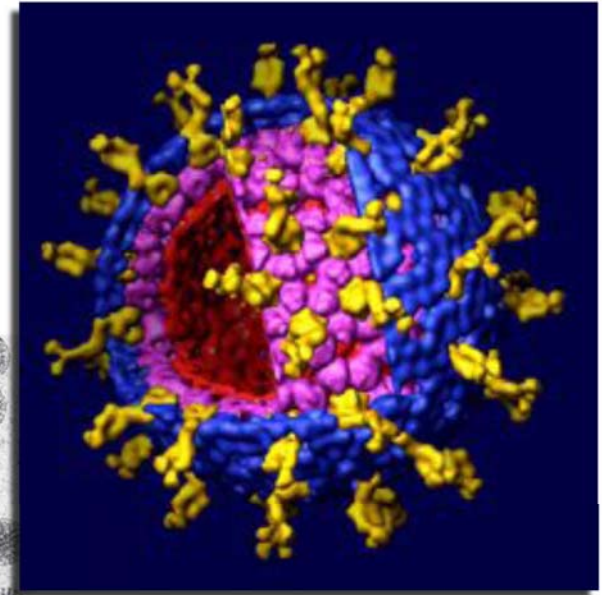
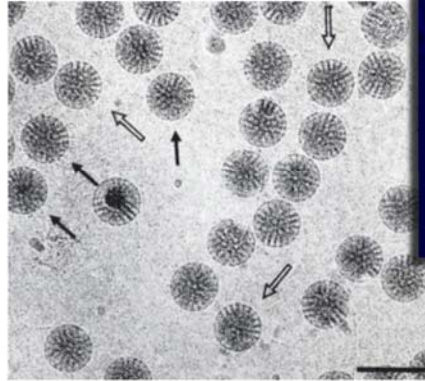


Nature	$\lambda(\text{nm})$	Energy	Resolution
Visible light	400-700	2eV	0.2 μm
X-rays	0.07-0.2	5-10keV	0.1 μm (focused X-ray imaging)
Electrons	0.1 - 0.002	100-500keV	0.15 nm
Protons	$3 \cdot 10^{-4}$	10-100keV	1-10 nm
Ions	10^{-5}	20keV-2MeV	500 nm
Neutrons	0.15	0.025eV	1 μm

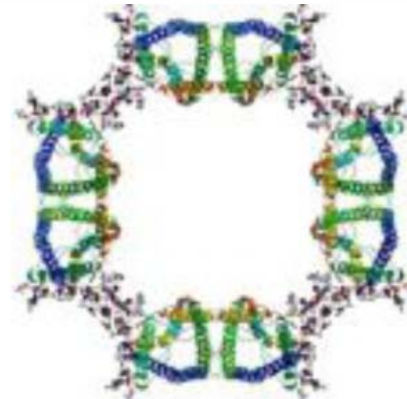




3D reconstruction of virus



Rotavirus
(Yeager Lab
Scripps, San Diego)



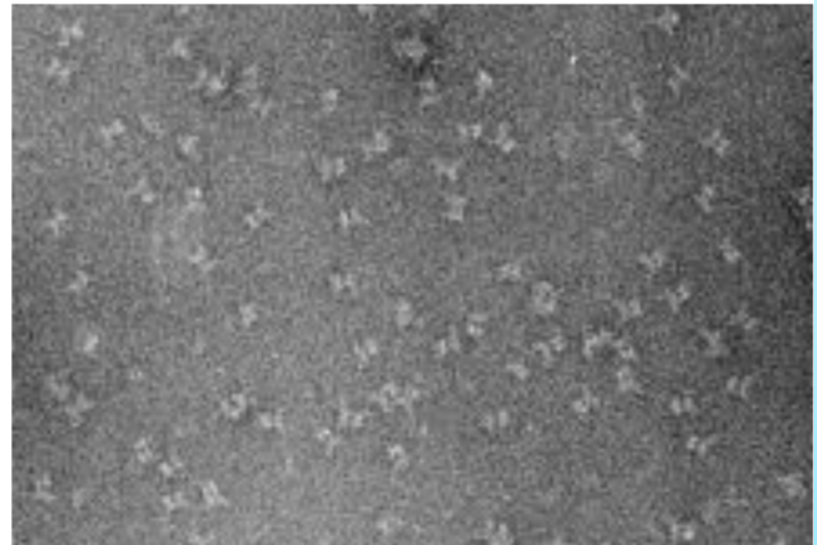
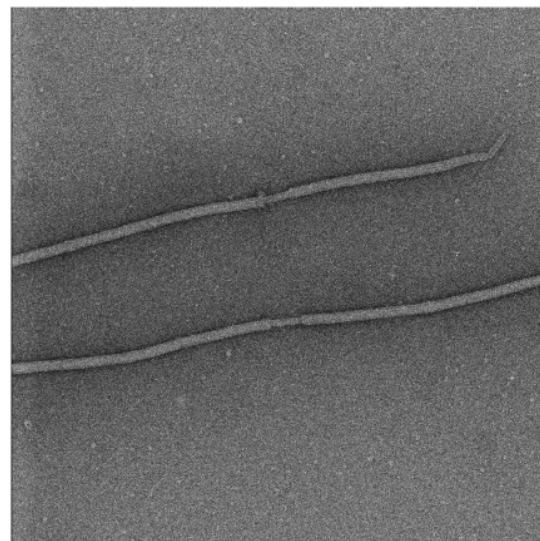
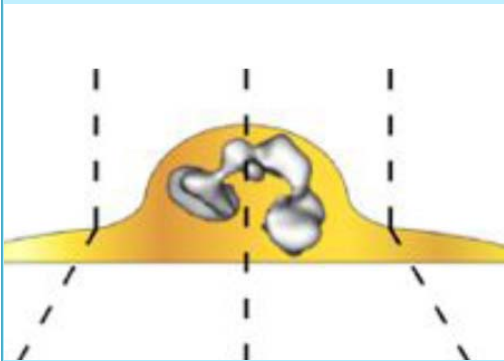
Aaquaporine 0
1.9Å resolution
Gonen et al., 2005

TEM (ηλ. μικροσκοπία διαπερατότητας)

Το βιολογικό δείγμα πρέπει να προστατεύεται από
βλάβες λόγω ακτινοβολίας

Μέθοδος αρνητικής χρώσης (negative staining)

Η ευκρίνεια περιορίζεται στα 20 Å



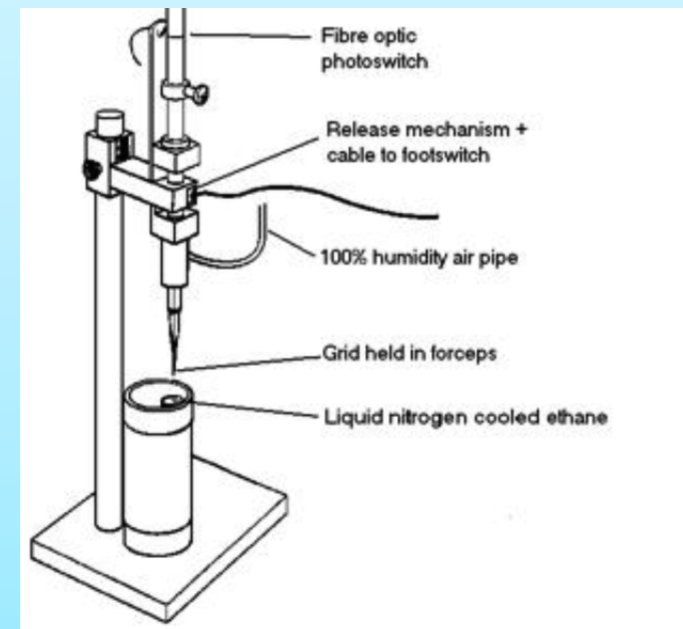
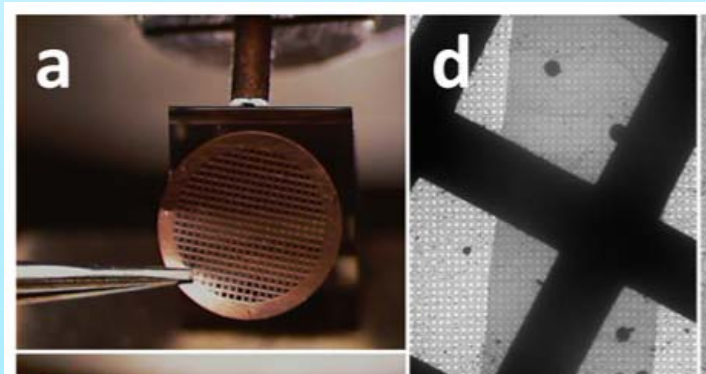
Κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία

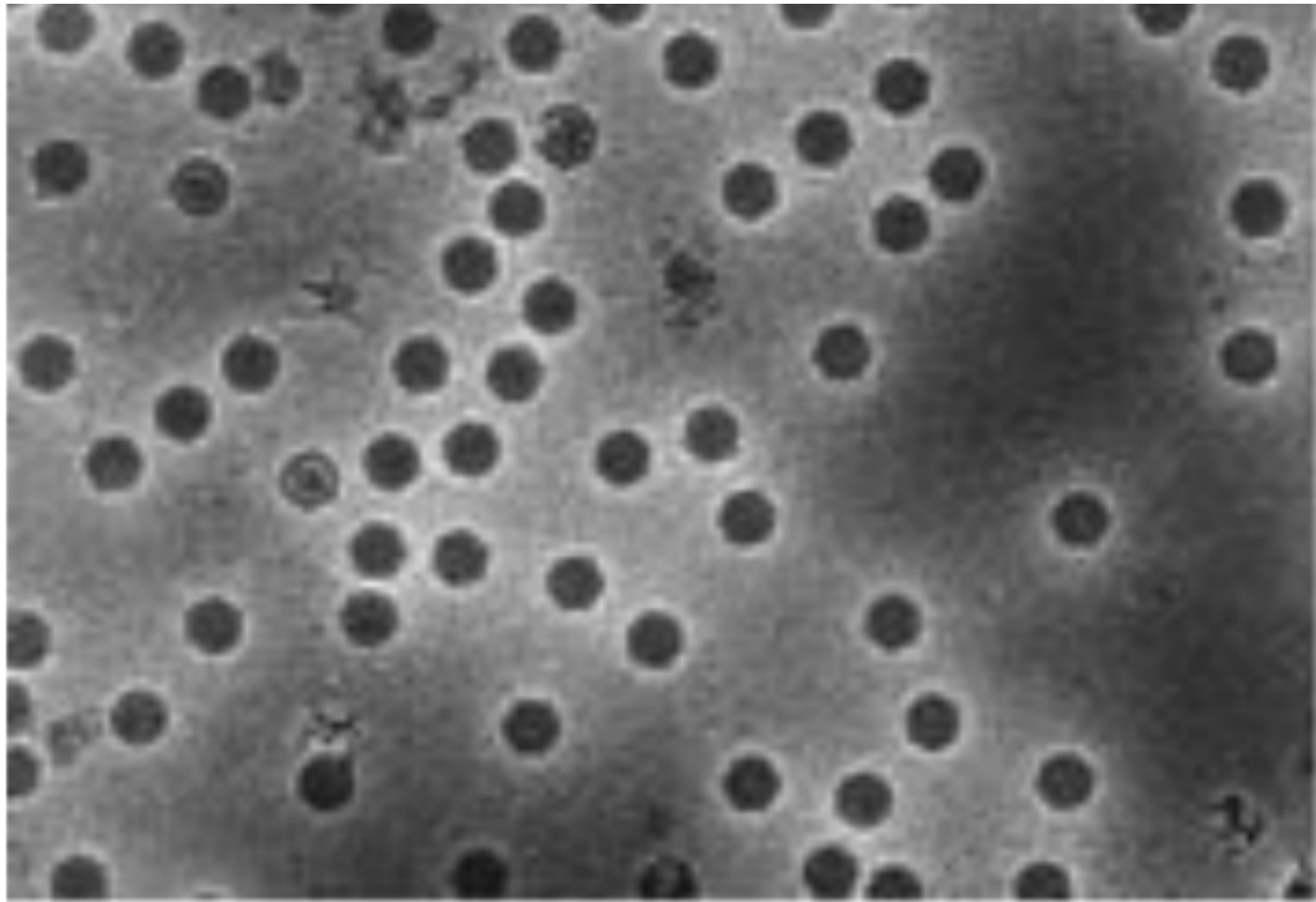
- ❖ Μικροσκοπία μονού σωματιδίου (single particle electron microscopy)
 - Μικροσκοπία ενσωμάτωσης (integrative microscopy)-συνδυασμός δεδομένων υψηλής και χαμηλής ευκρίνειας από διάφορες τεχνικές
 - Μικροσκοπία συσχέτισης (correlative microscopy)-συνδυασμός οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας
- ❖ Ηλεκτρονική τομογραφία (electron tomography)

Προετοιμασία δείγματος

Το δείγμα παγώνει, **υαλοποιείται** σε θερμοκρασίες υγρού αζώτου (100 οΚ) χρησιμοποιώντας **υγρό αιθάνιο**

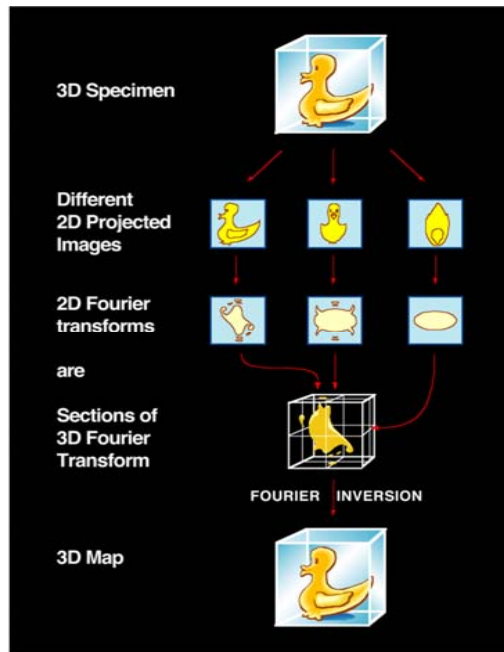
Γρήγορη διαδικασία για να μην προλάβει παγώσει το νερό και κρυσταλλωθεί





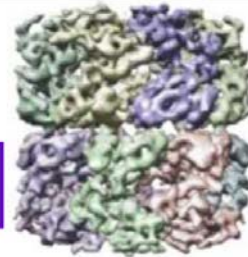
Electron micrograph of adenovirus embedded in rapidly frozen vitreous ice. This pictures was taken by Dubochet and colleagues (Adrian et al., (1984)) and appeared on the cover of the issue of Nature

Μικροσκοπία μονού σωματιδίου (single particle electron microscopy)



GroEL at 6 Å resolution. Size: 14 nm.

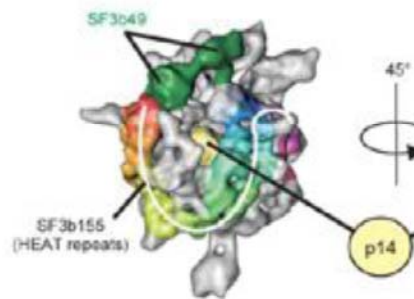
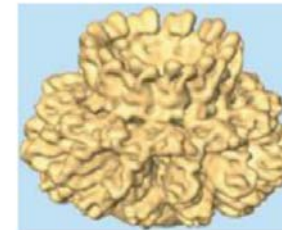
Ludtke *et al* (2004).
Structure 12: 1129–1136.



Connector of T7 bacteriophage at 8 Å resolution.

Size: 20.5 nm.

Agirrezabala *et al* (2005). J Mol Biol 347:895–902.

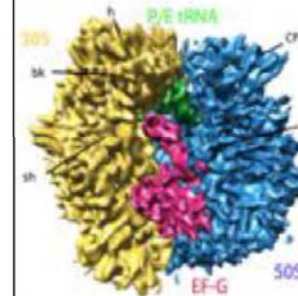


Multimeric protein complex splicing factor SF3b at ~10 Å resolution. Molecular mass : 450 kDa.

Stark and Luhrmann (2006). Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35:435–57

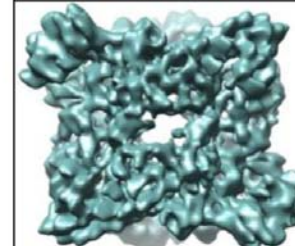
70S·EF-G ribosomal complex at 7.3 Å resolution.

Connell *et al* (2007).
Mol Cell 25:751–764.



