

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗΝ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ
ΕΓΚΕΦΑΛΟ**



Ονοματεπώνυμο: Σεΐζης Νικόλαος

Πατρώνυμο: Δημήτριος

ΛΑΡΙΣΑ 2023

**ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗΝ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ**

**KINETIC STUDIES OF HUMAN BRAIN GLYCOGEN
PHOSPHORYLASE**

ΟΝΟΜΑ : ΣΕΪΖΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1. Ρύθμιση του ισοζυγίου της γλυκόζης	8
1.1.1. Μεταφορείς γλυκόζης	8
1.1.2. Σχέση γλυκόζης-γλυκογόνου	9
1.2. Μεταβολισμός του γλυκογόνου	10
1.2.1. Τι είναι γλυκογόνο	10
1.2.2. Σύνθεση και αποικοδόμηση γλυκογόνου και ένζυμα που συμμετέχουν	11
1.2.3. Ορμονική ρύθμιση της διαδικασίας	13
1.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	14
1.3.1. Αντίδραση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	14
1.3.2. Ο ρόλος της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης	15
1.3.3. Η δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	15
1.3.4. Κέντρα πρόσδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	16
1.4. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου	20
1.4.1. Μεταβολισμός του γλυκογόνου στον εγκέφαλο	20
1.4.2. Δομικά χαρακτηριστικά της εγκεφαλικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	21
1.4.3. Μηχανισμός ενεργοποίησης-απενεργοποίησης	22
1.5. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων	24
1.5.1. Κινητική αλλοστερικών ενζύμων	26
1.5.2. Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων	27
1.6. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου ως δυνητικός στόχος φαρμάκων για την θεραπεία εγκεφαλοπαθειών	28

Σκοπός.....	29
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	30
2.1. Υλικά-Όργανα.....	30
2.2. Χρωματογραφία.....	32
2.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	34
2.4. Απομόνωση φωσφορυλάσης από κύτταρα <i>E. coli</i> (ανασυνδυασμένη hbGPb)	35
2.5. Φωσφορυλίωση της GPb και μετατροπή σε GPa	37
2.6. Κινητικές μελέτες της ανασυνδυασμένης hbGPa παρουσία AMP, IMP, ADP	37
2.7. Ανάλυση κινητικών δεδομένων	39
3. Αποτελέσματα	41
3.1. Απομόνωση του ανασυνδυασμένου ενζύμου bGP	41
3.2. Κινητικές μελέτες	44
3.2.1. Προσδιορισμός της K_a της μη φωσφορυλιωμένης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (bGPb) ως προς την συγκέντρωση της AMP	44
3.2.2. Προσδιορισμός της K_a της φωσφορυλιωμένης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (bGPa) ως προς την συγκέντρωση της AMP.....	45
3.2.3. Προσδιορισμός της K_a της φωσφορυλιωμένης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (bGPa) ως προς την συγκέντρωση της IMP.	46
3.2.4. Προσδιορισμός της K_a της φωσφορυλιωμένης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (bGPa) ως προς την συγκέντρωση της ADP.	46
4. Συζήτηση	48
Βιβλιογραφία	49

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Δρ. Δημήτριο Λεωνίδα, ο οποίος δέχθηκε να είναι ο επιβλέπων καθηγητής μου καθώς και για την καθοδήγηση και βοήθεια που μου παρείχε όποτε την χρειάστηκα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές της τριμελούς μου επιτροπής, Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη και Δρ. Νικόλαο Μπαλατσό, για την στήριξή και την βοήθειά τους όποτε την χρειάστηκα. Επίσης ευχαριστώ θερμά τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και ιδίως τον Δρ. Γεώργιο Στραβοδήμο που σε όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας με βοήθησαν σε ότι και αν χρειάστηκα. Η βοήθειά τους ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υποστήριξή τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Το γλυκογόνο είναι ένα από τα βασικότερα μακρομόρια που εντοπίζονται στους οργανισμούς των θηλαστικών, καθώς αποτελεί τη βασική μονάδα αποθήκευσης της γλυκόζης που αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας στον οργανισμό. Το γλυκογόνο εντοπίζεται στα περισσότερα κύτταρα του οργανισμού, όμως η μεγαλύτερη συγκέντρωση του είναι στο ήπαρ, που αποτελεί το όργανο που τροφοδοτεί την κυκλοφορία, και κατά συνέπεια ολόκληρο τον οργανισμό, με γλυκόζη. Επίσης εντοπίζεται στους μυς, που παρέχει ενέργεια κατά την περίοδο άσκησης, και στον εγκέφαλο. Ο ρόλος του γλυκογόνου στον εγκέφαλο θεωρούταν ότι είναι για περιόδους έκτακτης ανάγκης, αλλά μετά από μελέτες φαίνεται πως η λειτουργία του είναι πιο σημαντική. Το γλυκογόνο του εγκεφάλου συμμετέχει σε πολλές διεργασίες όπως η μάθηση και η παγίωση της μακροπρόθεσμης μνήμης, και η διαταραχή του μεταβολισμού του έχει συσχετισθεί με αρκετές νόσους. Το κύριο ένζυμο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP E.C. 2.4.1.1), η οποία καταλύει την αποικοδόμησή του. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε παραγωγή της πρωτεΐνης με ετερόλογη έκφραση και κινητικές μελέτες του ενζύμου.

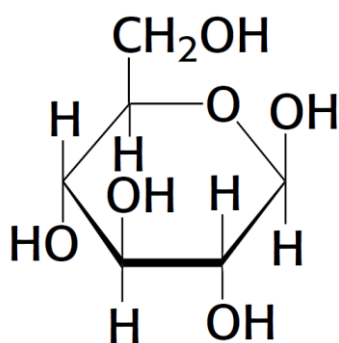
Abstract

Glycogen is one of the most essential macromolecules found in mammalian organisms, as it is the main source of energy in the body. Glycogen is found in most cells of the organism, but its greatest concentration is found in liver, which is the organ that supplies glucose to the blood circulation, and thus to the whole organism. It is also found in muscles, providing energy during exercise, and in the brain. The role of glycogen in the brain was thought to be for emergency times, but recent studies have shown that its function is more important. Brain glycogen is involved in many processes such as learning and the consolidation of long-term memory, and impaired metabolism has been associated with several disease conditions. The main enzyme in glycogen metabolism is glycogen phosphorylase (GP E.C. 2.4.1.1), which catalyzes its degradation. In this thesis, isolation and kinetic studies of the enzyme are presented.