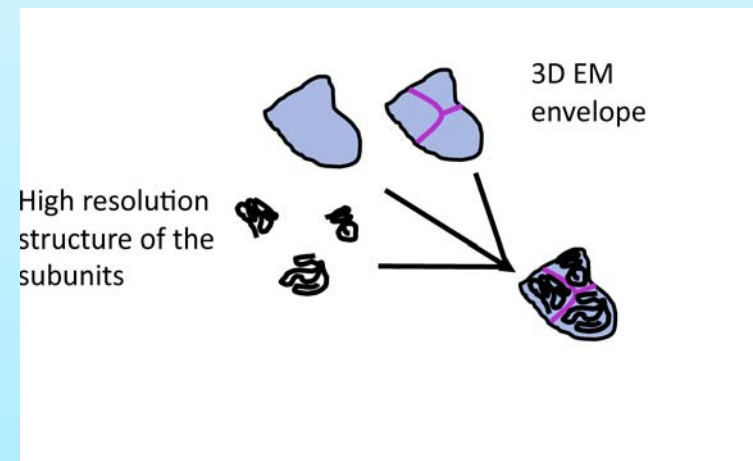
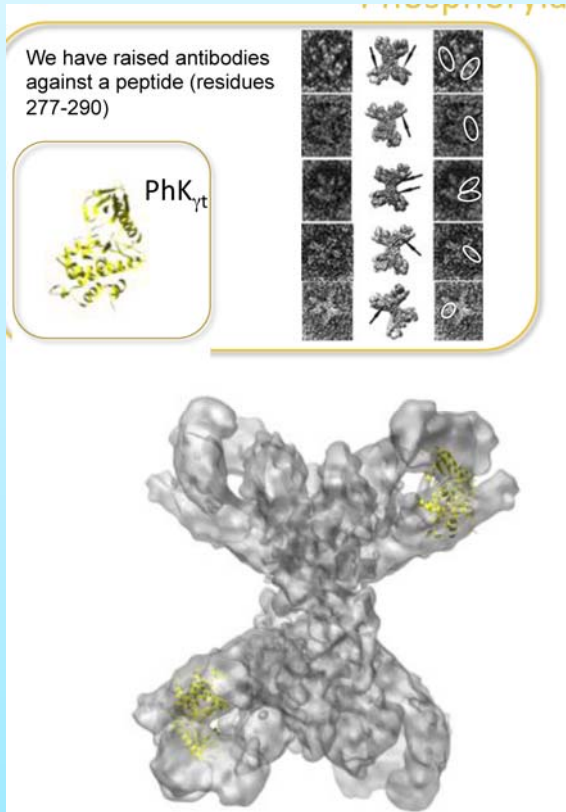
Glutamate synthase (GltS) at 9.5 Å resolution

Cottevieille *et al.*, J Biol Chem. 2008 28;283(13):8237–49

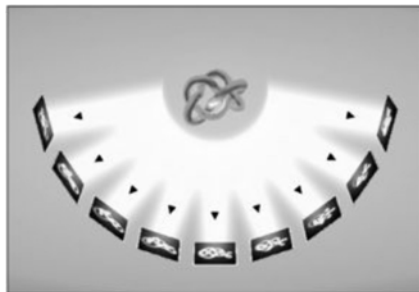


Μικροσκοπία ενσωμάτωσης

Συνδυασμός συμπληρωματικών πληροφοριών από διαφορετικές τεχνικές



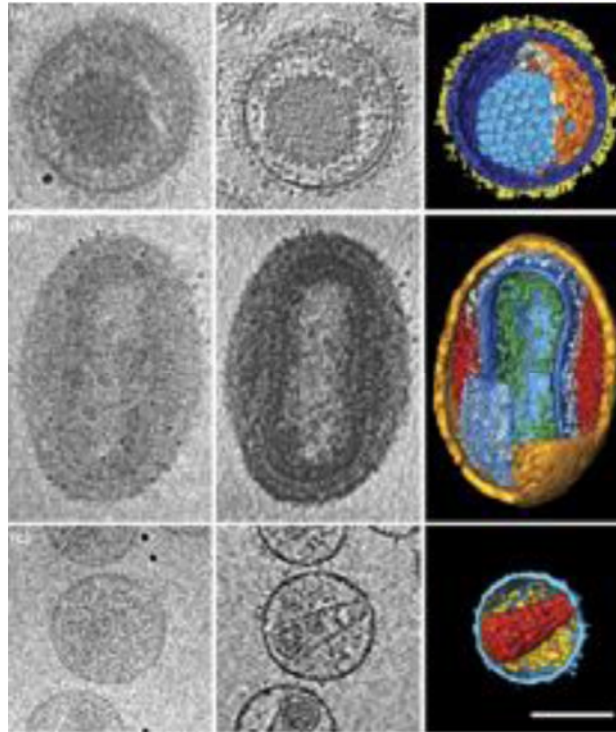
Ηλ. τομογραφία



Tilt series



Back projection and
3D reconstruction



Herpes simplex virus 1 (HSV-1).
Size: 200 nm. Resolution: 7 nm.

Grunewald *et al* (2003). *Science*
302:1396-1398.

**Vaccinia virus (Intracellular mature virus-
IMV).** Size: 360 nm. Resolution: 5 nm.

Cyrklaff *et al* (2005). *Proc Natl Acad Sci USA*
102:2772-2777.

Human immunodeficiency virus (HIV-1).
Size: 130 nm. Resolution: 4 nm.

Briggs *et al* (2006). *Structure* 14:15-20.



Δομική ενζυμολογία

Τεχνικές επίλυσης
δομής (πρωτεϊνική
κρυσταλλογραφία,
ηλεκτρονική
μικροσκοπία, NMR)

Ενζυμική κινητική

Πρωτεϊνική μηχανική
(protein engineering)

Μελέτες πρόσδεσης
τροποποιητών (binding
studies)

In silico, μελέτες
μοντελοποίησης

According to a recent release by Business Communication Company Inc. Study RC-147 NA, Norwalk, CT 06855, USA on “**Industrial Enzyme Products, Technologies and Applications**”, the world wide total industrial production of enzymes was of valued at **1.5 billion US dollars in 1997 and it gained an average annual growth rate of 4.0%**. Food and animal feed applications of enzymes are constantly dominating the use of industrial enzymes on a worldwide basis.

ENZYMOLOGY

Industrial and clinical applications excluding Diagnostic clinical enzymology

Subhabrata Sengupta and Mayura Dasgupta

Heritage Institute of Technology

Chowbaga Road, Anandapur PO.

East Kolkata Township

Calcutta – 700107, West Bengal, India

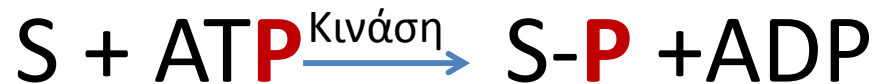
Ενζυμικός μηχανισμός



- Σειρά σχηματισμού ενζυμικών συμπλόκων
- Ταχύτητες αλληλομετατροπής συμπλόκων
- Δομές των συμπλόκων

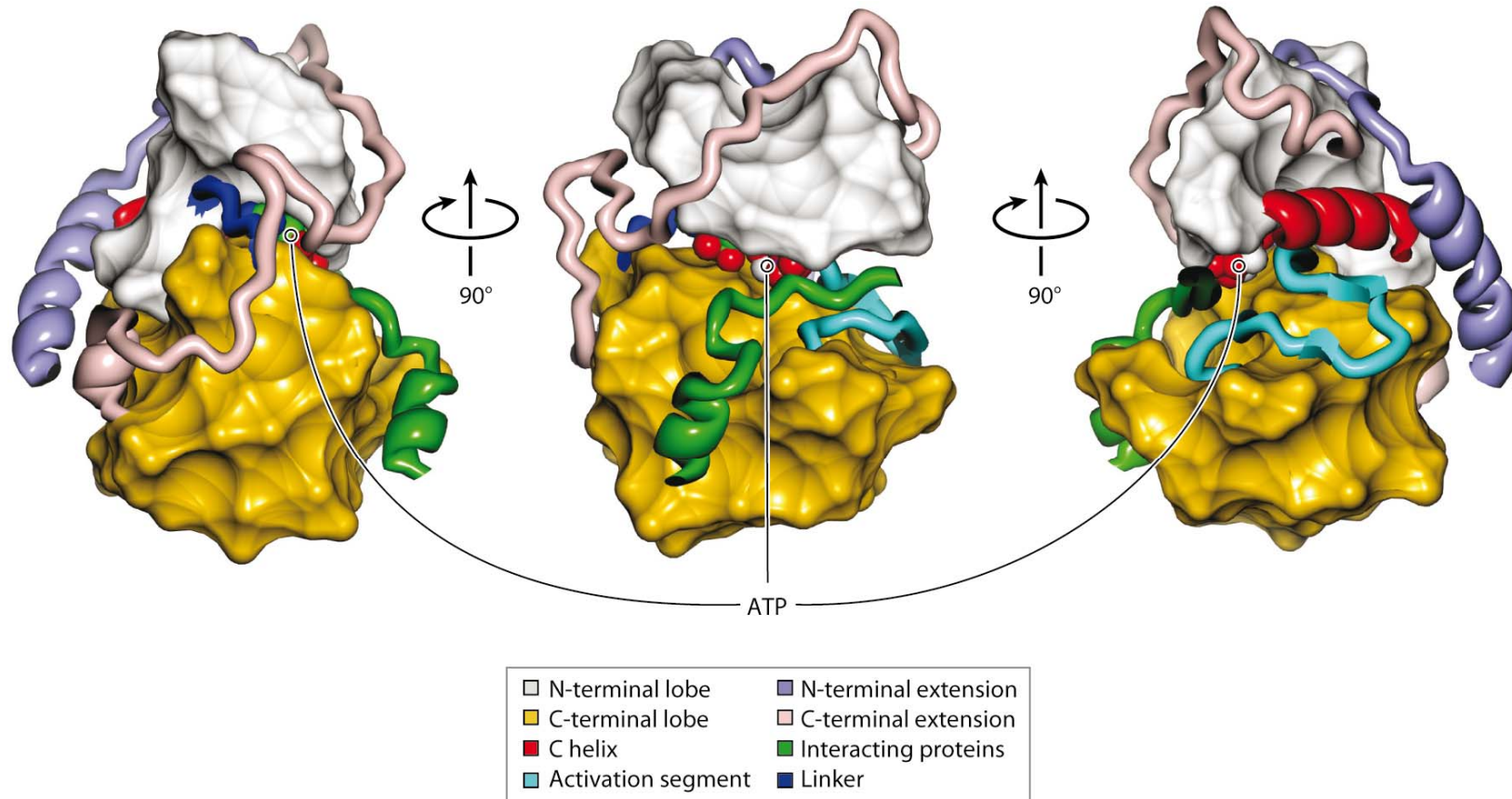
Πρωτεϊνικές κινάσες

- τρανσφεράσες (EC2)
- 500 γονίδια που εκφράζουν κινάσες (human kinome ~ 2% human genome)
- καταλύουν τη φωσφορυλίωση – ομοιοπολική τροποποίηση πρωτεϊνών



- κυτταρική ανάπτυξη, διαφοροποίηση, μεταβολισμό

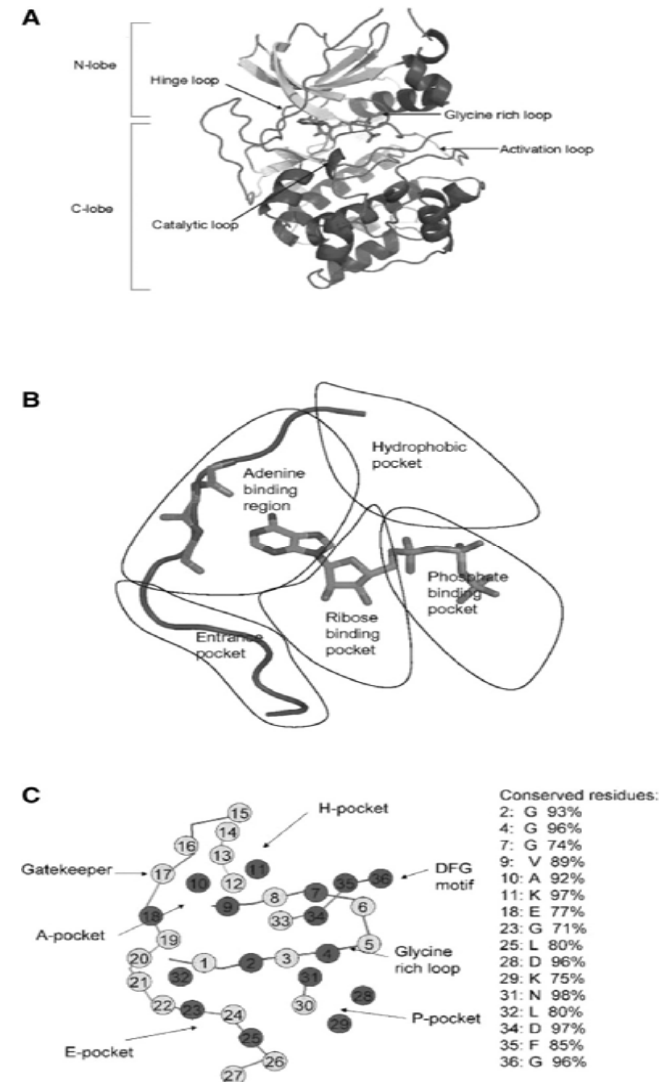
αρχιτεκτονική προτύπου πρωτεϊνικής κινάσης

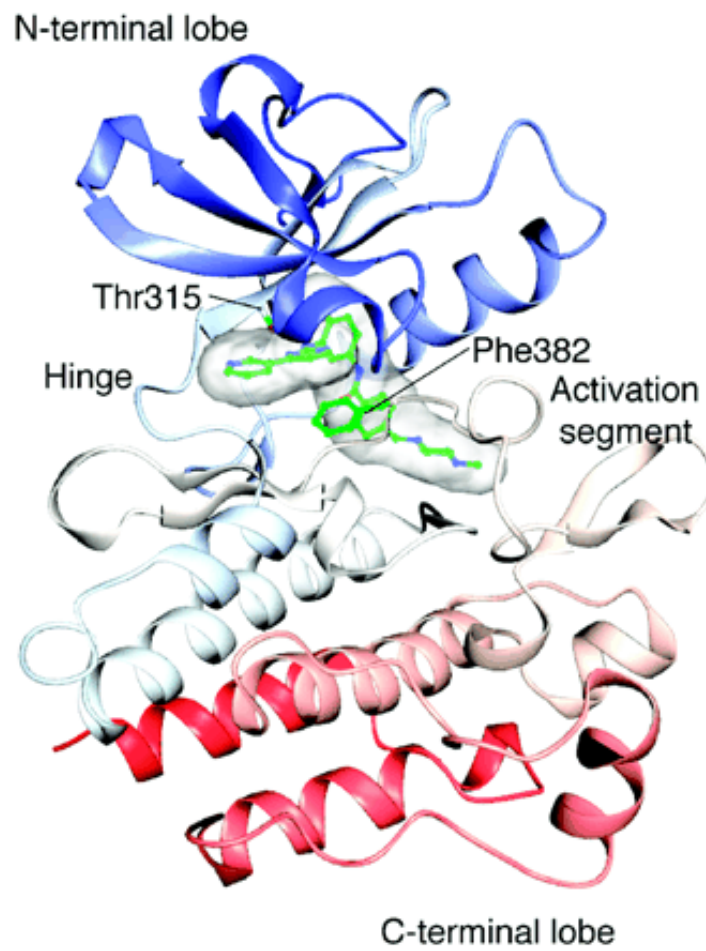
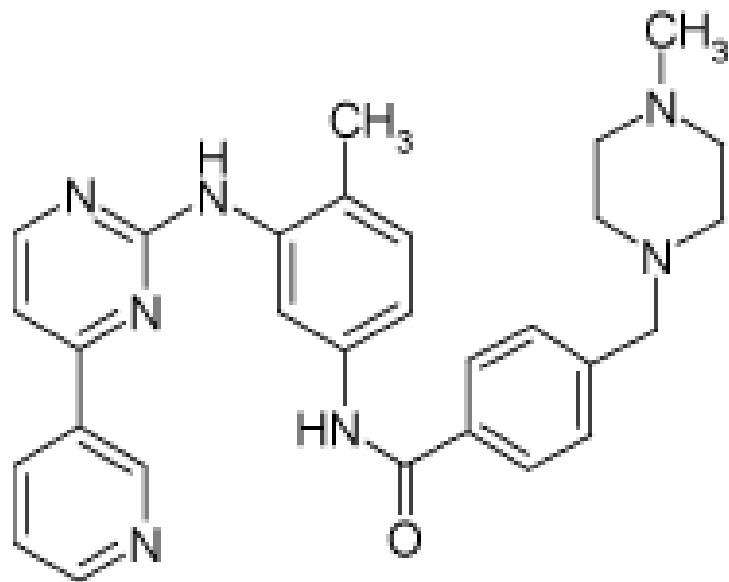


AR Endicott JA, et al. 2012.
Annu. Rev. Biochem. 81:587–613

Αναστολείς κινασών σε κλινική χρήση

- Στόχος κέντρο σύνδεσης ATP (adenine binding pockets, ribose binding pocket, p38 pocket, below adenine pocket, C-helix activation center)
- Εξειδίκευση (σάρωση κινασών 100-fold), χημική πρωτεομική
- Άλλα κέντρα σύνδεσης (recruitment sites)
- Ενεργή και ανενεργή διαμόρφωση
- Στόχοι για τουλάχιστον 10 φάρμακα σε κλινικές δοκιμές



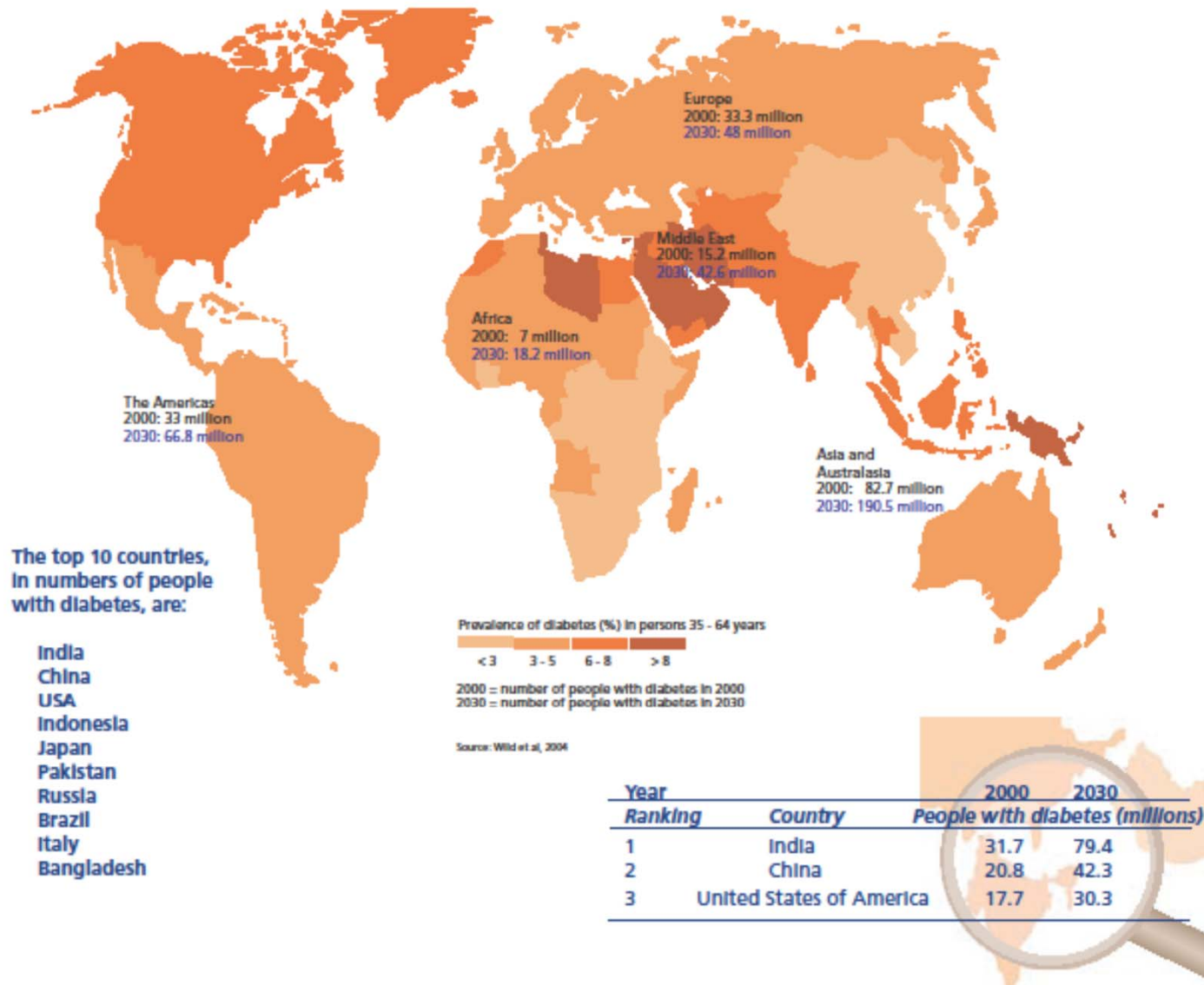


Noble, M., Endicott, J., Johnson, L.N.(2004) Protein Kinase Inhibitors:Insights into Drug Design from *Structure Science*, **303**, 1800-1805.

- Fasudil (Rho kinase, ROCK)
- Imatinib (Glivec)
- Dasatinib
- Gefitinib (Iressa)-(EGFR inhibitor)
- Erlotinib (Tarceva)
- Temsirolimus (παράγωγο της ραπαμυκίμης)- non ATP competitive

[Johnson LN](#). **kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds.** [Q Rev Biophys.](#) 2009 Feb;42(1):1-40. doi: 10.1017/S0033583508004745. Epub 2009 Mar 19.

Prevalence of diabetes



Εξαρτώμενος από την ινσουλίνη διαβήτης, τύπου 1 (IDDM)

Ανεπάρκεια παραγωγής ινσουλίνης-μερική καταστροφή των κυττάρων του παγκρέατος που εκκρίνουν ινσουλίνη (Β τύπου)

- αυτοάνοσο νόσημα
- γενετική προδιάθεση (40% σε διδύμους)
- περιβαλλοντική επίδραση (μολύνεις από ιούς)

Μη εξαρτώμενος από την ινσουλίνη διαβήτης τύπου 2 (NIDDM)

Αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη σε συνδυασμό με ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης

- οφείλεται σε πολλούς παράγοντες
- εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ηλικίες (>40)
- σχετίζεται με την παχυσαρκία
- γενετική προδιάθεση

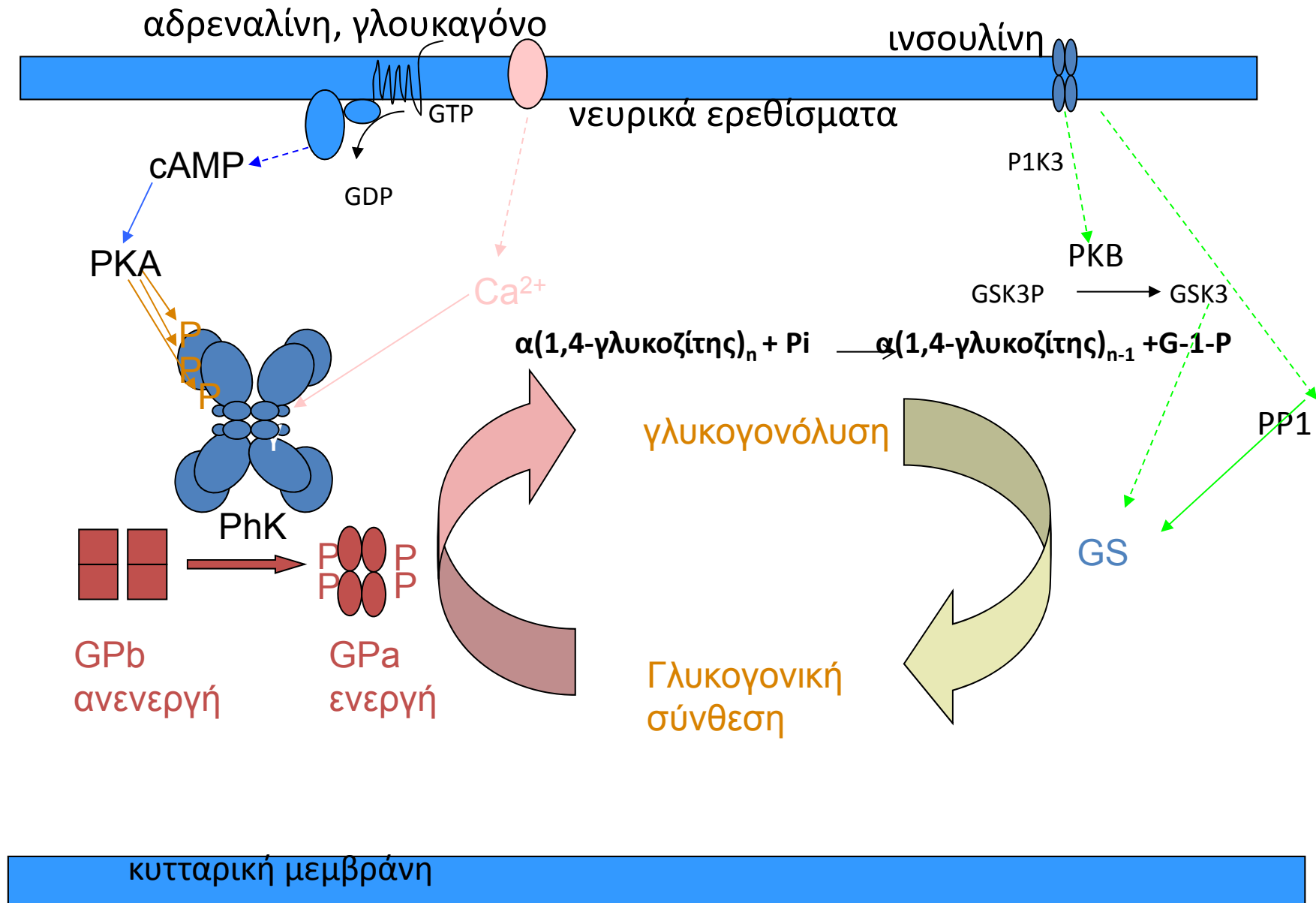
Διαβήτης τύπου 3

Περιγράφει όλες τις άλλες αιτίες αύξησης των συγκεντρώσεων γλυκόζης στο αίμα όπως ασθένειες που δεν σχετίζονται με το πάγκρεας, χρήση φαρμάκων κ.α

Διαβήτης της κύησης, τύπου 4 (GDM)

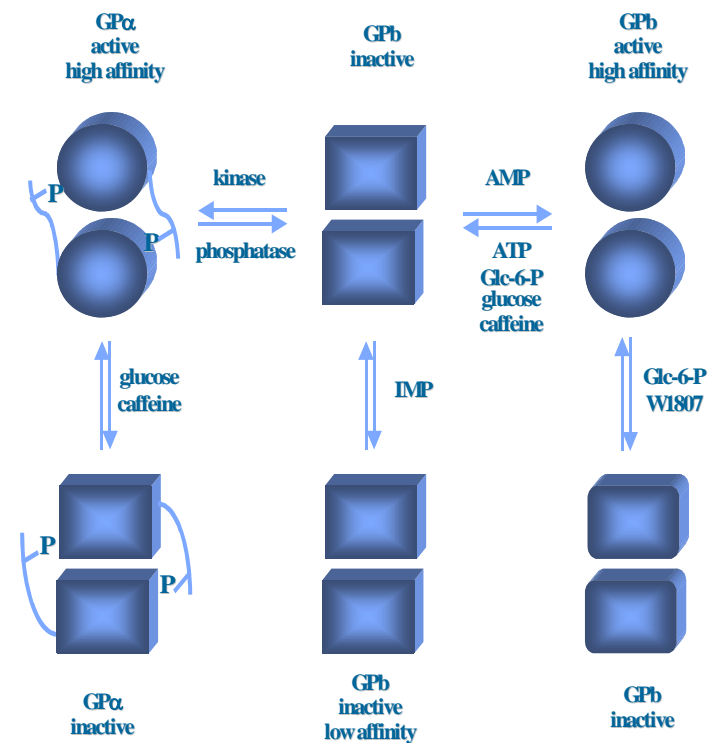
Παρατηρείται στους τελευταίους μήνες της κύησης λόγω αντίστασης στην ινσουλίνη που προκαλείται από τις ορμόνες του πλακούντα.

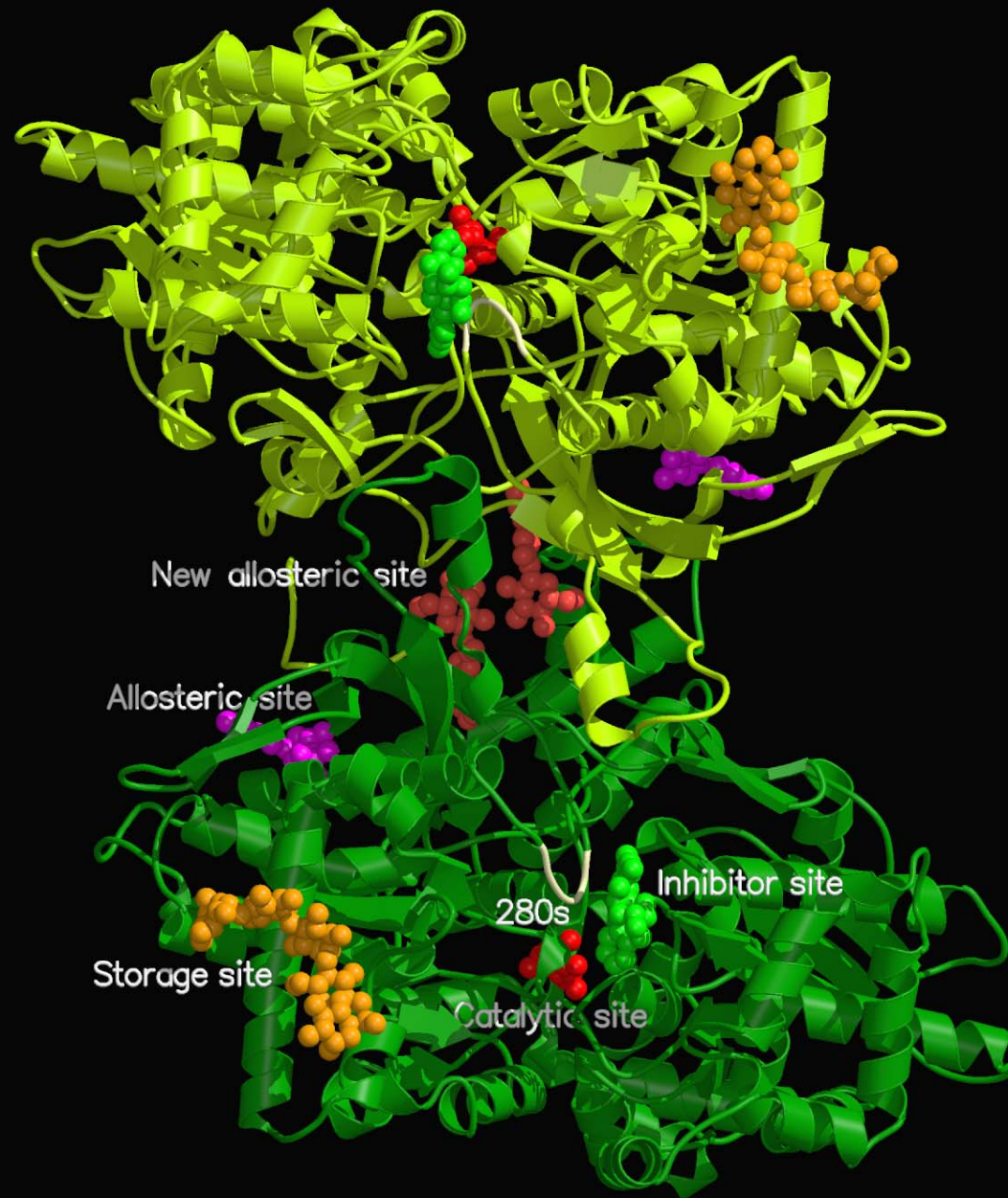
- Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)- διαβήτη τύπου 1
- United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)-διαβήτης τύπου 2
- ✓ Οι μακροχρόνιες επιπλοκές του διαβήτη σχετίζονται με τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα
- ✓ Υπογλυκαιμία ως παρενέργεια

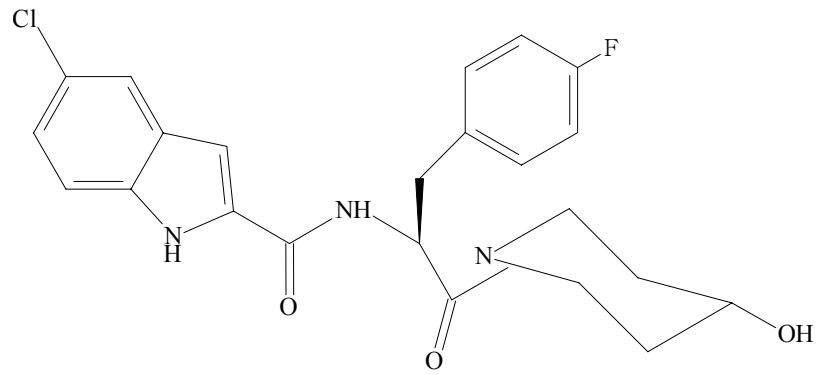


Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP)

- MB=97.4 KDa, 842 αμινοξέα
σύνδεση μέσω Schiff βάσης με
Lys 680 με φωσφορική
πυριδοξάλη (PLP)
- Ρύθμιση μέσω
φωσφορυλίωσης
GPb ανενεργή απουσία AMP
GPa ενεργή
- Στο μυ αλλοστερική ρύθμιση
σύμφωνα με το μοντέλο
Monod-Wyman-Changeux
(T state)
(R state)