1. Εισαγωγή

1.1. Ρύθμιση του ισοζυγίου της γλυκόζης

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης και πρωταρχικό μόριο στην βιοχημεία, ως κύρια πηγή ενέργειας για τους ζωντανούς οργανισμούς. Είναι ένα σάκχαρο με έξι άτομα άνθρακα και χημικό τύπο $C_6H_{12}O_6$ (Εικ.1). Η γλυκόζη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον (κυτταρικό) μεταβολισμό, παρέχοντας την απαραίτητη ενέργεια για διάφορες διεργασίες. Είναι το τελικό προϊόν της πέψης των υδατανθράκων και χρησιμεύει ως κύριο μόριο σε μονοπάτια όπως η γλυκόλυση, η γλυκονεογένεση και ο κύκλος του Krebs. Είναι ευδιάλυτη στο νερό και μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, ενώ εισέρχεται στα κύτταρα μέσω ειδικών μεταφορέων της γλυκόζης (πρωτεΐνες GLUT). Στο εσωτερικό του κυττάρου, η γλυκόζη μπορεί να μεταβολιστεί για την παραγωγή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), του κύριου ενεργειακού νομίσματος του κυττάρου. Χρησιμεύει επίσης ως πρόδρομος για την σύνθεση άλλων σημαντικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των νουκλεοτιδίων και σύνθετων υδατανθράκων. Συνολικά, η γλυκόζη είναι ένα θεμελιώδες μόριο στην βιοχημεία, παίζοντας ζωτικό ρόλο στον μεταβολισμό και στην ενέργεια χρησιμεύοντας ως δομικό στοιχείο για διάφορες κυτταρικές διεργασίες (1).



Εικόνα 1: Μόριο γλυκόζης (1)

1.1.1. Μεταφορείς γλυκόζης

Η μεταφορά του γλυκογόνου μέσα στα κύτταρα γίνεται από τους μεταφορείς γλυκόζης GLUTs1-4. Αυτοί δρουν σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων με διαφορετικό τρόπο.

Ο GLUT1 & ο GLUT3 εκφράζονται στους περισσότερους ιστούς και έχουν θεμελιώδη ρόλο για την βασική πρόσληψη της γλυκόζης. Έχουν υψηλή συγγένεια για την γλυκόζη, με $K_M \sim 1 \text{ mM}$ (η φυσιολογική συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα είναι περίπου 4-8 mM), επιτρέποντας την αποτελεσματική μεταφορά ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Επίσης, ο GLUT1 συμμετέχει στην μεταφορά γλυκόζης μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ενώ ο GLUT3 εκφράζεται στους νευρώνες, ολοκληρώνοντας την μεταφορά της γλυκόζης στα εγκεφαλικά κύτταρα (1,2).

Ο GLUT2 εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και τα β-κύτταρα του παγκρέατος, ενώ παρουσιάζει μικρότερη συγγένεια σε σχέση με τους υπόλοιπους μεταφορείς, με $K_M \sim 15\text{-}20 \text{ mM}$, καθιστώντας δυνατή την μεταφορά στο ήπαρ μόνο όταν υπάρχει μεγάλη ποσότητα γλυκόζης στο αίμα (π.χ. μετά από γεύμα). Στα β-κύτταρα του παγκρέατος διευκολύνει την ανίχνευση της γλυκόζης και ρυθμίζει την έκκριση της ινσουλίνης (1,2,3).

Ο GLUT4 εκφράζεται στο λιπώδη ιστό, τους σκελετικούς και τους καρδιακούς μύες. Παίζει καθοριστικό ρόλο στην ινσουλινο-εξαρτώμενη πρόσληψη γλυκόζης σε αυτούς τους ιστούς. Η ινσουλίνη σηματοδοτεί την μετακίνηση του GLUT4 από τα ενδοκυτταρικά κυστίδια στην κυτταρική μεμβράνη, αυξάνοντας την πρόσληψη γλυκόζης. Η ρύθμιση της δραστηριότητάς του συμβάλλει στην ομοιόσταση της γλυκόζης σε ολόκληρο το σώμα και είναι κρίσιμη σε καταστάσεις όπως η αντίσταση της ινσουλίνης και ο διαβήτης τύπου 2 (1,2,3).

1.1.2. Σχέση γλυκόζης-γλυκογόνου

Η γλυκόζη και το γλυκογόνο συνδέονται στενά στον ενεργειακό μεταβολισμό του οργανισμού. Η γλυκόζη αποτελεί το τελικό προϊόν της πέψης και απορρόφησης των υδατανθράκων στο γαστρεντερικό σύστημα. Μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε διάφορους ιστούς, μεταξύ των οποίων το ήπαρ, οι μύες και ο εγκέφαλος (2).

Στο ήπαρ και τους μύες, η περίσσεια γλυκόζης μετατρέπεται σε γλυκογόνο μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται γλυκογονογένεση. Το γλυκογόνο χρησιμεύει ως μία εύκολα κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης γλυκόζης, επιτρέποντας στον οργανισμό να ανταποκρίνεται στις ενεργειακές απαιτήσεις κατά την διάρκεια περιόδων νηστείας, σωματικής δραστηριότητας ή υπογλυκαιμίας.

Αντίθετα, όταν ο οργανισμός απαιτεί άμεση παροχή ενέργειας, το γλυκογόνο υπόκειται σε αποικοδόμηση μέσω της γλυκογονόλυσης. Η διαδικασία αυτή καταλύεται από το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου, οδηγώντας στην απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης, η οποία μπορεί να μεταβολιστεί περισσότερο μέσω της γλυκόλυσης (1,4,5).

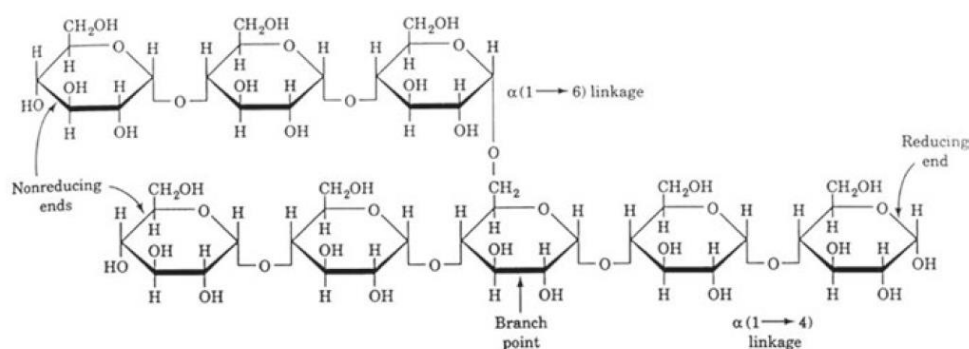
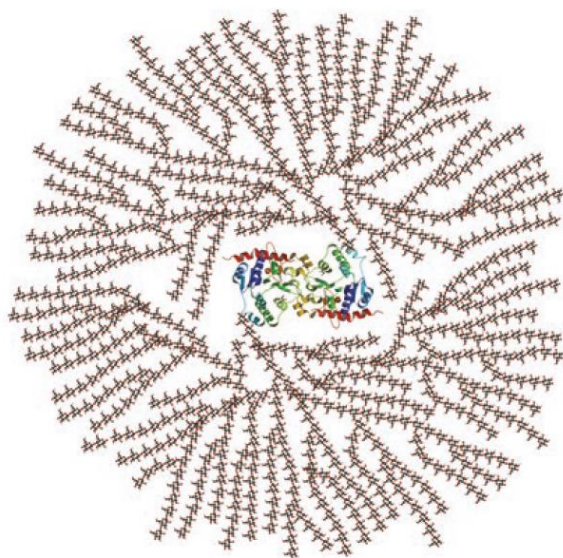
1.2. Μεταβολισμός του γλυκογόνου

1.2.1. Τι είναι γλυκογόνο

Όλοι οι οργανισμοί έχουν μία μέθοδο για την αποθήκευση της γλυκόζης έτσι ώστε να μην χρειάζεται να καταβολίζουν άλλες ουσίες (π.χ. πρωτεΐνες) όταν έχουν ανάγκη για ενέργεια. Αυτή η αποθήκη είναι το γλυκογόνο για όλους τους ζωικούς οργανισμούς. Το γλυκογόνο βρίσκεται ουσιαστικά σε όλα τα κύτταρα (6), αλλά η μεγαλύτερη ποσότητά του βρίσκεται στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες. Στο ήπαρ καταλαμβάνει το 6-8% του μεγέθους του ενώ στους μύες το 1%, αλλά επειδή συνολικά η μάζα των μυών είναι μεγαλύτερη από αυτήν του ήπατος, η συνολική ποσότητα του γλυκογόνου είναι 3-4 φορές μεγαλύτερη στους μύες (7).