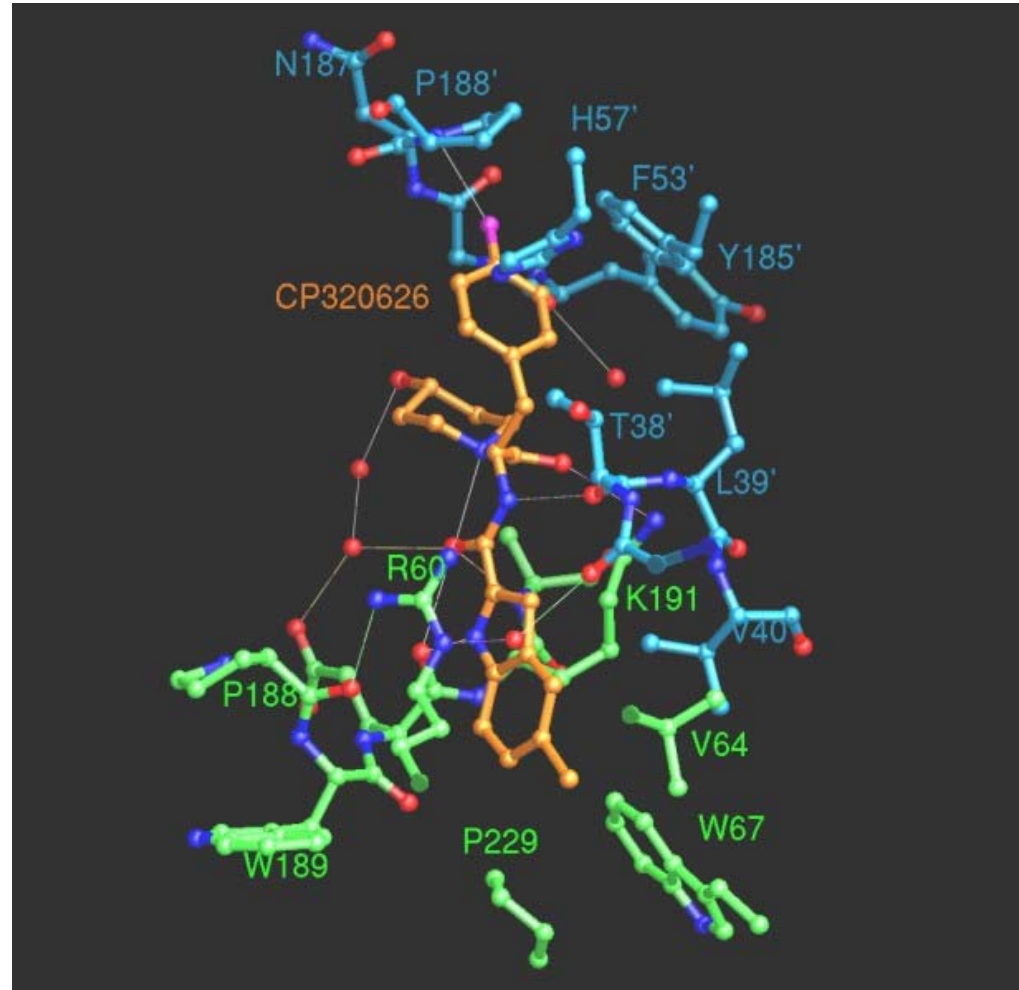






CP320,626

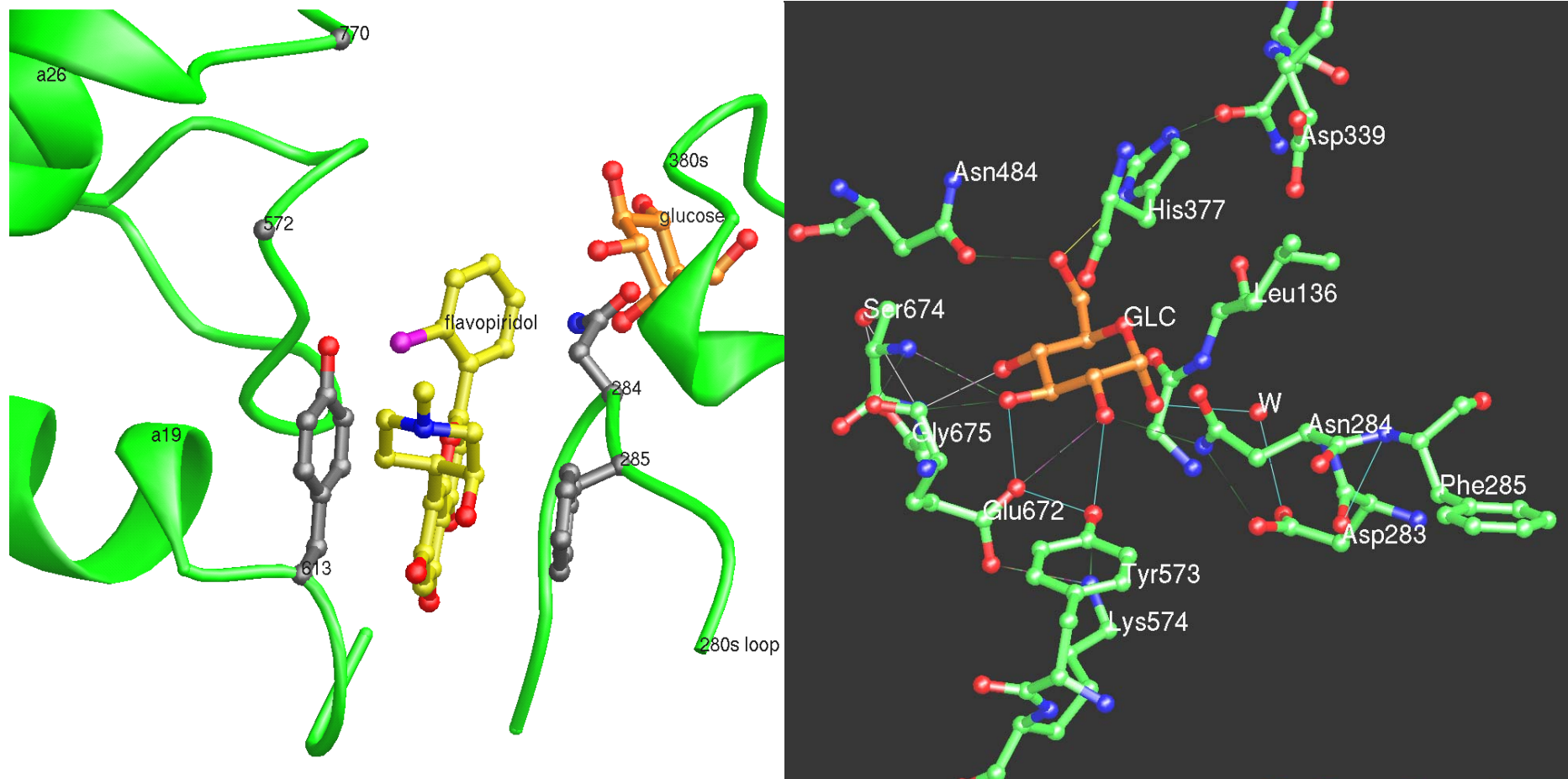
IC₅₀ = 178 nM



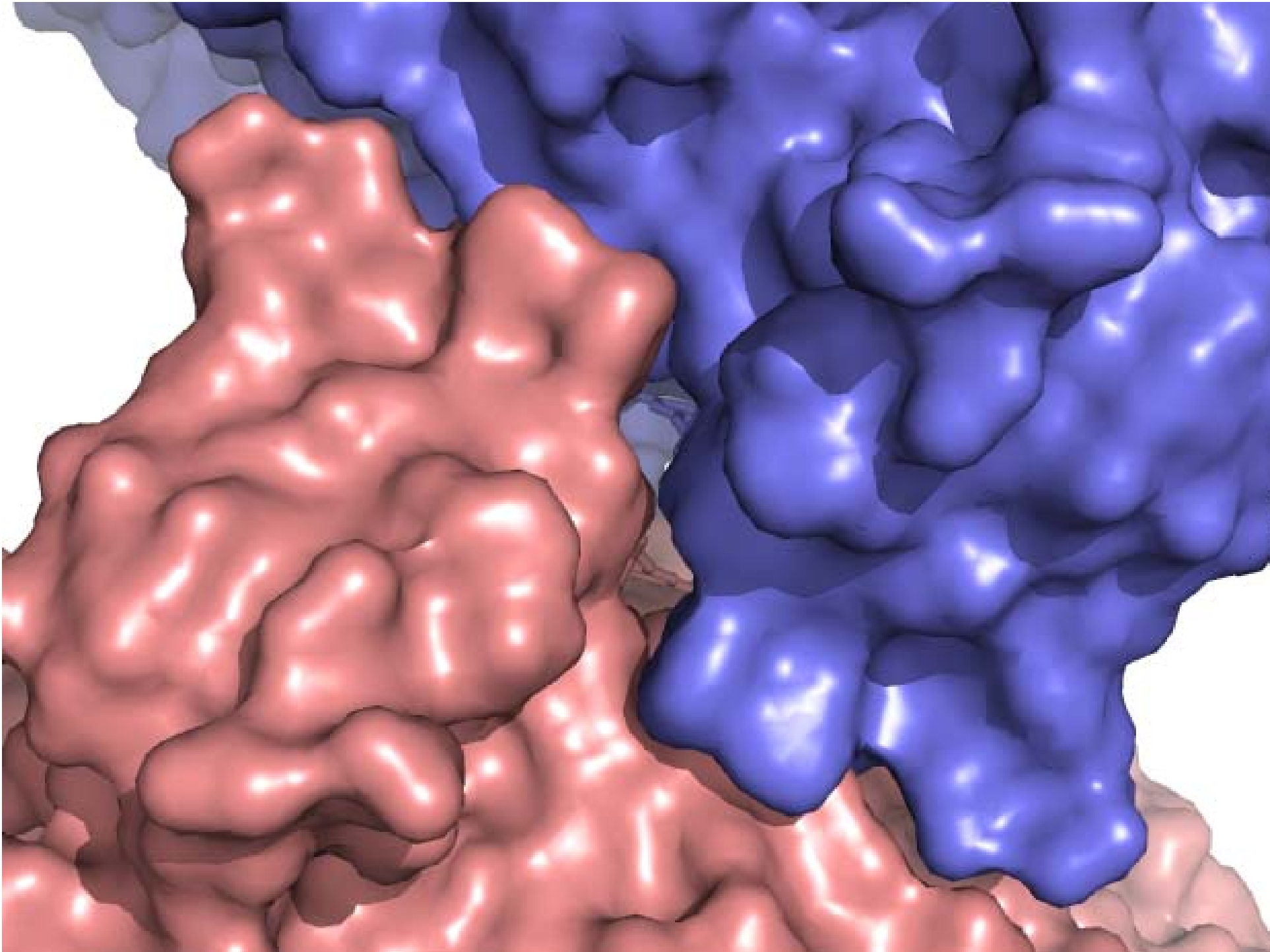
Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G. & Johnson, L.N. (2000).
A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* **8**, 575-584.

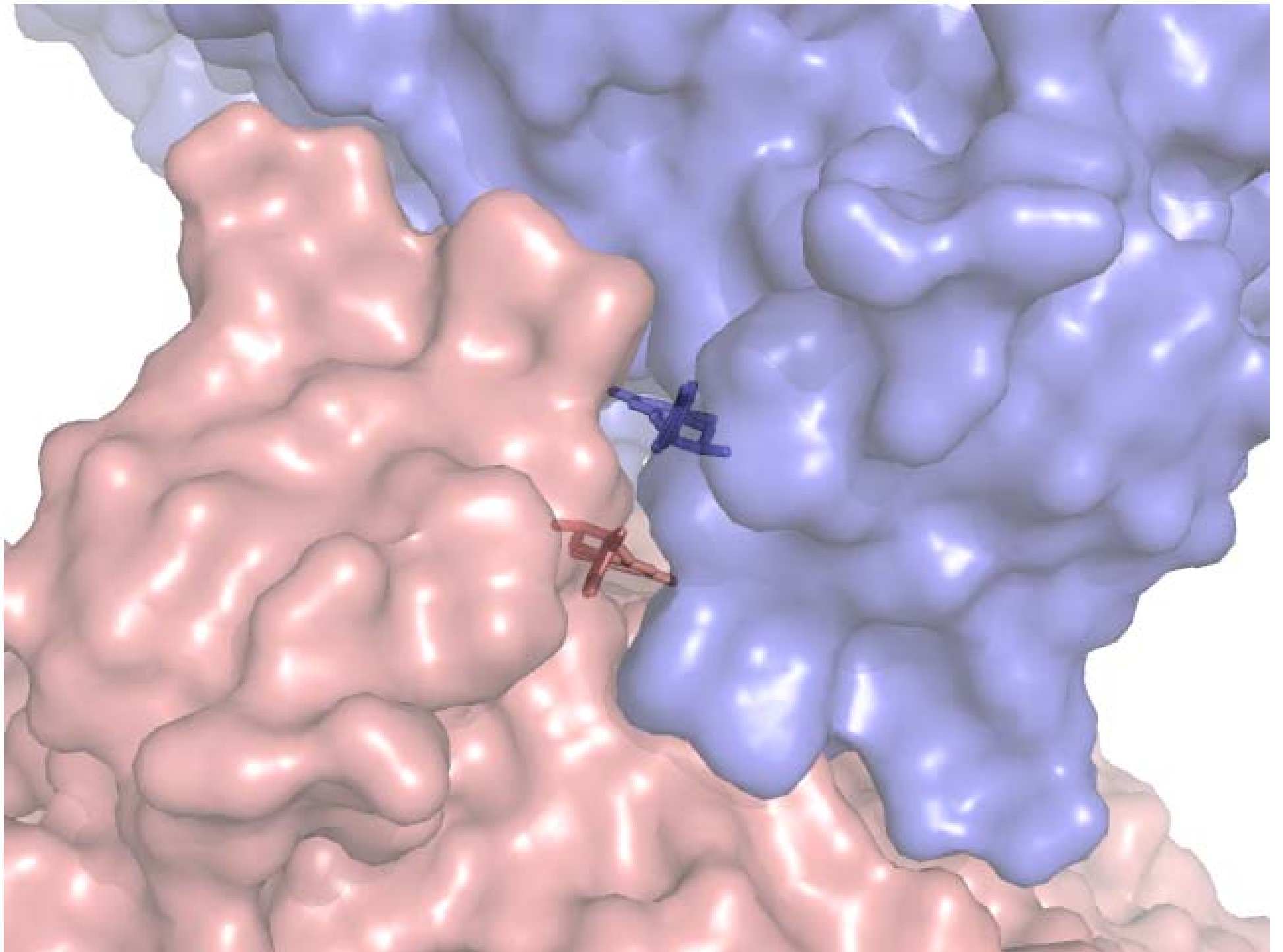
Σύνδεση αναστολέα στον drug binding site της GP

Σύνδεση αναστολέα στο κέντρο σύνδεσης αναστολέων της GP



Oikonomakos, N.G., Schnier, J.B., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E. & Johnson, L.N. (2000). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.*, **3**, 34566-73.





Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) ως μοριακός στόχος ;

- Αναστολή PhK ↓

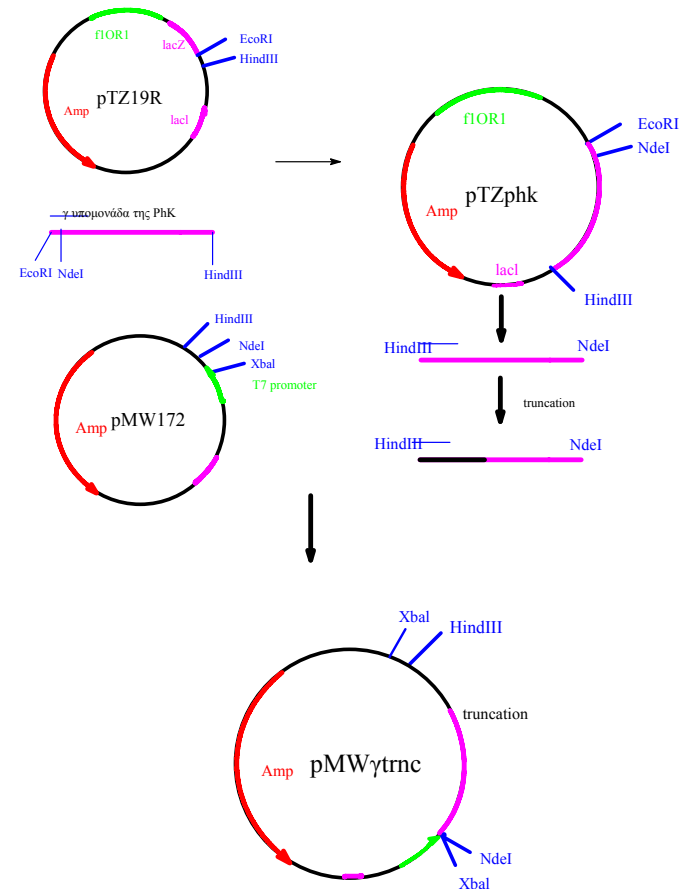
διάσπαση του γλυκογόνου ↓
σύνθεση του γλυκογόνου ↑

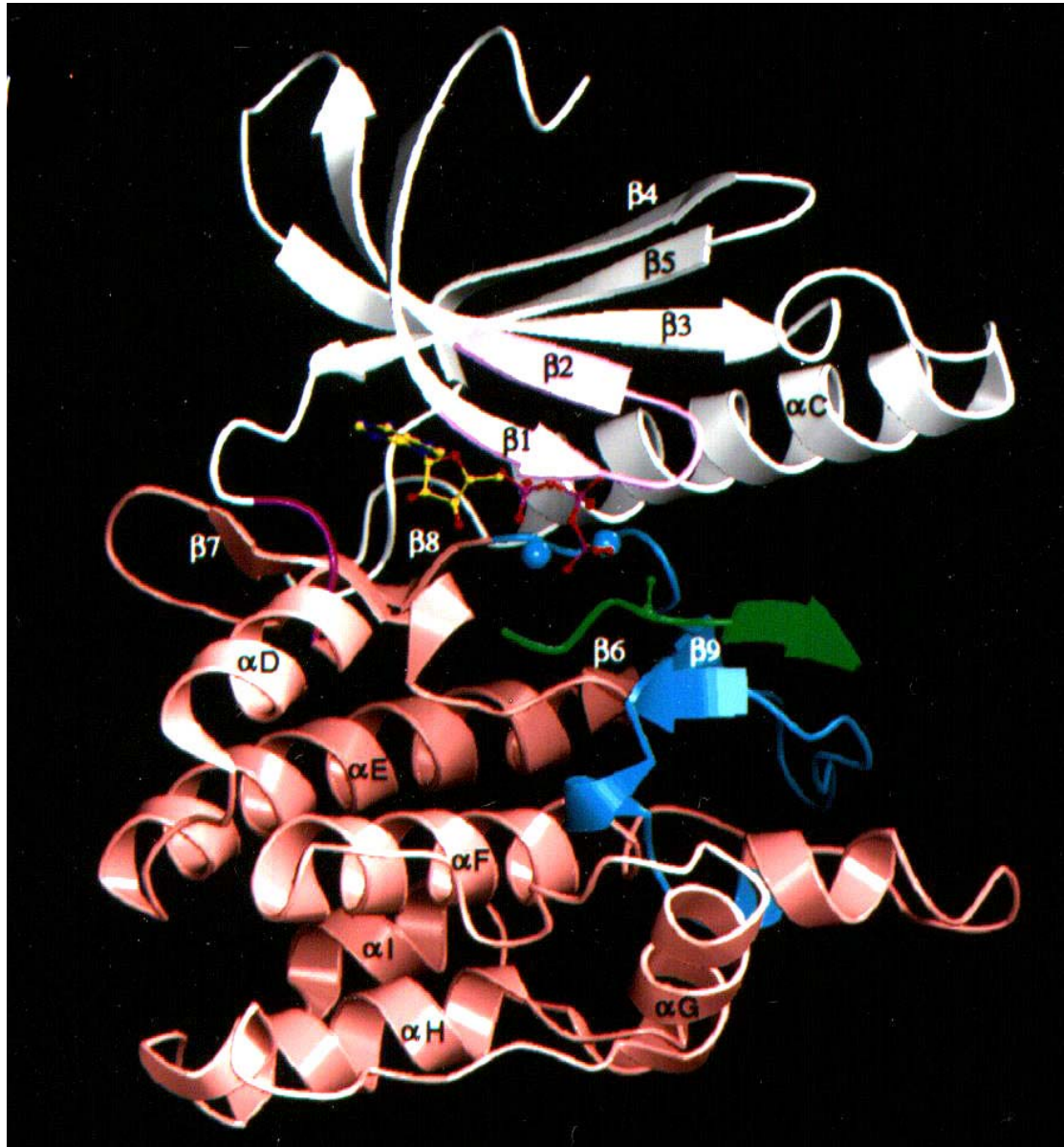
υπεργλυκαιμία ↓

- Χαμηλές ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις PhK ↓
- Πολλοί ισχυροί αναστολείς κινασών δρουν συναγωνιστικά προς το ATP

η αρχή της ιστορίας.....

- γ καταλυτική υπομονάδα (αα 1-386) – ανενεργή (autoinhibition)
- Πρωτεόλυση (αα 290,296,298)
- Δημιουργία φορέων έκφρασης της κολοβομένης PhK γ , PhK γ trnc, (δραστική)





Lowe, E.D., Noble, M.E.M., Skamnaki, V.T., Oikonomakos, N.G., Owen, D.J. & Johnson, L.N. (1997).
The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition.
EMBO J. **16**, 6646-6658.

Ετερόλογη
έκφραση γ
καταλυτικής
υπομονάδας σε
E.coli

Κρυσταλλογραφία
ακτίνων -Χ

Δομή συμπλόκου
καταλυτικής υπομονάδας
με πεπτιδικό υπόστρωμα

μελέτες μεταλλαγμένης

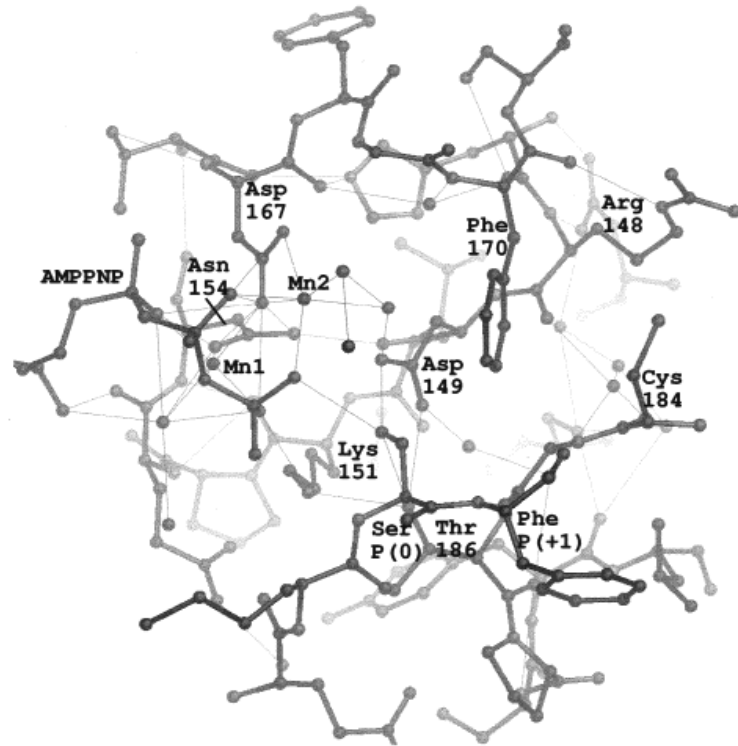


Table 3: Kinetic Parameters of PhK and Mutant Enzymes

enzyme	[GPb] variable substrate			[ATP] variable substrate		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1} s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1} s^{-1}$)
WT	66.7 ± 2	8.9 ± 0.6	7.5	56.7 ± 2	105 ± 10	0.54
D149A	.005	34.9 ± 4.6	1.4×10^{-4}	.0043	930 ± 31	4.6×10^{-6}
D149N	0.013 ± 0.001	10.3 ± 0.5	1.26×10^{-3}	0.013 ± 0.001	123 ± 12.6	1.1×10^{-4}
E182S	3.3 ± 0.3	17.8 ± 0.3	0.18	3.0 ± 0.3	135 ± 14	0.02
R148A	15 ± 2	18.6 ± 3.4	0.80	10.0 ± 2	316 ± 10	0.03
Y206F	6.7 ± 0.2	12.6 ± 1.2	0.53	6.2 ± 0.2	221.0 ± 13	0.03

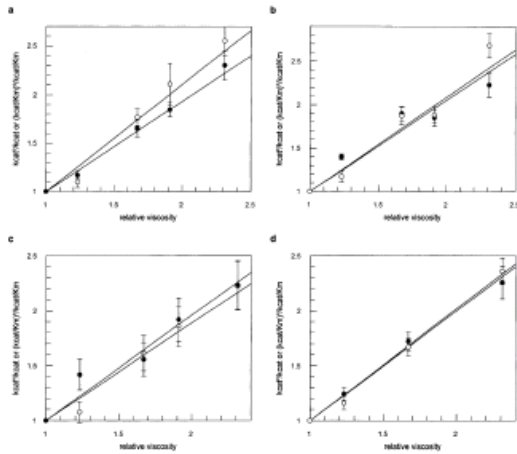
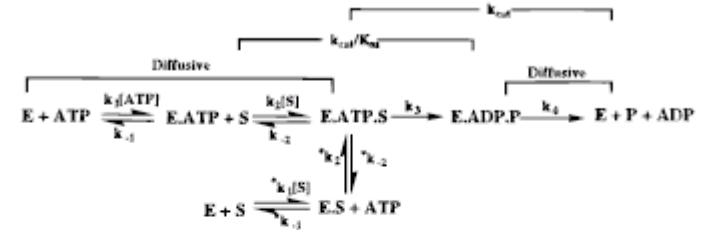


FIGURE 2. Dependence of the steady-state kinetic parameter for GPb on the relative viscosity of the solution (50 mM Tris, 50 mM Heps, 0.5 mM CaCl_2 , 2 mM DTT, 10 mM magnesium acetate, pH 8.2, 30 °C). k_{cat}/K_m (○) and $k_{\text{cat}}/K_m \cdot [K_m/K_m]$ (●) are the values of the observed k_{cat} and k_{cat}/K_m values in the absence and presence of microc, respectively. (a) Variable GPb (where [GPb] = 0.3–10 mg/ml) and saturating ATP ([ATP] = 1.5 mM). The slope of the k_{cat}/K_m is 1.10 ± 0.17 and that of $(k_{\text{cat}}/K_m) \cdot [K_m/K_m]$ is 0.93 ± 0.04 . (b) Saturating GPb (where [GPb] = 5 mg/ml) and variable ATP ([ATP] = 0.05–1.5 mM). The slope of the k_{cat}/K_m is 1.084 ± 0.15 and that of $(k_{\text{cat}}/K_m) \cdot [K_m/K_m]$ is 1.05 ± 0.13 . (c) Low GPb (where [GPb] = 0.3 mg/ml) and variable ATP ([ATP] = 0.05–1.5 mM). The slope of k_{cat}/K_m is 0.89 ± 0.000 and that of $(k_{\text{cat}}/K_m) \cdot [K_m/K_m]$ is 0.96 ± 0.10 . (d) Low ATP (where [ATP] = 0.05 mM) and variable GPb ([GPb] = 0.3 mg/ml = 10 mg/ml). The slope of the k_{cat}/K_m is 1.00 ± 0.06 and that of $(k_{\text{cat}}/K_m) \cdot [K_m/K_m]$ is 1.02 ± 0.06 .

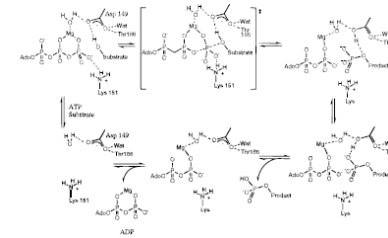
Estimates of the Microscopic Rate Constants for the Kinetic Scheme from Viscosity Measurements



- $k_1 = 0.2 \pm 0.03 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ calcd from eqs 5 and 6 for nonsaturating conditions
- $k_2 = 5.79 \pm 0.5 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ calcd from eqs 2 and 4 when [ATP] is saturating
- $k_3 \geq 360 \text{ s}^{-1}$ estimated from eq 1 using error limits on slopes
- $k_4 = 28.6 \pm 2.3 \text{ s}^{-1}$
- $k_{-1} \leq 16.8 \text{ s}^{-1}$ calcd from eq 6 for nonsaturating [GPb]
- $k_{-2} \geq 27 \text{ s}^{-1}$ from eq 4 when [ATP] is saturating
- $k_{-1}/k_1 \leq 84 \mu\text{M}$
- $k_{-2}/k_2 \geq 4.7 \mu\text{M}$
- $*k_1 = 2.7 \pm 0.2 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ from eqs 5 and 6 when [ATP] is low
- $*k_2 = 0.39 \pm 0.03 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ from eqs 2 and 4 when GPb is saturated
- $*k_{-1} = 15.8 \text{ s}^{-1}$ from eqs 5 and 6 when [ATP] is low
- $*k_{-2} \leq 32.8 \text{ s}^{-1}$ as estimated from eq 4 when GPb is saturated
- $*k_{-1}/*k_1 = 5.8 \mu\text{M}$
- $*k_{-2}/*k_2 \leq 84 \mu\text{M}$

Table 3: Kinetic Parameters of PhK and Mutant Enzymes

enzyme	[GPb] variable substrate			[ATP] variable substrate		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
WT	66.7 ± 2	8.9 ± 0.6	7.5	56.7 ± 2	105 ± 10	0.54
D149A	.005	34.9 ± 4.6	1.4×10^{-4}	.0043	930 ± 31	4.6×10^{-6}
D149N	0.013 ± 0.001	10.3 ± 0.5	1.26×10^{-3}	0.013 ± 0.001	123 ± 12.6	1.1×10^{-4}
E182S	3.3 ± 0.3	17.8 ± 0.3	0.18	3.0 ± 0.3	135 ± 14	0.02
R148A	15 ± 2	18.6 ± 3.4	0.80	10.0 ± 2	316 ± 10	0.03
Y206F	6.7 ± 0.2	12.6 ± 1.2	0.53	6.2 ± 0.2	221.0 ± 13	0.03



Skamnaki, V.T., Owen, D.J., Noble, M.E.M., Lowe, E.D., Oikonomakos, N.G. & Johnson, L.N. (1999). The catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies. *Biochemistry*, **38**, 14718-14730.

Επίδραση του ιξώδους στις κινητικές παραμέτρους σταθεράς κατάστασης

$$k_{\text{cat}} = k_3 k_4 / (k_3 + k_4) \quad (1)$$

$$k_{\text{cat}} / K_m = k_2 k_3 / (k_{-2} + k_3) \quad (2)$$

$$(k_{\text{cat}})^{\eta} = k_3 / (k_3 + k_4^0) \quad (3)$$

$$(k_{\text{cat}} / K_m)^{\eta} = k_3 / (k_{-2}^0 + k_3) \quad (4)$$

$$k_{\text{cat}} / K_m = [(k_1 k_3 [S]) / (k_{-2} / k_2)] / [k_3 [S] / (k_{-2} / k_2) + k_{-1}] \quad (5)$$

$$(k_{\text{cat}} / K_m)^{\eta} = [(k_3 [S]) / (k_{-2} / k_2)] / [k_3 [S] / (k_{-2} / k_2) + k_{-1}] \quad (6)$$

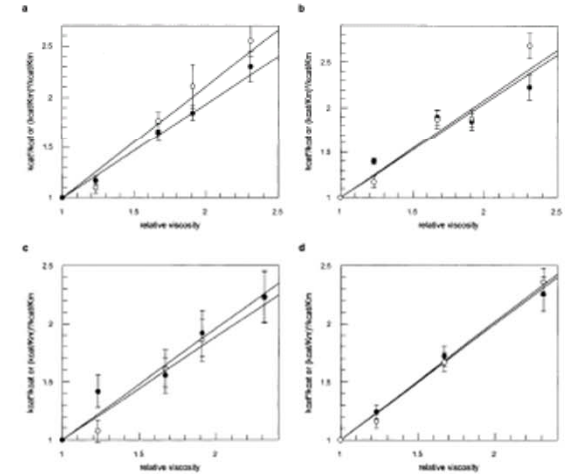
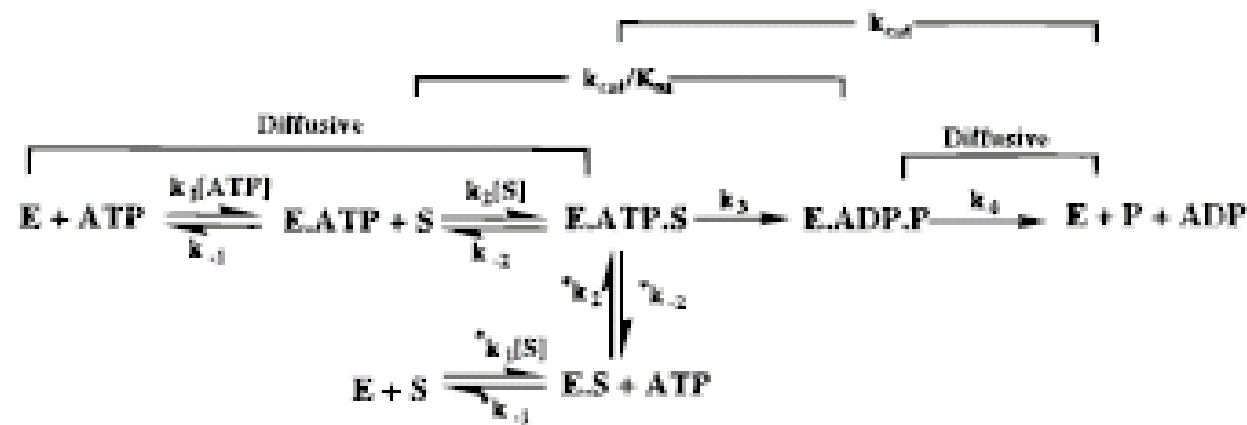


Figure 2. Dependence of the steady-state kinetic parameters for GTP on the relative viscosity of the solution (50 mM Tris, 50 mM HEPES, 0.5 mM CaCl₂, 2 mM DTT, 10 mM magnesium acetate, pH 8.2, 30 °C). k_{cat}/K_m (○) and $(k_{\text{cat}}/K_m)^{\eta}$ (●) are the ratios of the observed k_{cat} and k_{cat}/K_m values in the absence and presence of microtubules, respectively. (a) Variable GTP (where [GTP] = 0.5–10 mg/ml) and constant ATP ([ATP] = 1.5 mM). The slope of the k_{cat}/K_m is 1.10 ± 0.17 and that of $(k_{\text{cat}}/K_m)^{\eta}$ (k_{cat}/K_m) is 0.93 ± 0.04 . (b) Constant GTP (where [GTP] = 5 mg/ml) and variable ATP ([ATP] = 0.06–1.5 mM). The slope of the k_{cat}/K_m is 1.084 ± 0.15 and that of $(k_{\text{cat}}/K_m)^{\eta}$ (k_{cat}/K_m) is 1.05 ± 0.13 . (c) Low GTP (where [GTP] = 0.5 mg/ml) and variable ATP ([ATP] = 0.06–1.5 mM). The slope of k_{cat}/K_m is 0.99 ± 0.009 and that of $(k_{\text{cat}}/K_m)^{\eta}$ (k_{cat}/K_m) is 0.96 ± 0.10 . (d) Low ATP (where [ATP] = 0.05 mM) and variable GTP (where [GTP] = 0.5 mg/ml, = 10 mg/ml). The slope of the k_{cat}/K_m is 1.00 ± 0.06 and that of $(k_{\text{cat}}/K_m)^{\eta}$ (k_{cat}/K_m) is 1.02 ± 0.04 .