Η σημασία του σαν μόριο αποθήκευσης γλυκόζης είναι μεγάλη, καθώς ο οργανισμός σε περίπτωση ανάγκης μπορεί να κινητοποιήσει άμεσα και γρήγορα μονάδες γλυκόζης στο αίμα και να μεταφερθούν στον ιστό που έχει ανάγκη για ενέργεια. Εξαιτίας της πολυμερικής του φύσης, το γλυκογόνο είναι ωσμωτικά ανενεργό και μπορεί να αποθηκευτεί εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες μέσα στα κύτταρα. Επίσης η διακλάδωση του γλυκογόνου βοηθά στην ύπαρξη περισσότερων μη αναγωγικών άκρων, στα οποία μπορούν να γίνουν ενζυμικές αντιδράσεις άμεσα (8).

Το γλυκογόνο είναι ένα μεγάλο, διακλαδισμένο πολυμερές που αποτελείται από μονομερή γλυκόζης. Στις ευθείες αλυσίδες, τα κατάλοιπα συνδέονται μεταξύ τους με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ανά δέκα περίπου μονάδες γλυκόζης πραγματοποιείται μια διακλάδωση, όπου τα μόρια γλυκόζης που συμμετέχουν έχουν α -1,6 γλυκοζιτικό δεσμό. Κάθε μόριο γλυκογόνου έχει μία πρωτεΐνη, την γλυκογενίνη, η οποία είναι η εναρκτήριος πρωτεΐνη για την σύνθεση ενός νέου μορίου γλυκογόνου (Εικ. 2). Το γλυκογόνο έχει σχηματισμό κοκκίων και σχηματίζουν αυτόνομα μη μεμβρανικά σωματίδια μέσα στο κύτταρο που ονομάζονται γλυκοσώματα (7,8).



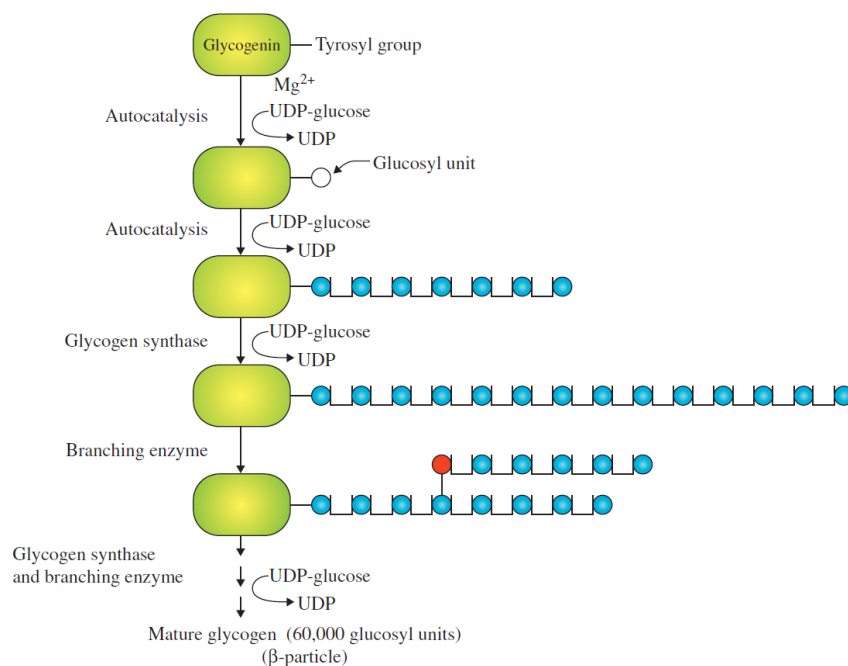
Εικόνα 2: Επάνω: απεικόνιση του μορίου του γλυκογόνου. Στο κέντρο η πρωτεΐνη γλυκογενίνη. Κάτω: κατάλοιπα μορίου γλυκογόνου. η ευθεία αλυσίδα σχηματίζει α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ για την διακλάδωση δημιουργούνται α -1,6 γλυκοζιτικοί δεσμοί (9).

1.2.2. Σύνθεση και αποικοδόμηση γλυκογόνου και ένζυμα που συμμετέχουν

Σύνθεση του γλυκογόνου

Η γλυκόζη αφού εισέρθει στο κύτταρο φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη από ισοένζυμα εξοκινασών (πχ γλυκοκινάση στο ήπαρ), για να δεσμευτεί μέσα στο κύτταρο. Ακολουθεί η ισομερίωση της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 1-φωσφορική γλυκόζη μέσω της φωσφογλυκομουτάσης-1. Η πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης καταλύει την δημιουργία UDP-γλυκόζης από 1-φωσφορική γλυκόζη. Η UDP-γλυκόζη είναι ο άμεσος δότης γλυκόζης για το γλυκογόνο. Η γλυκογενίνη ενεργοποιεί την σύνθεση του γλυκογόνου με την αυτογλυκοζυλίωση της, μεταφέροντας μονάδες