Estimates of the Microscopic Rate Constants for the Kinetic Scheme from Viscosity Measurements



$k_1 = 0.2 \pm 0.03 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ calcd from eqs 5 and 6 for nonsaturating conditions

$k_2 = 5.79 \pm 0.5 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ calcd from eqs 2 and 4 when [ATP] is saturating

$k_3 \geq 360 \text{s}^{-1}$ estimated from eq 1 using error limits on slopes

$k_4 = 28.6 \pm 2.3 \text{s}^{-1}$

$k_{-1} \leq 16.8 \text{s}^{-1}$ calcd from eq 6 for nonsaturating [GPb]

$k_{-2} \geq 27 \text{s}^{-1}$ from eq 4 when [ATP] is saturating

$k_{-1}/k_1 \leq 84 \mu\text{M}$

$k_{-2}/k_2 \geq 4.7 \mu\text{M}$

$*k_1 = 2.7 \pm 0.2 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ from eqs 5 and 6 when [ATP] is low

$*k_2 = 0.39 \pm 0.03 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ from eqs 2 and 4 when GPb is saturated

$*k_{-1} = 15.8 \text{s}^{-1}$ from eqs 5 and 6 when [ATP] is low

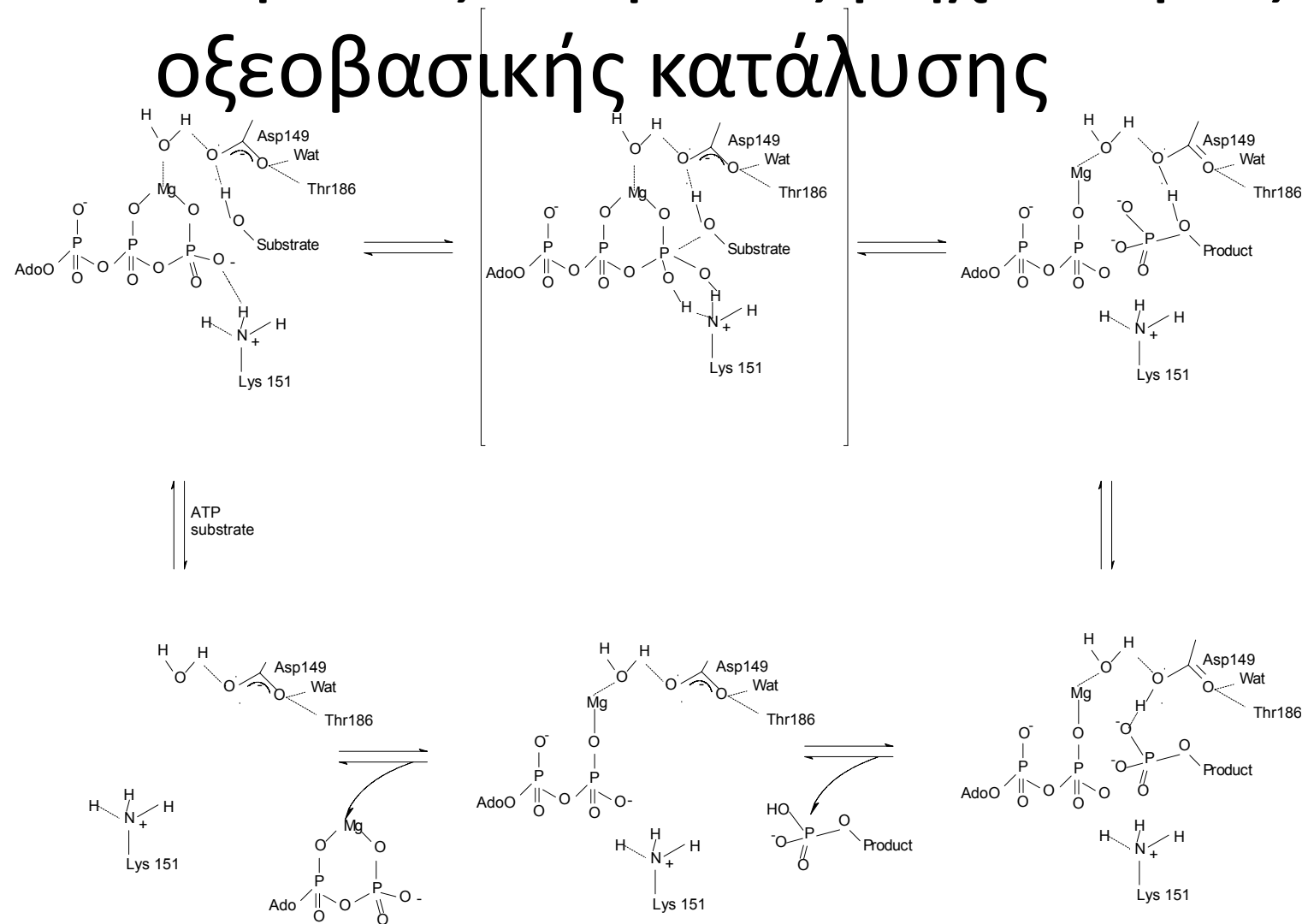
$*k_{-2} \leq 32.8 \text{s}^{-1}$ as estimated from eq 4 when GPb is saturated

$*k_{-1}/*k_1 = 5.8 \mu\text{M}$

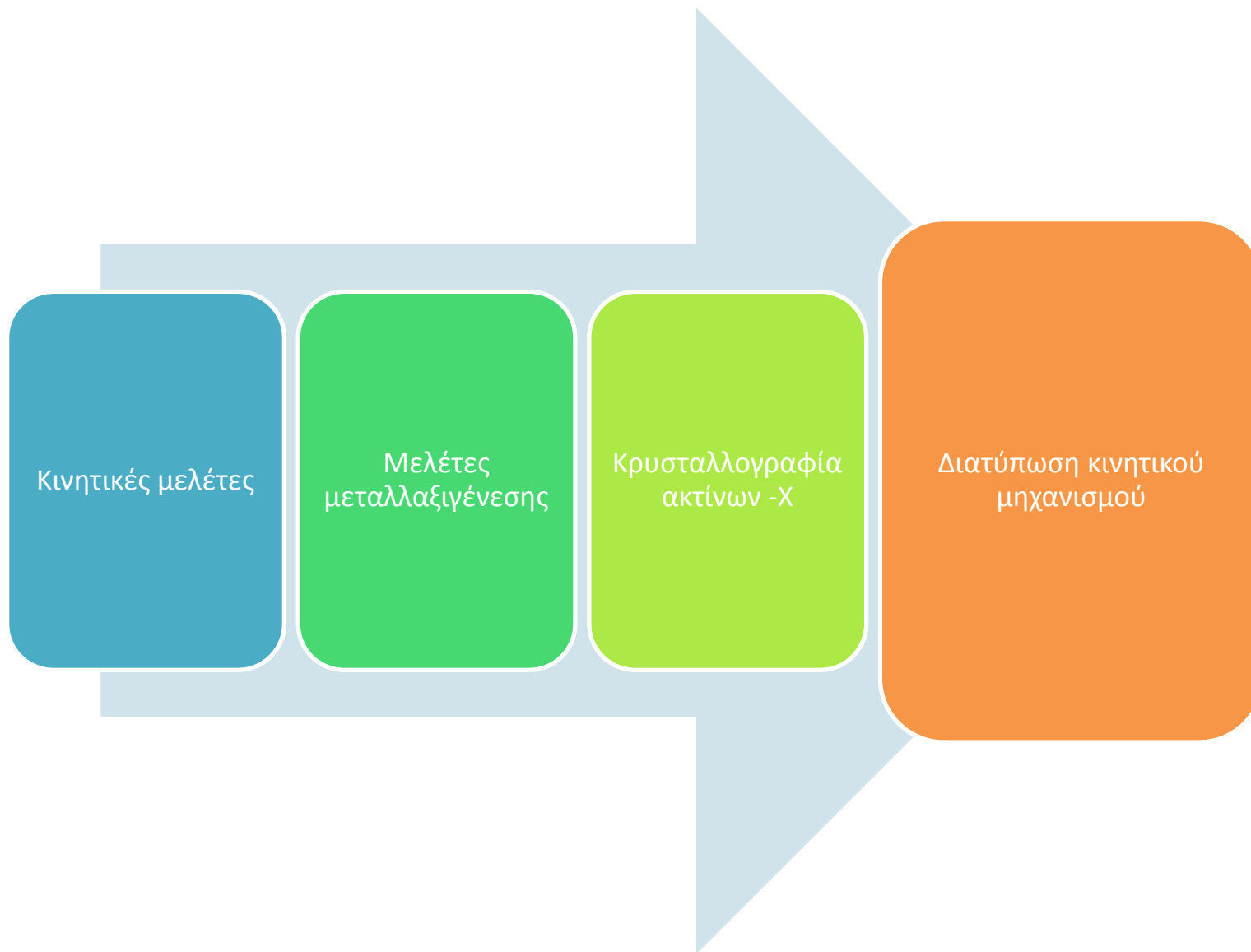
$*k_{-2}/*k_2 \leq 84 \mu\text{M}$

Η ανάλυση των κινητικών παραμέτρων σταθερής κατάστασης , για την αντίδραση της PhKγtrnc, ως προς το φυσικό υπόστρωμα GPb, είναι σύμφωνη με ένα κινητικό μηχανισμό (**random bi-bi**) όπου η **απελευθέρωση των προϊόντων** αποτελεί καθοριστικό βήμα της ταχύτητας αντίδρασης (**rate-limiting step**)

προτεινόμενος κινητικός μηχανισμός οξεοβασικής κατάλυσης

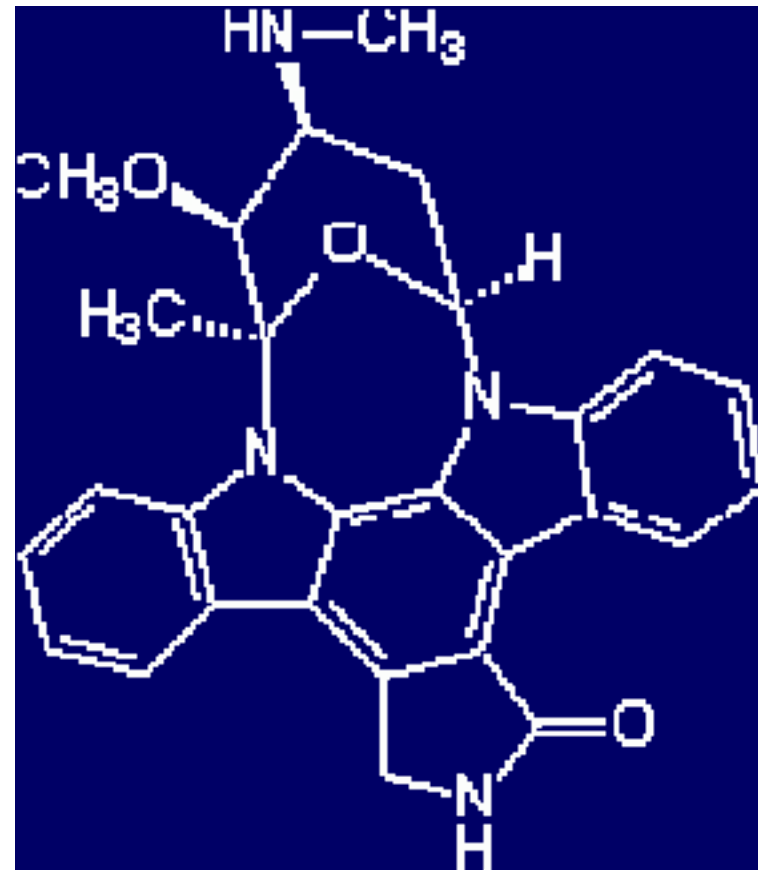


Skamnaki, V.T., Owen, D.J., Noble, M.E.M., Lowe, E.D., Oikonomakos, N.G. & Johnson, L.N. (1999). *Biochemistry*, **38**, 14718-14730.



Σταυροσπορίνη

- ένωση –μοντέλο για το σχεδιασμό φαρμάκων
- προϊόν του μεταβολισμού *Streptomyces* sp.
- Ισχυρός αναστολέας πληθώρας πρωτεϊνικών κινασών
- τοξική

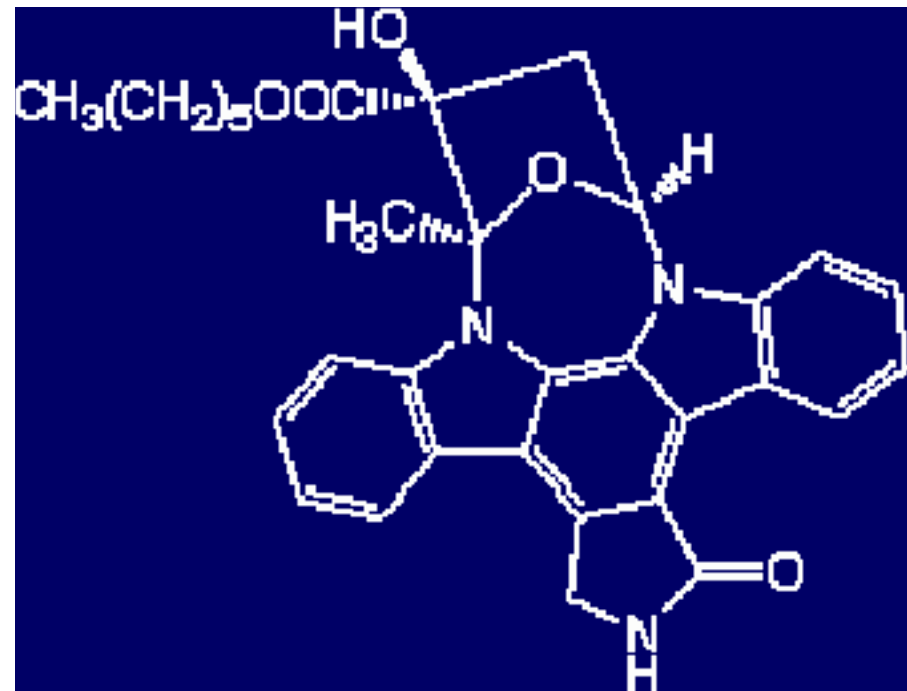


KT5720

- Παράγωγο της σταυροσπορίνης

<u>Protein kinase</u>	<u>IC50</u>
PDK1	0.3 μM
PKA	3.3 μM
CDK2/A	>0.3 μM

- Ισχυρός αναστολέας της PhK



Συναγωνιστική αναστολή της PhKγtrnc από τη σταυροσπορίνη και το ανάλογο της KT5720