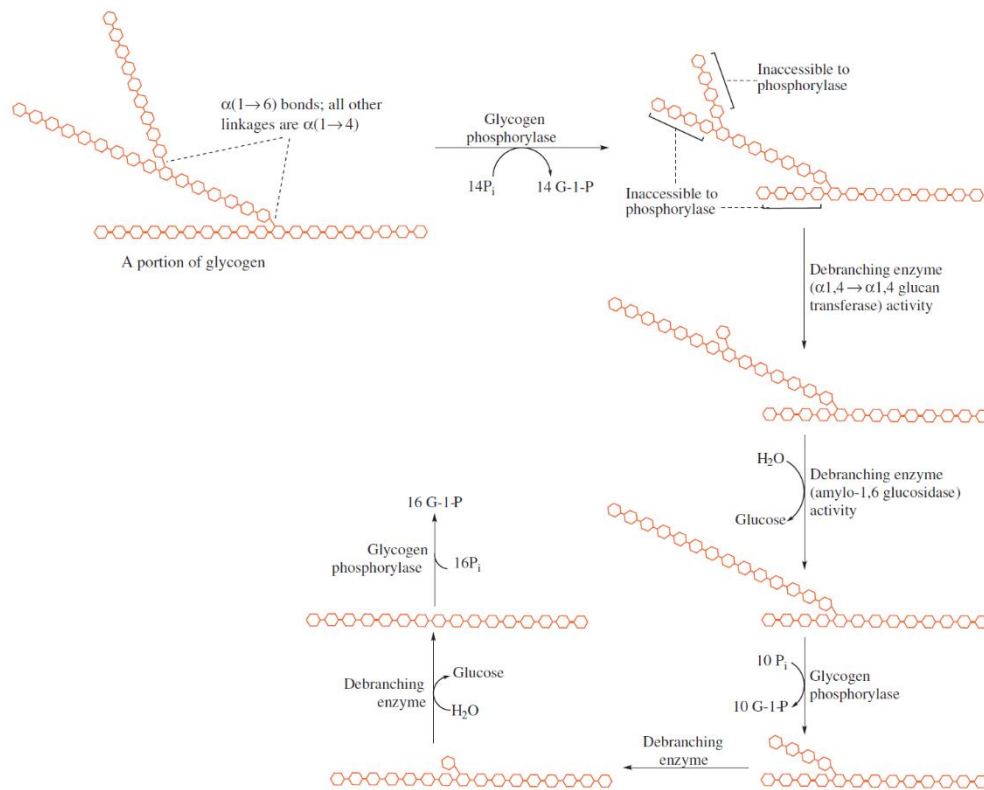
γλυκόζης από την UDP-γλυκόζη, σχηματίζοντας μικρή αλυσίδα 10-20 μονάδων γλυκόζης. Η επιμήκυνση της αλυσίδας γίνεται μέσω της συνθήσεως του γλυκογόνου, η οποία μεταφέρει γλυκόζη από την UDP-γλυκόζη στο γλυκογόνο, δημιουργώντας α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το ένζυμο διακλάδωσης καταλύει τη δημιουργία α-1,6 γλυκοζιτικών δεσμών ανά 10 περίπου κατάλοιπα γλυκόζης (Εικ. 3) (6,10).



Εικόνα 3: Πορεία την σύνθεσης του γλυκογόνου (6).

Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα και στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων. Στο κυτταρόπλασμα επιτυγχάνεται με την δράση δύο ενζύμων, της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, που απελευθερώνει 1-φωσφορική γλυκόζη με την φωσφορόλυση των α-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών, και του ενζύμου της αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου, που αποσυνδέει τα σημεία διακλάδωσης απελευθερώνοντας ελεύθερη γλυκόζη. Η 1-φωσφορική γλυκόζη ισομεριώνεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί από τη φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, και στη συνέχεια να εξέλθει από το κύτταρο μέσω των μεταφορέων γλυκόζης (Εικ. 4). Στα λυσοσώματα, η διάσπαση γίνεται μέσω του λυσοσωμικού ενζύμου οξική α-γλυκοσιδάση ή όξινη μαλτάση (6,11).



Εικόνα 4: Πορεία της αποικοδόμησης του γλυκογόνου (6).

1.2.3. Ορμονική ρύθμιση της διαδικασίας

Η απόφαση μεταξύ αποικοδόμησης και σύνθεσης γλυκογόνου επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την ορμονική σηματοδότηση. Οι δύο βασικές ορμόνες που εμπλέκονται στην ομοιόσταση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη. Η ινσουλίνη, που εκκρίνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος ως απόκριση στην αυξημένη ποσότητα γλυκόζης στο αίμα, προάγει την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα και διευκολύνει τη σύνθεση του γλυκογόνου. Διεγείρει την ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου, ενός ενζύμου υπεύθυνου για την παραγωγή του γλυκογόνου και αναστέλλει τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, εμποδίζοντας τη διάσπαση του γλυκογόνου. Από την άλλη πλευρά, η γλυκαγόνη, η οποία απελευθερώνεται από τα α-κύτταρα του παγκρέατος σε απόκριση του χαμηλού επιπέδου γλυκόζης στο αίμα, έχει το αντίθετο αποτέλεσμα. Προάγει την γλυκογονόλυση ενεργοποιώντας την φωσφορυλάση του γλυκογόνου και αναστέλλοντας την συνθάση του γλυκογόνου. Αυτό διεγείρει την απελευθέρωση γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος, εξασφαλίζοντας την επαρκή παροχή για την παραγωγή ενέργειας (12).

Εκτός των βασικών ορμονών, ινσουλίνης και γλυκαγόνης, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στη ρύθμιση του ισοζυγίου της γλυκόζης. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται άλλες ορμόνες, όπως η επινεφρίνη, η κορτιζόλη και η αυξητική ορμόνη, καθώς και ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης που περιλαμβάνουν πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες (13,14).

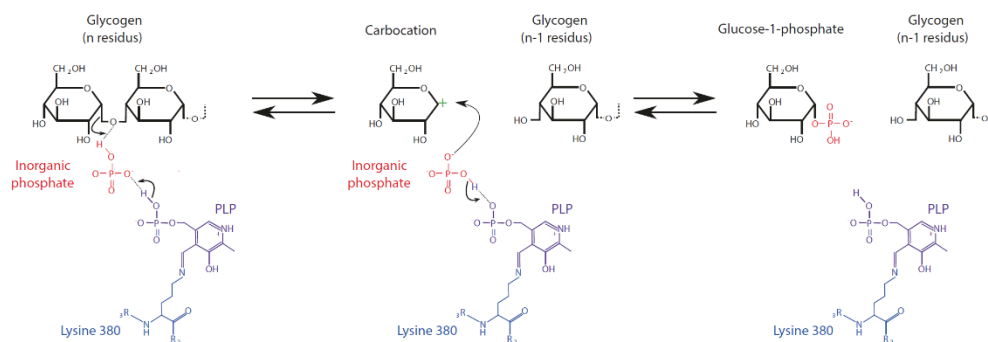
Ρυθμίζοντας στενά τη μεταφορά, την πρόσληψη και την απελευθέρωση της γλυκόζης, το σώμα εξασφαλίζει τη βέλτιστη ισορροπία μεταξύ παραγωγής και αποθήκευσης ενέργειας, επιτρέποντας στα κύτταρα να ανταποκρίνονται στις μεταβαλλόμενες μεταβολικές απαιτήσεις (12,13,14).

1.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Όπως προαναφέρθηκε, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP, EC 2.4.1.1) είναι το βασικό ένζυμο στην πορεία της αποικοδόμησης του γλυκογόνου. Στον άνθρωπο υπάρχουν 3 ισομορφές του ενζύμου, η μυϊκή, η ηπατική και η εγκεφαλική. Τα 3 ισοένζυμα είναι πολύ συντηρημένα, παρουσιάζοντας ομοιότητα σε ποσοστό 80-85% στην αλληλουχία, όπως και τις τρισδιάστατες δομές τους. Παρόλα αυτά, η κάθε ισομορφή έχει τα δικά της μοναδικά χαρακτηριστικά που τις κάνουν να έχουν διαφορετικό τρόπο ενεργοποίησης και αύξησης της δραστητικότητάς τους (15).

1.3.1. Αντίδραση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την διάσπαση των α-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών από τα αναγωγικά άκρα του γλυκογόνου. Χρησιμοποιώντας ορθοφωσφορικά ιόντα και με την βοήθεια του συμπαραγόντα φωσφορική πυριδοξάλη δίνει 1-φωσφορική γλυκόζη και γλυκογόνο μειωμένο κατά 1 κατάλοιπο γλυκόζης (Εικ. 5). Η αντίδραση της GP είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8 ο λόγος εξισορρόπησης των συγκεντρώσεων $[G1P]/[P_i]$ είναι 0.28, όμως *in vivo* η συγκέντρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από αυτήν της G1P, οπότε το ένζυμο καταλύει την αντίδραση προς την φωσφορόλυση (16,17).



Εικόνα 5: Η αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου (16).

1.3.2. Ο ρόλος της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης

Ένα πολύ σημαντικό μόριο για την κατάλυση της αντίδρασης είναι η 5-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Η PLP είναι μία από τις ενεργές μορφές της βιταμίνης B₆. Υπάρχουν πολλά ένζυμα που χρησιμοποιούν την PLP ως συμπαράγοντα, κυρίως όμως καταλύουν αντιδράσεις αμινοξέων και αμινών. Η PLP συνδέεται συνήθως με την ε-αμινο-ομάδα μίας λυσίνης του ενζύμου, δημιουργώντας μία βάση Schiff (Εικ. 5). Οι περισσότερες αντιδράσεις των ενζύμων που περιέχουν PLP στηρίζονται στην βάση Schiff και την δημιουργία μίας νέας βάσης Schiff με το υπόστρωμα (18). Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα μοναδικό ένζυμο που χρησιμοποιεί PLP, καθώς στην αντίδραση η βοηθητική ομάδα του συμπαράγοντα είναι η φωσφορική και όχι η βάση Schiff, δρώντας ως ένας οξέο-βασικός καταλύτης. Στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου η PLP είναι συνδεδεμένη με δεσμό βάσης Schiff με την Lys680 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (19).

1.3.3. Η δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου μπορεί να υπάρχει σε 2 μορφές: την a και b, που ονομάζονται GP_a και GP_b, αντίστοιχα. Η GP_a είναι η φωσφορυλιωμένη μορφή του ενζύμου και η GP_b αποτελεί την μη φωσφορυλιωμένη μορφή. Η μεταβολή της GP_b σε GP_a με φωσφορυλίωση επάγεται από ορμόνες (πχ. επινεφρίνη), η οποία ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η τελευταία φωσφορυλιώνει την φωσφορυλάση του γλυκογόνου στη σερίνη 14 (20).

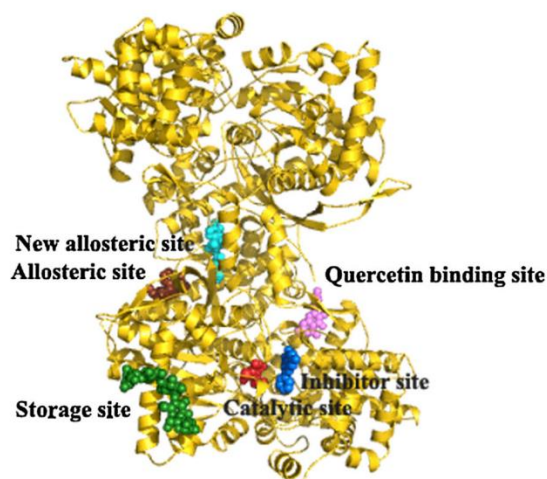
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπάρχει σε ισορροπία σε δύο καταστάσεις, την T και την R. Η κατάσταση R είναι μία ενεργή και χαλαρή κατάσταση του ενζύμου και η κατάσταση T είναι μια ελάχιστα ενεργή, τεταμένη κατάσταση του ενζύμου. Κατά την κατάσταση R, το ενεργό κέντρο είναι ανοιχτό, καθιστώντας διαθέσιμες τις θέσεις πρόσδεσης των φωσφορικών ιόντων και του γλυκογόνου. Η μετατροπή της GPb σε GPa με φωσφορυλίωση, όπως και η αλλοστερική δέσμευση του AMP προκαλούν την μετατόπιση της ισορροπίας στην κατάσταση R, με επακόλουθο την ενεργοποίηση του ενζύμου. Αντίστροφα, η αποφωσφορυλίωση, ή η αλλοστερική σύνδεση μορίων όπως γλυκόζη, ATP και 6-φωσφορική γλυκόζη έχουν ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της κατάστασης T, προκαλώντας την απενεργοποίηση του ενζύμου (21).

Οι ισομορφές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι παρόμοιες μεταξύ τους στην τεταρτοταγή τους δομή. Το λειτουργικό ένζυμο είναι ένα διμερές (Εικ. 6), αλλά σε υψηλή συγκέντρωση σχηματίζει τετραμερή, τα οποία είναι ανενεργά. Το διμερές αποτελείται από δύο συμμετρικά τοποθετημένα μονομερή, με το πλήρες σύνολο των θέσεων πρόσδεσης για συγκεκριμένους προσδέτες. Το μονομερές, αποτελούμενο από 842 κατάλοιπα και μοριακού βάρους 97 kDa, συγκροτείται από 2 επικράτειες, την αμινο-τελική (κατάλοιπα 1-484) και την καρβοξυ-τελική (κατάλοιπα 485-842) (22).

1.3.4. Κέντρα πρόσδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι το πρώτο αλλοστερικό ένζυμο που έχει ανακαλυφθεί. Τα αλλοστερικά ένζυμα έχουν περιοχές, εκτός του καταλυτικού κέντρου, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τη συγγένεια πρόσδεσης στο καταλυτικό κέντρο.

Οι ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι σημαντικές για την κατανόηση της δράσης, της λειτουργικότητας, καθώς και του τρόπου ενεργοποίησης του ενζύμου. Μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί 6 κέντρα δέσμευσης μορίων στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου.



Εικόνα 6: Η δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (25).

1. Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου εντοπίζεται θαμμένο κεντρικά ανάμεσα από τα δύο μονομερή, δίπλα στο συμπράγοντα PLP και σε απόσταση περίπου 15 Å από την ενζυμική επιφάνεια και την θέση αλληλεπίδρασης των δύο υπομονάδων. Η περιοχή διεπαφής και το καταλυτικό κέντρο συνδέονται μέσω του βρόχου 280s. Ένα στενό κανάλι σχηματίζεται μεταξύ των διεπιφανειών από κάθε υπομονάδα, στο τέλος του οποίου βρίσκεται το καταλυτικό κέντρο. Η Lys680 βρίσκεται στο ενεργό κέντρο συνδεδεμένη με την PLP και περιορίζεται χωρικά εξαιτίας της αλληλεπίδρασης με μια έλικα π (κατάλοιπα 488-494) που βρίσκεται κοντά στο κατάλοιπο. Επίσης η Trp491 βρίσκεται πάνω από την Lys680 και βοηθά στην αλληλεπίδραση της φωσφορικής ομάδας της PLP με το ορθοφωσφορικό ιόν, μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals (23).

Στην ανενεργή κατάσταση του ενζύμου T, ο βρόχος 280s τοποθετείται με τέτοιο τρόπο μπροστά στη δίοδο του καναλιού έτσι ώστε το ενεργό κέντρο να μην είναι προσβάσιμο. Επίσης μόρια που είναι φυσικοί αναστολείς του ενζύμου, όπως η γλυκόζη, μπορούν να προσδεθούν στο ενεργό κέντρο και να αλληλεπιδράσουν με τα κατάλοιπα Gly135, Leu136, Leu139, Asn284, His377, Val455, Asn484, Glu672, Ala673, Ser674 και Gly675 μέσω δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων van der Waals (23).