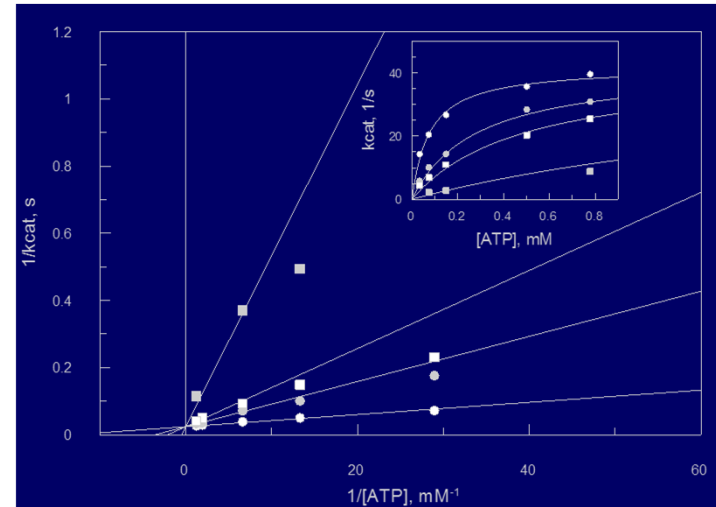
[Σταυροσπορίνη]= 0,1,2,10 nM

[ATP]= 0.035-0.8 mM

[GPb]=5 mg/ml

[PhKγtrnc]=6 ng/ml

$K_i = 0.37 \pm 0.03$ nM



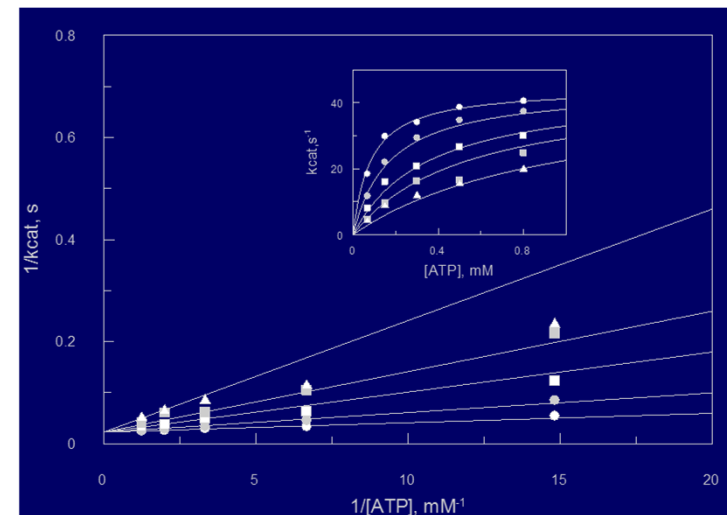
[KT5720]= 0, 20, 60,100, 200 nM

[ATP]= 0.035-0.8 mM

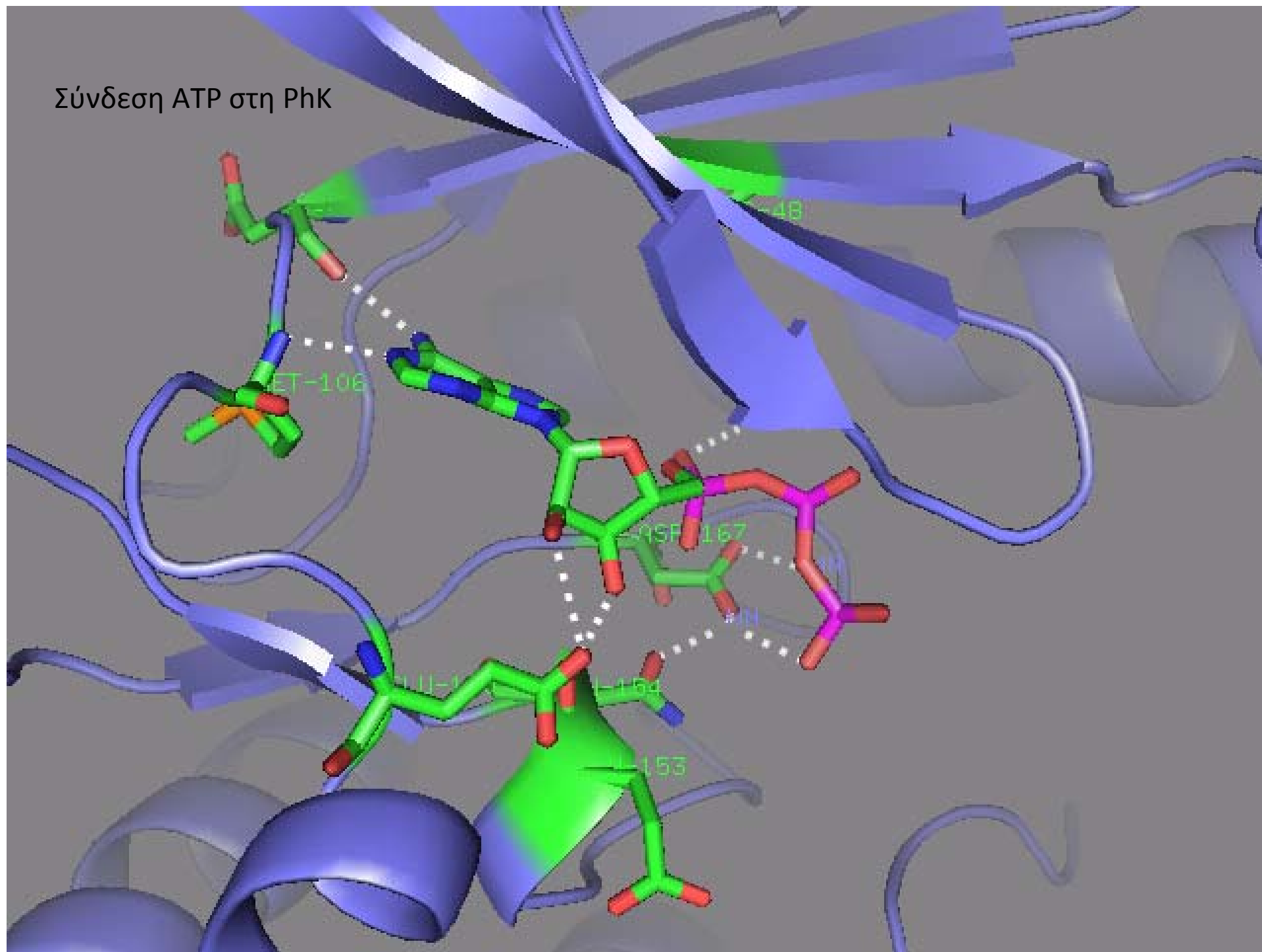
[GPb]=3 mg/ml

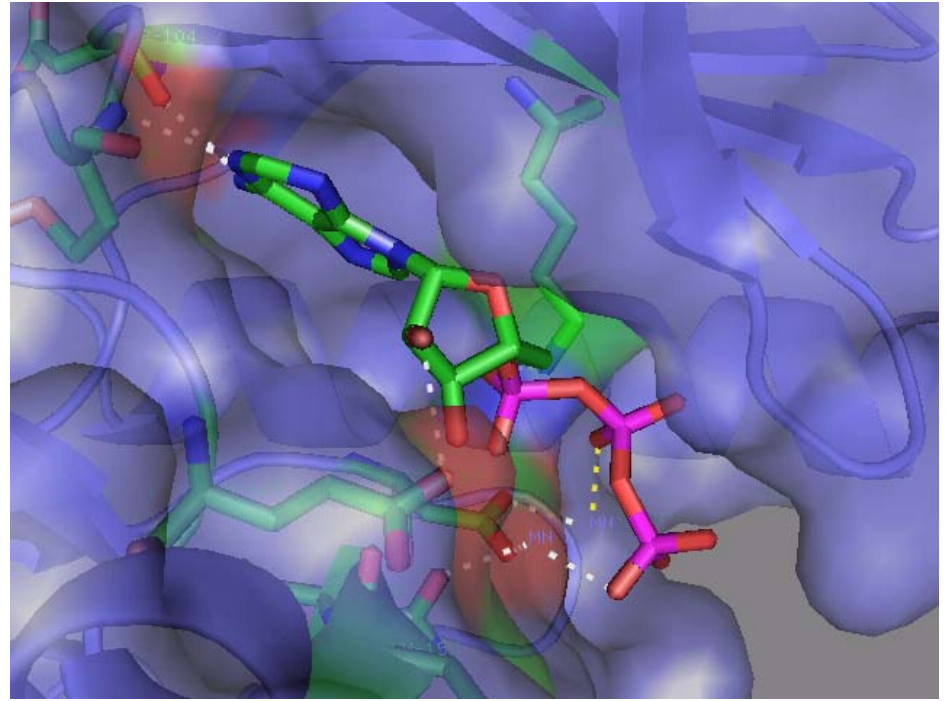
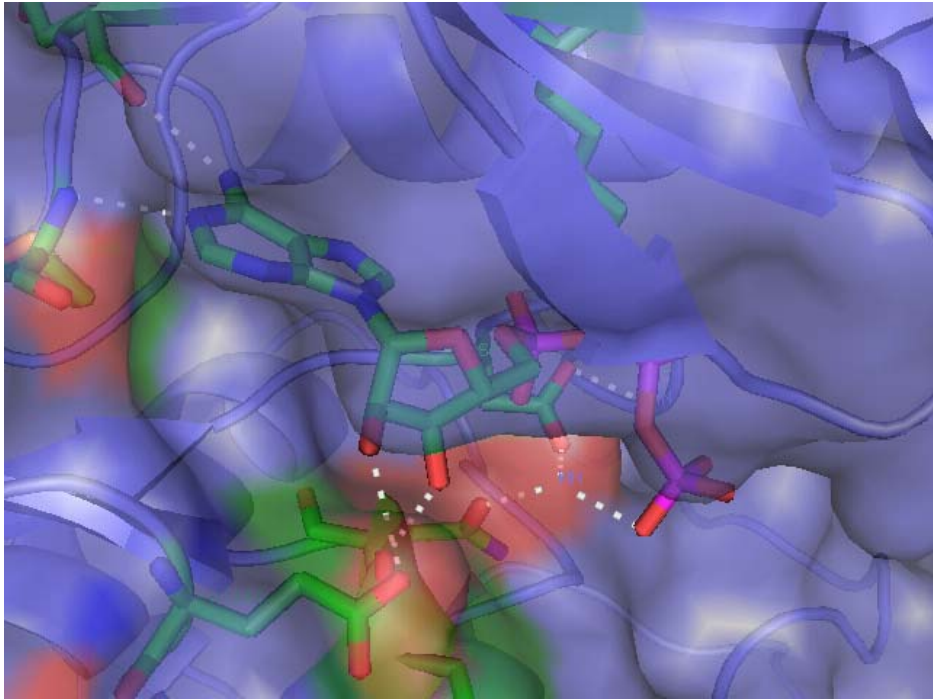
[PhKγtrnc]=6 ng/ml

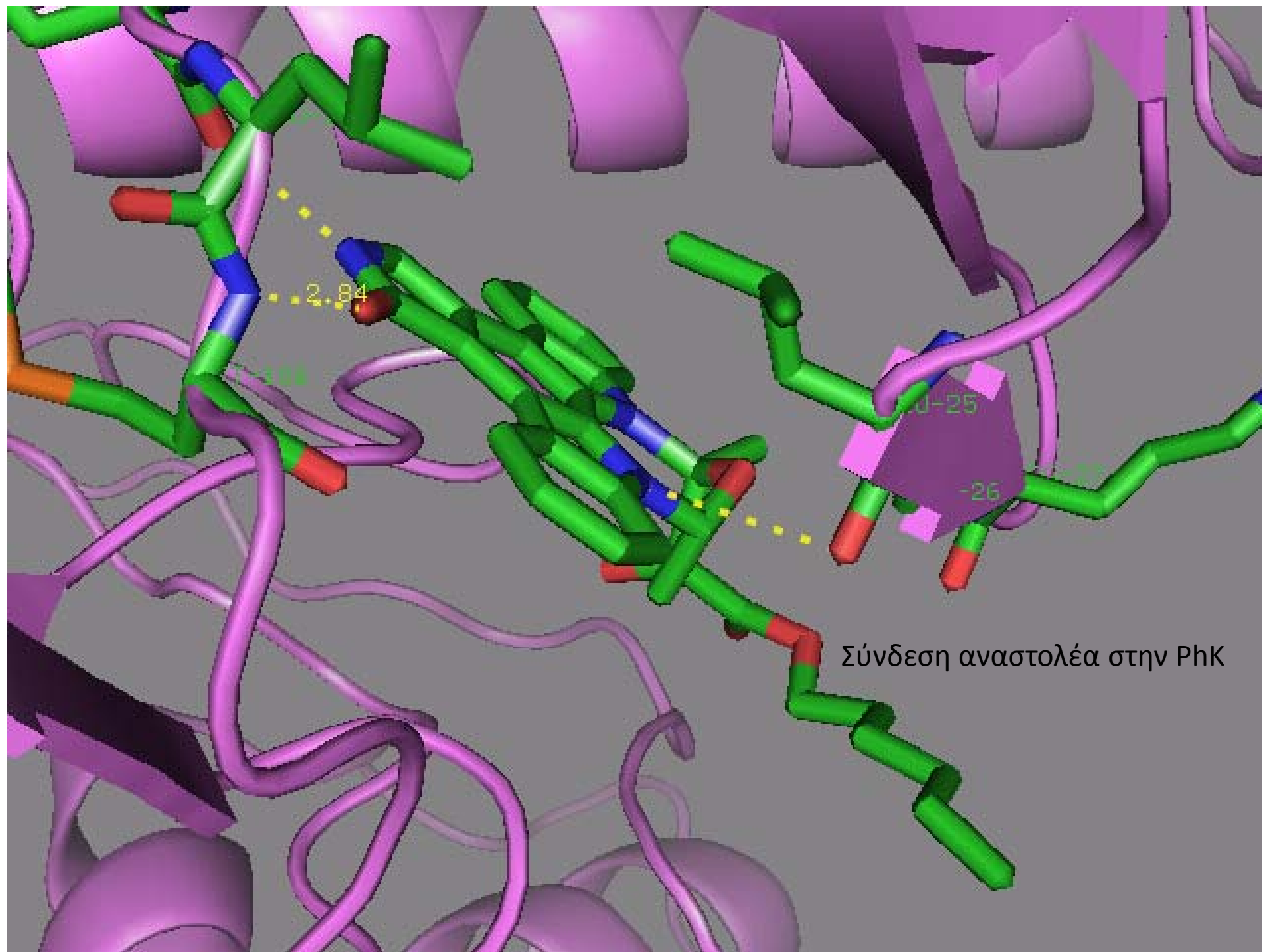
$K_i = 18.40 \pm 2.60$ nM

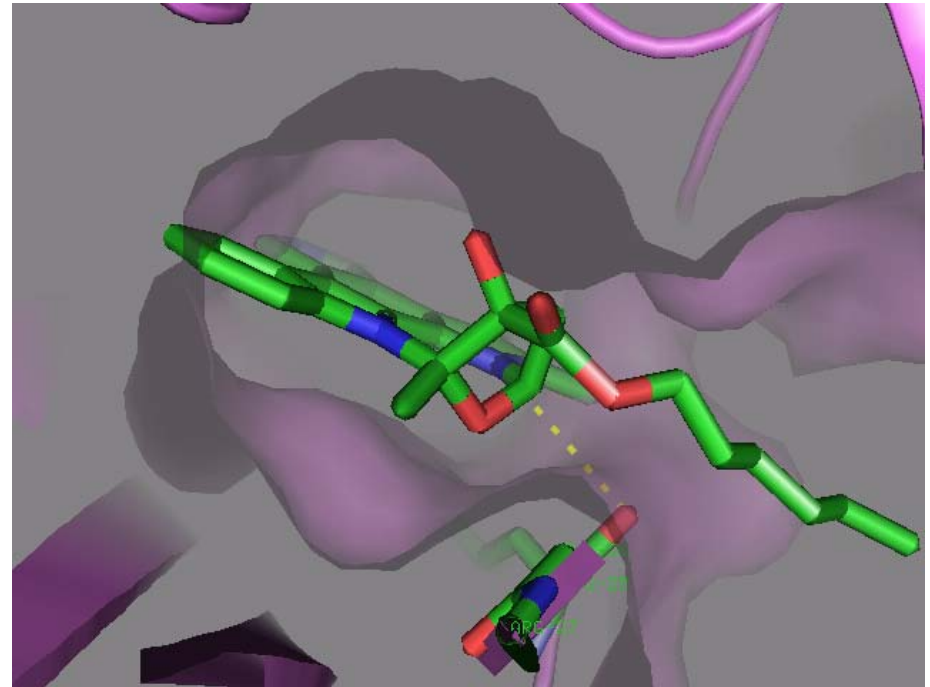
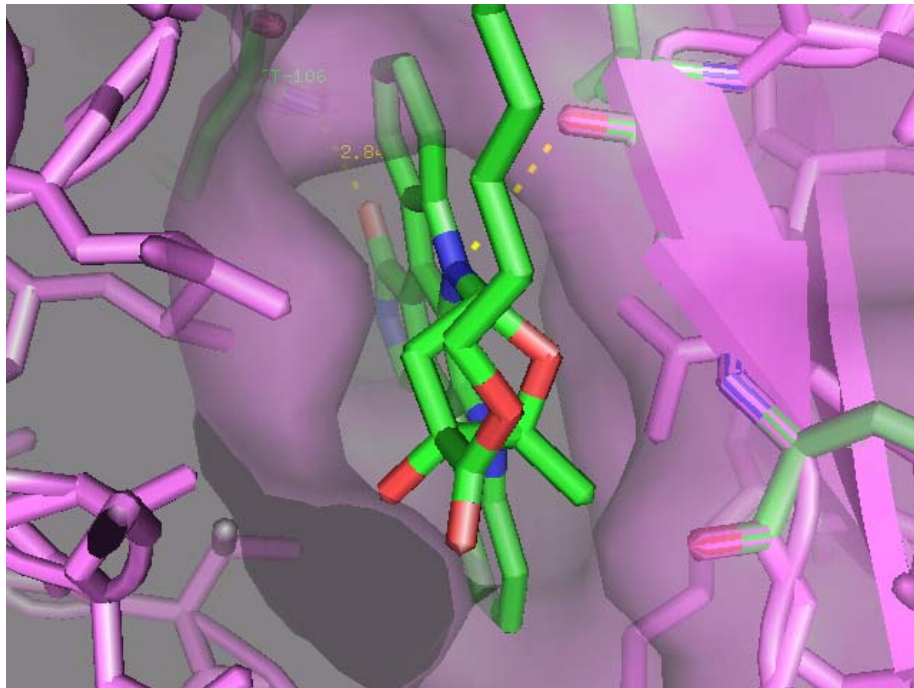


Σύνδεση ATP στη PhK









In silico μελέτες

- In silico docking
- Molecular dynamics

Kinetics, *in silico* docking, molecular dynamics, and MM-GBSA binding studies on prototype indirubins, KT5720, and staurosporine as phosphorylase kinase ATP-binding site inhibitors: The role of water molecules examined

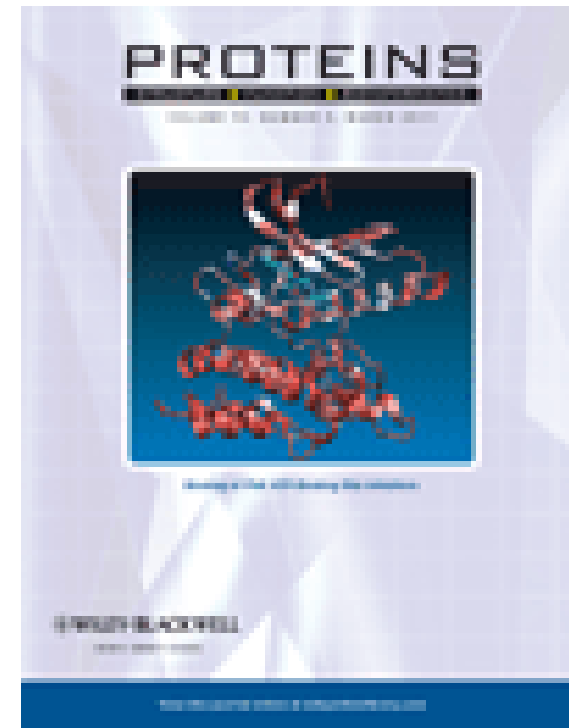
Joseph M. Hayes^{1,*}, Vicky T. Skamnaki^{1,2}, Georgios Archontis³, Christos Lamprakis¹, Josephine Sarrou¹,

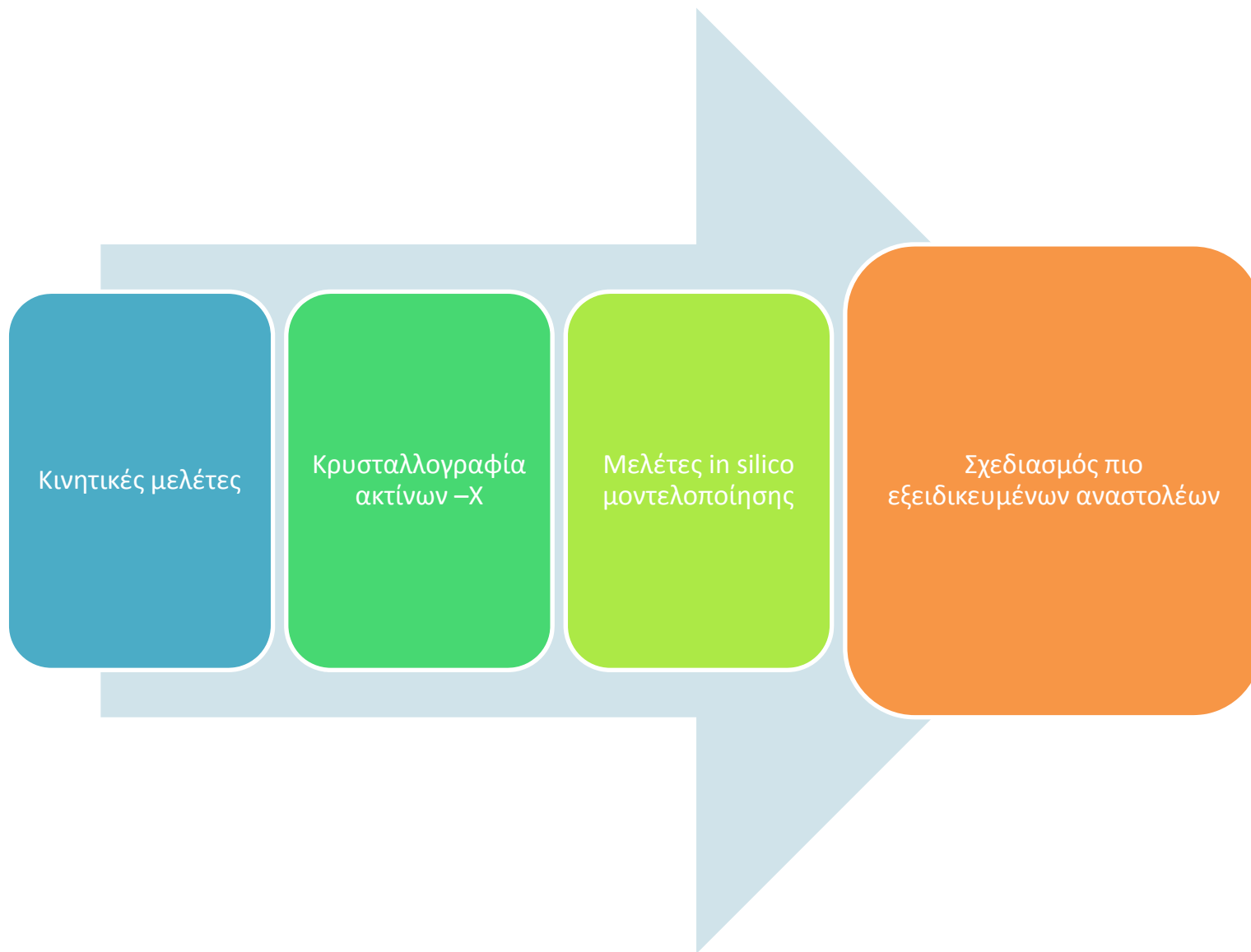
Nicolas Bischler¹, Alexios-Leandros Skaltsounis⁴, Spyros E.

Zographos¹, Nikos G. Oikonomakos^{1,†}

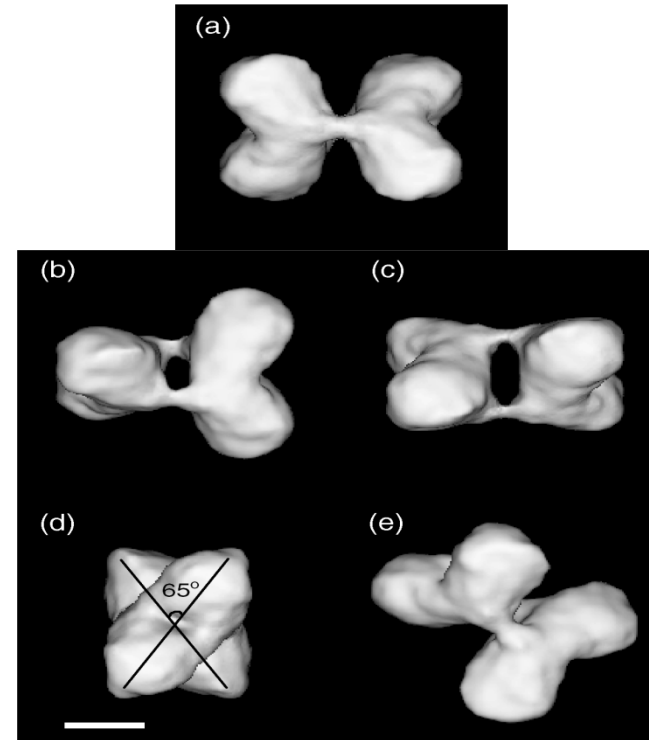
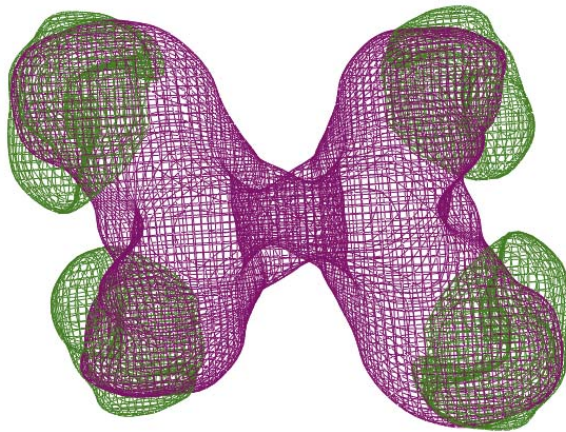
Article first published online: 3 DEC 2010

DOI: 10.1002/prot.22890





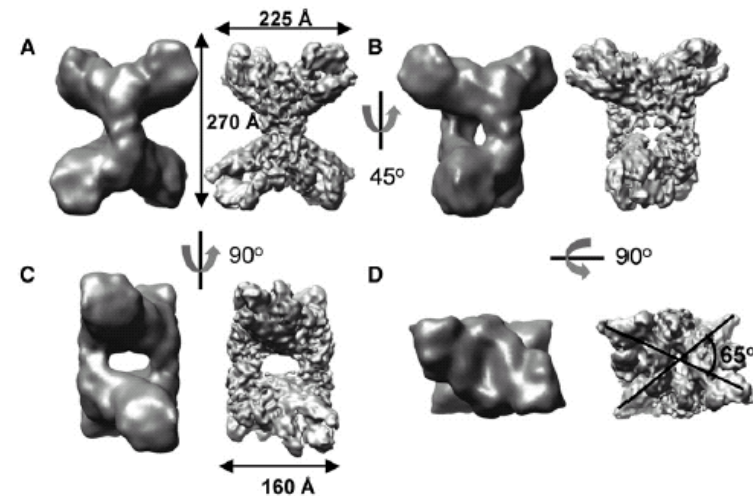
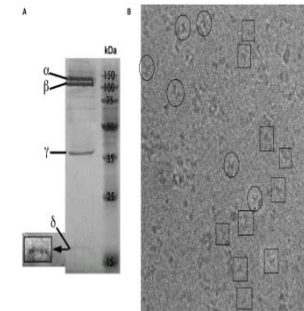
Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK)



Venien-Bryan, C., Lowe, E., Boisset, N., Taxler, K., Johnson, L., Carlson, G. (2002)
Three-dimensional Structure of Phosphorylase Kinase at 22 Å Resolution and its Complex
with Glycogen Phosphorylase B *Structure*, **10**, 33-41.

- MB= 1,300,000
- Ετεροτετραμερές μόριο με στοιχειομετρία δεκαεξαμερούς (αβγδ)₄ ή (α'βγδ)₄
- Οι α, α', β υπομονάδες είναι ρυθμιστικές, η γ υπομονάδα είναι η καταλυτική και η δ είναι καλμοδουλίνη

- pH 8.2, +Ca²⁺, PhK active
 - Cryoconditions
 - 3D δομή από 18,123 De-focus particles
- Spider



[Structure](https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.013). 2009 Jan 14;17(1):117-27. doi: 10.1016/j.str.2008.10.013.

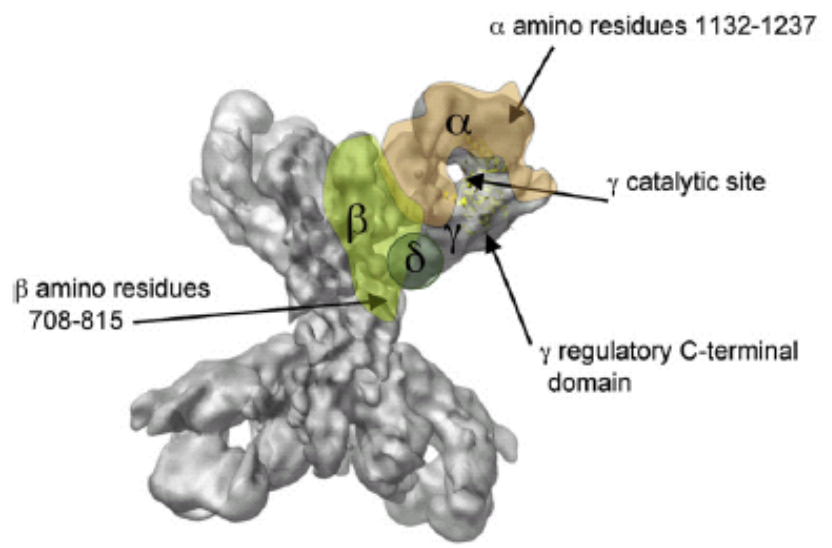
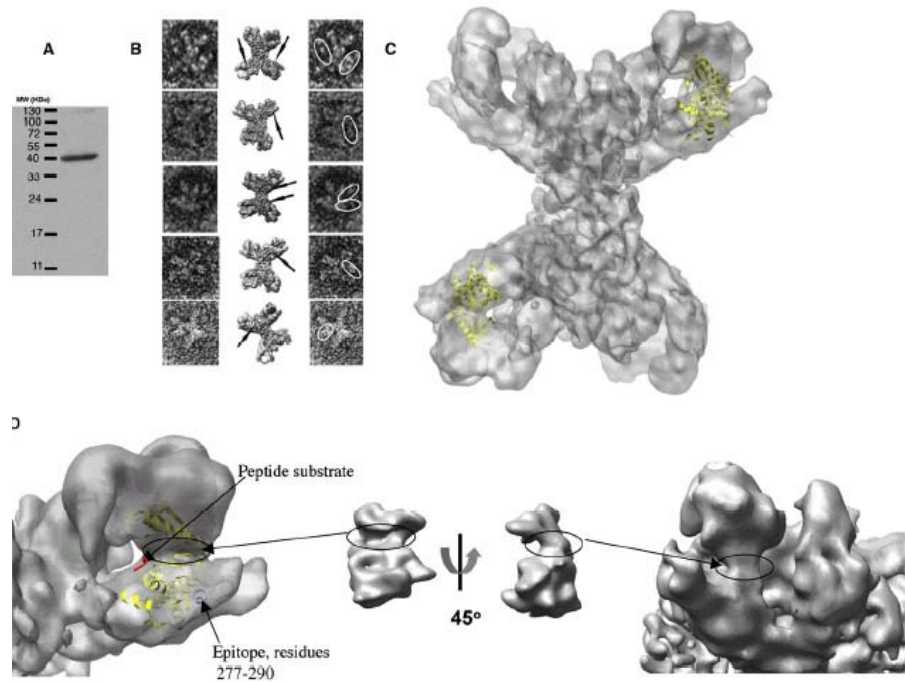
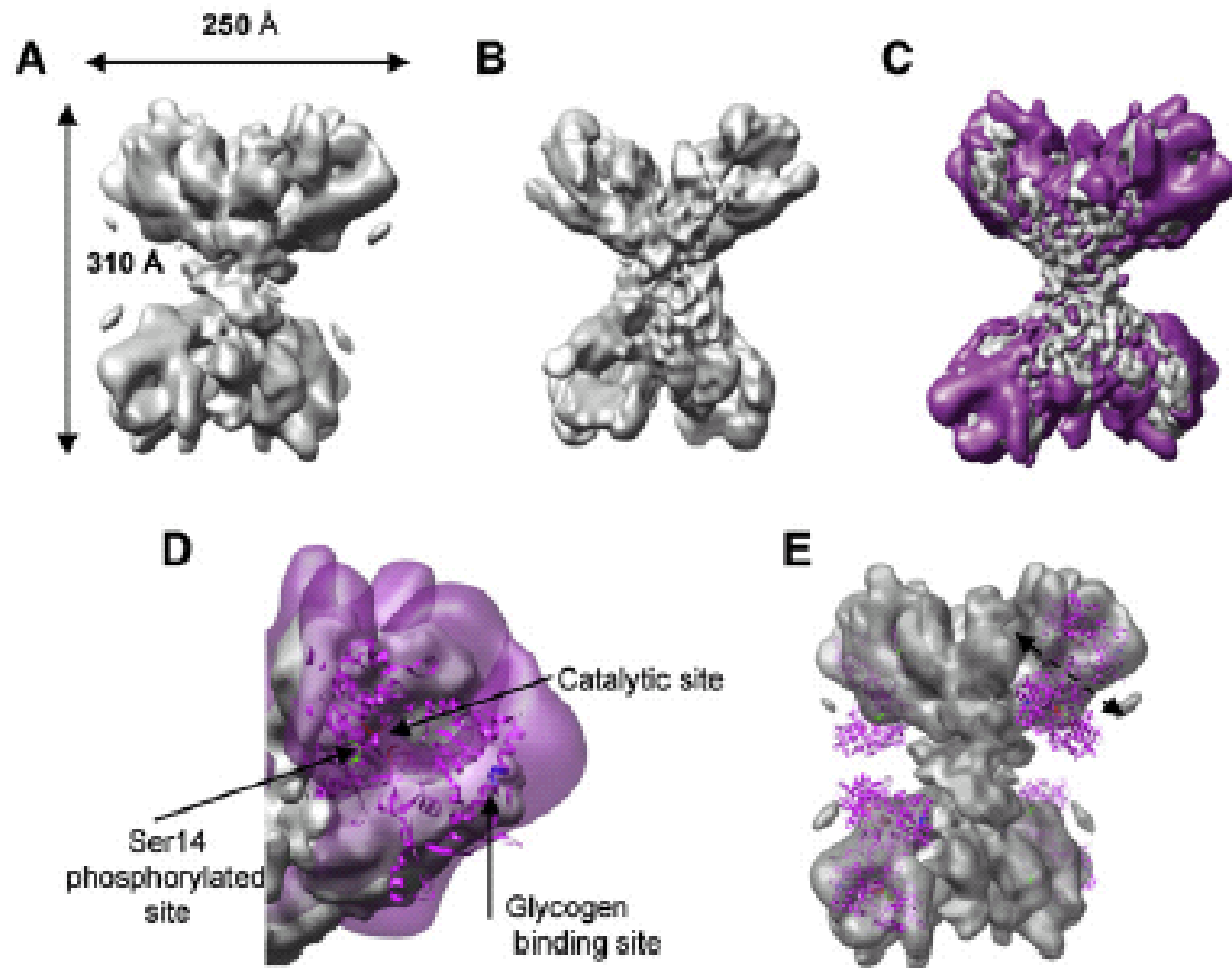
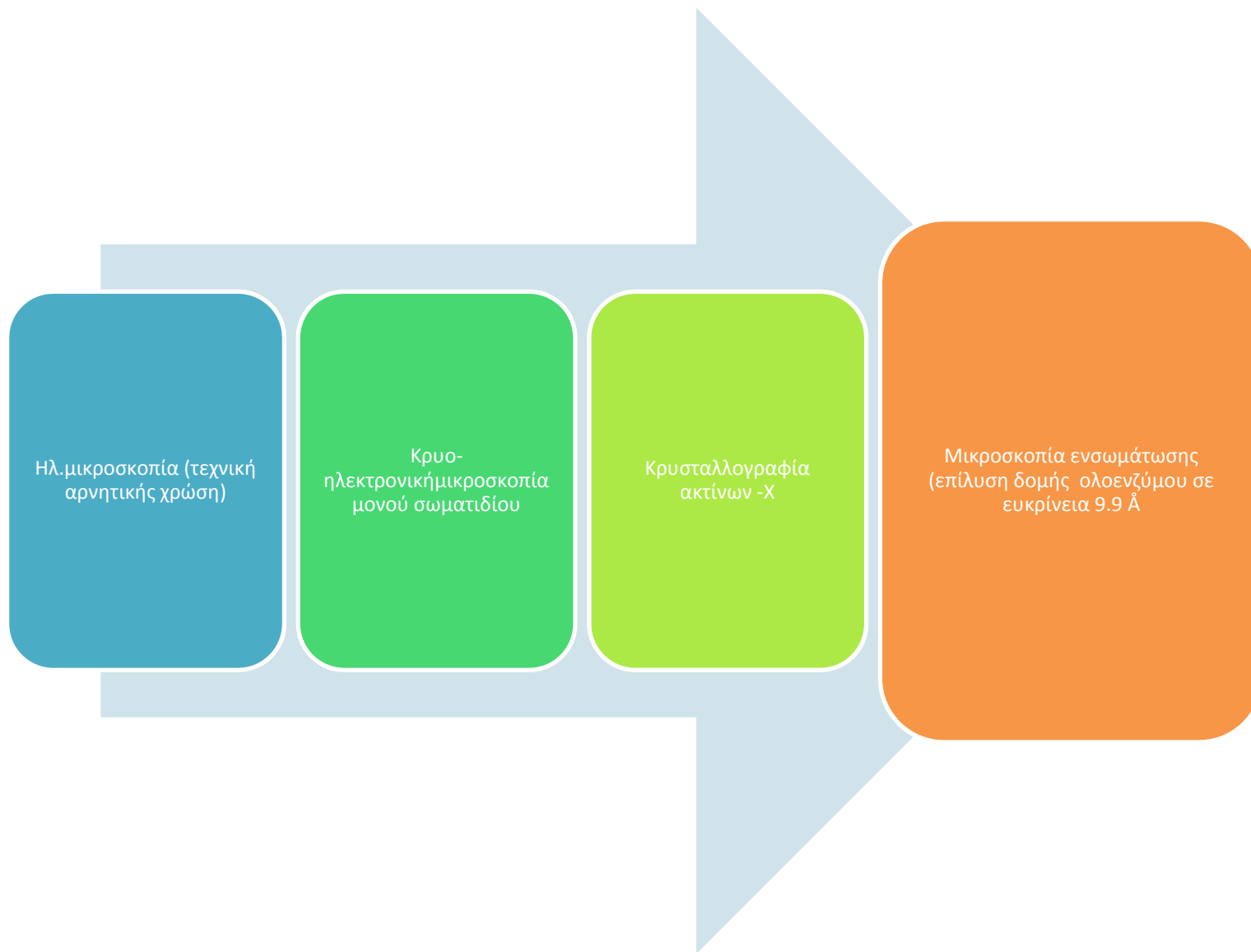


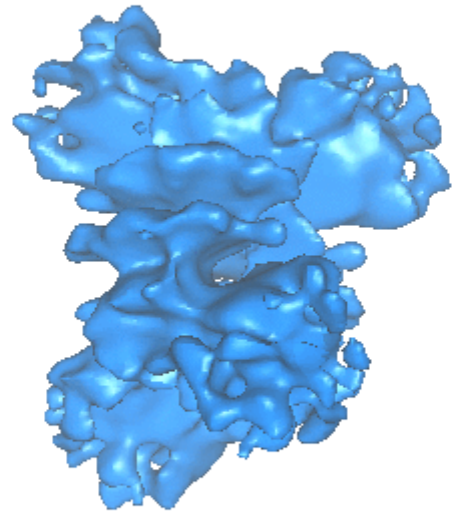
Figure 6. Schematic Location of the Four Subunits Inside the 3D Cryo-EM Volume of PhK

[Structure](https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.013). 2009 Jan 14;17(1):117-27. doi: 10.1016/j.str.2008.10.013.



[Structure](#). 2009 Jan 14;17(1):117-27. doi: 10.1016/j.str.2008.10.013.





χρήσιμες ιστοσελίδες

www.rcsb.org

www.ExPASy.com

www.ccdc.cam.ac.uk