2. Αλλοστερικό κέντρο (κέντρο πρόσδεσης AMP)

Στο αλλοστερικό κέντρο συνδέονται συνήθως φωσφορυλιωμένες ενώσεις όπως το AMP, IMP, ADP, G6P και άλλα. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να δρουν τόσο ως αναστολείς (G6P), όσο και ως ενεργοποιητές (AMP) του ενζύμου. Η 6-φωσφορική γλυκόζη (G6P) είναι ο πλέον ισχυρός φυσιολογικός αναστολέας της GPb ο οποίος προσδένεται στην αλλοστερική θέση. Η πρόσδεση σε αυτή τη θέση αναστέλλει τη δραστηριότητα της GP είτε ανταγωνίζοντας την πρόσδεση του φυσιολογικού ενεργοποιητή AMP είτε σταθεροποιώντας την ανενεργή διαμόρφωση T του ενζύμου. Το αλλοστερικό κέντρο σχηματίζεται από δομικά στοιχεία και των δύο υπομονάδων του λειτουργικού διμερούς που βρίσκονται στις αντίθετες πλευρές του ενζύμου. Δύο α-έλικες (κατάλοιπα 47-78 και 289-314, αντίστοιχα) και τέσσερα β-πτυχωτά φύλλα (κατάλοιπα 153-160, 191-193, 222-232 και 237-247) δημιουργούν μια κοιλότητα σχήματος V, η οποία κλείνει από την περιοχή-καλύπτρα (κατάλοιπα 36'- 47' από την συμμετρική υπομονάδα) για να σχηματιστεί η αλλοστερική περιοχή (24).

3. Νέο αλλοστερικό κέντρο

Αυτή η περιοχή πρόσδεσης βρίσκεται στην κεντρική κοιλότητα του διμερούς του ενζύμου που σχηματίζεται από την ένωση των μονομερών, σε απόσταση 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το ενεργό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Η κοιλότητα αυτή σχηματίζεται από τα ακόλουθα: στη μία άκρη από τα κατάλοιπα της περιοχής-καλύπτρας και την έλικα α2 (κατάλοιπα Arg33, His34, Arg60 και Asp61 και τα ανάλογα από την δεύτερη υπομονάδα), και στην άλλη άκρη από τις έλικες-πύργους α7 (κατάλοιπα Asn270, Glu273, Ser276 και τα ανάλογα από την δεύτερη υπομονάδα). Τα 18 κατάλοιπα είναι πολύ συντηρημένα και είναι τα ίδια σε όλες τις ισομορφές του ενζύμου στον άνθρωπο. Το πιο γνωστό μόριο-αναστολέας που συνδέεται σε αυτήν την θέση είναι το ινδόλιο (25).

4. Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου

Το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου εντοπίζεται στην επιφάνεια του μορίου, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο, και είναι η περιοχή που το ένζυμο συνδέεται με το γλυκογόνο *in vivo*. Συγκροτείται από δύο α-έλικες, α12 και α13 (κατάλοιπα 396-418 και 420-429, αντίστοιχα) και ένα βρόχο που συνδέει τα δύο β-πτυχωτά φύλλα, β15 και β16 (κατάλοιπα 430-432 και 437-411, αντίστοιχα). Το κέντρο αυτό δεν έχει μελετηθεί

αρκετά για την ανακάλυψη αναστολέων, όμως υπάρχουν κάποιοι γνωστοί αναστολείς, όπως οι α -, β - και γ -κυκλοδεξτρίνες, η ακαρβόζη, η μαλτοπενταόζη και η μαλτοεπταόζη. Τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στη δέσμευση των προσδετών είναι τα Ser429, Lys473, Asn407 που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, και τα Gln401, Arg426, Val431 και Gln433 που γίνεται αλληλεπίδραση μέσω μορίων νερού (26).

5. Κέντρο αναστολής (κέντρο πρόσδεσης καφεΐνης)

Το κέντρο αναστολής, γνωστό ως και κέντρο πρόσδεσης καφεΐνης ή πουρινών, λόγω της δέσμευσής αυτών των ενώσεων σε αυτό το κέντρο, βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση των προσδετών σε αυτήν την θέση οφείλεται στον σχηματισμό αλληλεπιδράσεων π - π μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων Phe285 και Tyr613. Οι προσδέτες έχουν μεγαλύτερη ανασταλτική ικανότητα παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης. Αυτό δείχνει ότι η δράση τους ρυθμίζεται από τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και με αυτό το τρόπο αποτρέπεται ο κίνδυνος υπογλυκαιμίας, όταν τα επίπεδα γλυκόζης πέφτουν (25).

6. Κέντρο πρόσδεσης κερσετίνης

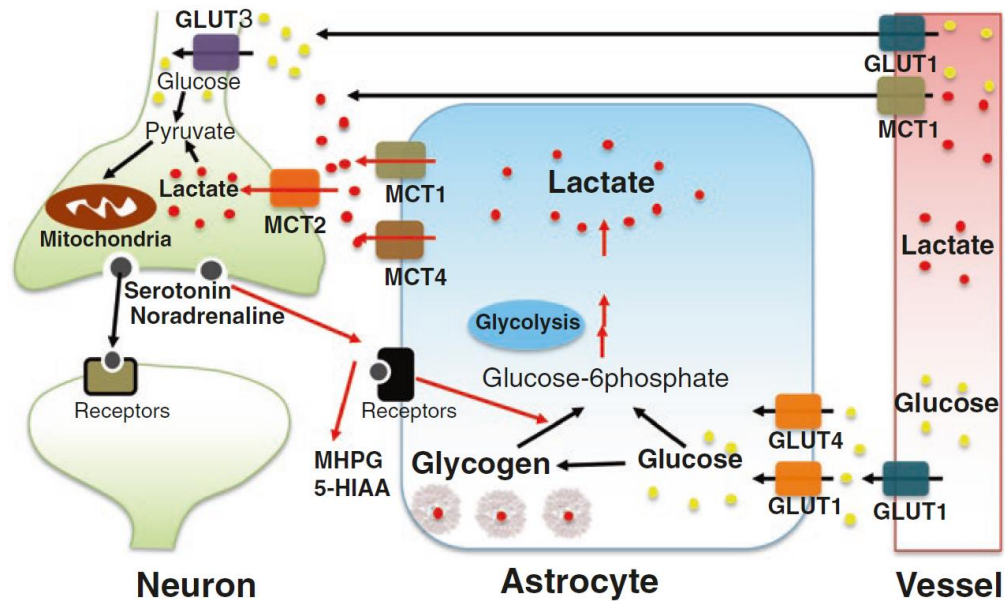
Η κερσετίνη είναι ένα флаβονοειδές που εντοπίστηκε να προσδένεται σε ένα νέο σημείο εκτός των γνωστών μέχρι πρόσφατα κέντρων. Αυτό το κέντρο ονομάστηκε κέντρο πρόσδεσης κερσετίνης και εντοπίζεται 15 Å μακριά από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Πρόκειται για μία ρηχή αύλακα η οποία απαρτίζεται από τα κατάλοιπα Lys544, Arg551, Lys655 και Tyr548 από την μία πλευρά (C-τελική επικράτεια) και τα Glu120 και Glu123 από την άλλη (N-τελική επικράτεια). Η κερσετίνη σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις *van der Waals* με τα κατάλοιπα Arg551, Lys544. Οι υδροξυλομάδες 40 και 5 των δακτυλίων B και A αντίστοιχα σχηματίζουν γέφυρες νερού με τα καρβονυλικά οξυγόνα της κύριας αλυσίδας των καταλοίπων Glu121 και Lys655, και το υδροξύλιο 7 του δακτυλίου A σχηματίζει ένα εκτενές δίκτυο γεφυρών νερού με τα οξυγόνα της κύριας αλυσίδας των Leu494, Cys495 και Glu654. Η πρόσδεση της κερσετίνης προάγει την κατάσταση T (ανενεργή) του ενζύμου μέσω της σταθεροποίησης ενός βρόχου που συνίσταται από τα κατάλοιπα 548-556 (27).

1.4. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου

1.4.1. Μεταβολισμός του γλυκογόνου στον εγκέφαλο

Στα ενήλικα θηλαστικά, το γλυκογόνο στον εγκέφαλο εντοπίζεται κυρίως στα αστροκύτταρα, και σε μικρότερο βαθμό στους νευρώνες, και φαίνεται ότι είναι σημαντικό για κρίσιμες λειτουργίες, όπως η νευροδιαβίβαση και η εδραίωση της μνήμης. Στον εγκέφαλο, το γλυκογόνο φαίνεται να αποτελεί αποθήκη για καταστάσεις έκτακτης ανάγκης, όταν η παροχή στο όργανο από την κυκλοφορία είναι μειωμένη σε σχέση με τις ενεργειακές ανάγκες των κυττάρων. Επιπλέον, το γλυκογόνο συμμετέχει έμμεσα στην γλουταμινεργική νευροδιαβίβαση, με την παραγωγή γλουταμινικού, χρησιμοποιώντας το α-κετογλουταρικό, το οποίο παράγεται κατά το κύκλο του κιτρικού οξέος. Το α-κετογλουταρικό μπορεί με την βοήθεια ενζύμων όπως η γλουταμινική αφυδρογονάση και άλλες τρανσαμινάσες να δημιουργήσει γλουταμινικό, που χρησιμοποιείται ως νευροδιαβιβαστής των νευρικών κυττάρων. Επομένως, η αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση πολλών φυσιολογικών διεργασιών (28).

Ενδιαφέρον δείχνει ο τρόπος με τον οποίο το γλυκογόνο τροφοδοτεί ενεργειακά τους νευρώνες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η γλυκόζη διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με τη χρήση του μεταφορέα GLUT1. Από εκεί η γλυκόζη εισέρχεται στα αστροκύτταρα και μπορεί να αποθηκευτεί με τη δημιουργία γλυκογόνου. Όταν οι νευρώνες έχουν ενεργειακές ανάγκες που δεν μπορούν να καλύψουν με τις δικές τους παροχές γλυκόζης, εκκρίνουν νευροδιαβιβαστές οι οποίοι ενεργοποιούν το μονοπάτι της γλυκογονόλυσης στα αστροκύτταρα. Ακολουθεί η γλυκόλυση και το πυροσταφυλικό που παράγεται μετατρέπεται μέσω της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) σε γαλακτικό. Το γαλακτικό μπορεί να μεταφερθεί από τα αστροκύτταρα στους νευρώνες μέσω των μεταφορέων των μονοκαρβοξυλικών οξέων (MCTs). Στους νευρώνες το γαλακτικό μπορεί να μετατραπεί ξανά σε πυροσταφυλικό με το ίδιο ένζυμο που πραγματοποιήθηκε η αντίστροφη αντίδραση και να εισέλθει στον κύκλο του κιτρικού οξέος, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας (29).



Εικόνα 7: Μεταβολισμός του γλυκογόνου στον εγκέφαλο. Συνεισφορά του γαλακτικού στην μεταφορά της ενέργειας από τα αστροκύτταρα στους νευρώνες (29).

1.4.2. Δομικά χαρακτηριστικά της εγκεφαλικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου (bGP) απομονώθηκε και έγινε γνωστή η κρυσταλλική δομή της το 2016. Η στοιχειώδης κυψελίδα (unit cell) του κρυστάλλου αποτελείται από ένα μόριο, το οποίο είναι τετραμερές. Το φαινόμενο ήταν αναπάντεχο, καθώς δεν έχει παρατηρηθεί ξανά η μορφή του τετραμερούς χωρίς την πρόσδεση του AMP και το τετραμερές έχει παρατηρηθεί μόνο στην ισομορφή του μν παρουσία AMP. Αυτή η τεταρτοταγής δομή πιθανώς να οφείλεται στο μόριο PEG400, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως κατακρημνιστικό και προσδένεται στη θέση που προσδένεται και το AMP, προκαλώντας παρόμοιες δομικές αλλαγές στο ένζυμο, χωρίς όμως να προκαλεί ενεργοποίηση του ενζύμου (30).

Όπως προαναφέρθηκε, στους κρυστάλλους το ένζυμο σχηματίζει ένα τετραμερές. Το τετραμερές αυτό εμφανίζει 3 σημεία διεπαφής μεταξύ των μονομερών (Εικ. 8). Οι διεπαφές είναι οι ακόλουθες:

- 1) Τα σημεία διεπαφής μεταξύ του λειτουργικού διμερούς: η σύνδεση των λειτουργικών μονομερών (μονομερή 1 και 2 από την εικόνα 8) περιλαμβάνει

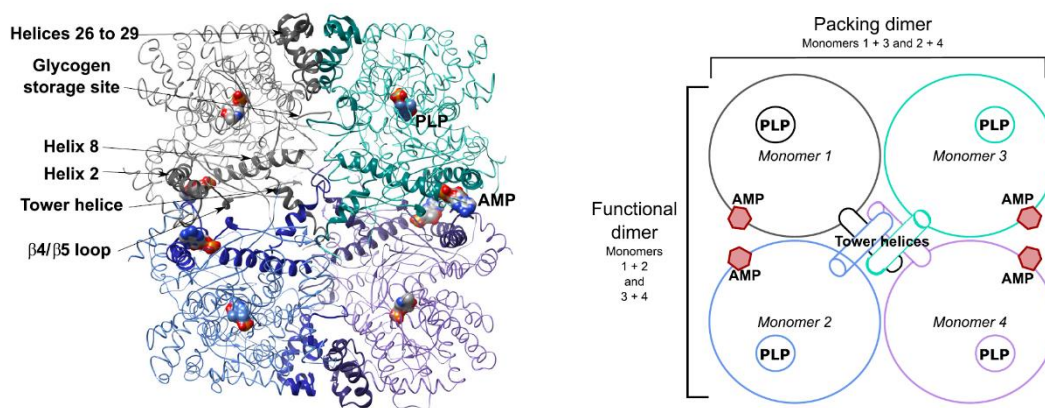
την α2 έλικα (κατάλοιπα 49-77), τον β4/β5 βρόχο (κατάλοιπα 180-198), τον βρόχο-καλύπτρα (κατάλοιπα 41-48), και τις έλικες-πύργους (κατάλοιπα 259-278). Οι 3 πρώτες δομικές περιοχές συμμετέχουν στο κέντρο πρόσδεσης του AMP, και όταν είναι συνδεδεμένο διευκολύνονται οι αλληλεπιδράσεις φέρνοντας κοντά την καλύπτρα με την α2 έλικα και τον β4/β5 βρόχο. Οι έλικες-πύργοι αποτελούνται από τις α7 έλικες από κάθε μονομερές. Συνδέονται μεταξύ τους με τον βρόχο πύλη (κατάλοιπα 279-289), και η δομή σταθεροποιείται μέσω μη πολικών αλληλεπιδράσεων των αμινοξέων Val266, Leu267 και Asn270. Στην bGP οι έλικες αλληλεπιδρούν μεταξύ δύο ακόμα δεσμών υδρογόνου, της Tyr262 του ενός μονομερούς και της Asn272' του άλλου στην μία άκρη των ελίκων, και τα συμμετρικά τους στην άλλη άκρη.

- 2) Τα σημεία διεπαφής μεταξύ του διμερούς πακεταρίσματος (μονομερή 1 και 3): αποτελούν τις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ των δύο λειτουργικών διμερών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι μεταξύ το κέντρου αποθήκευσης γλυκογόνου (κατάλοιπα 426-434), την δέσμη των ελίκων α26 έως α29 (κατάλοιπα 721-769) και των ελίκων πύργων. Αυτή η δομή έχει παρατηρηθεί και στη μυϊκή ισομορφή, αλλά όχι στην ηπατική.
- 3) Τον πυρήνα που αποτελείται από τις έλικες-πύργους: αποτελεί το σύνολο των ελίκων πύργων του κάθε μονομερούς. Στο σύμπλοκο bGP-AMP οι έλικες είναι μεγαλύτερες κατά δυο στροφές σε σχέση με το σύμπλοκο mGP- AMP, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση με τα άλλα μονομερή. Οι έλικες των αντιδιαμετρικών μονομερών (μονομερή 1 και 4) αλληλεπιδρούν μέσω μη πολικών αλληλεπιδράσεων των Leu271, Gly260, Leu268 και Ile263 του ενός μονομερούς και των συμμετρικών του (30).

1.4.3. Μηχανισμός ενεργοποίησης-απενεργοποίησης

Παρότι όλες οι ισομορφές είναι πολύ όμοιες όσον αφορά τη δομή, διαφέρουν σημαντικά στην ευαισθησία και τους τρόπους ρύθμισης, που σχετίζεται κυρίως με τη λειτουργία του γλυκογόνου στον κάθε ιστό. Για παράδειγμα η φωσφορυλίωση της ηπατικής ισομορφής είναι απαραίτητη για την λειτουργία της, ενώ η σύνδεση αλλοστερικών τροποποιητών δεν επηρεάζει σημαντικά την ενεργότητα της. Η μυϊκή και εγκεφαλική μορφή είναι πολύ ευαίσθητες στην σύνδεση αλλοστερικών τροποποιητών και ελέγχονται σε μεγάλο βαθμό από μικρά μόρια. Ωστόσο, η μυϊκή

ισομορφή επίσης ενεργοποιείται ισχυρά από τη φωσφορυλίωση, οδηγώντας σε υπερενεργοποίηση του ενζύμου παρουσία AMP, ενώ η φωσφορυλίωση ενεργοποιεί ήπια τη bGP. Η μειωμένη ενεργοποίηση της bGP από τη φωσφορυλίωση μπορεί να οφείλεται στην υποκατάσταση κάποιων αμινοξέων μεταξύ των τριών ισομορφών, όπως το Glu22 και το Lys28 στην mGP και lGP που αντικαθίστανται από Gly και Arg στην bGP, αντίστοιχα. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να μειώνουν τη σταθεροποίηση του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου στη bGP, οδηγώντας σε περιορισμένη ευαισθησία στην φωσφορυλίωση. Άρα mGP ανταποκρίνεται έντονα και συνεργατικά στην ενεργοποίηση της AMP και στη φωσφορυλίωση, ενώ η bGP ενεργοποιείται έντονα αλλά μη συνεργατικά από την AMP (Εικ. 9) (29,30).



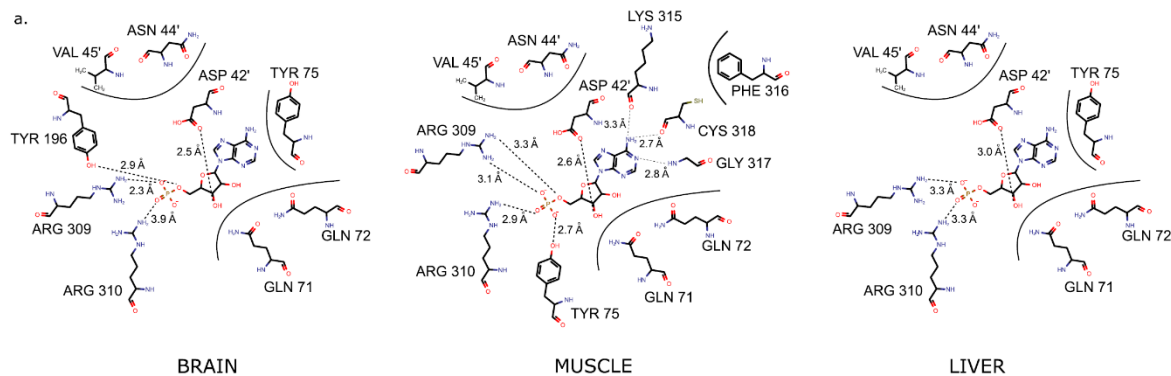
Εικόνα 8: Η κρυσταλλική δομή της εγκεφαλικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Δύο λειτουργικά διμερή (1+2 και 3+4) ομαδοποιούνται για τον σχηματισμό του διμερούς πακεταρίσματος (1+3 και 2+4) (30).

Condition	Liver GP % activity	Muscle GP % activity	Brain GP % activity
Phosphorylation of Ser14	100%	100%	60%
Binding of AMP	10%	80%	100%
Phosphorylation of Ser14 + AMP binding	100%	110%	100%

Εικόνα 9: Ποσοστά ενεργοποίησης των ισομορφών των GP ανάλογα με την φωσφορυλίωση ή την σύνδεση AMP και η συνεργατικότητα της αλληλεπίδρασης (29).

Σύνδεση της AMP

Το κέντρο δέσμευσης της AMP, όπως προαναφέρθηκε, αποτελείται από τις έλικες α2 και α8 και το βρόχο β4/β5 της μίας υπομονάδας και το βρόχο-καλύπτρα της άλλης. Το κέντρο μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις περιοχές, την περιοχή που δεσμεύει τη ριβόζη, την περιοχή που δεσμεύει την αδενίνη και την περιοχή που δεσμεύει τη φωσφορική ομάδα. Σχηματίζονται 4 δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του κέντρου και της AMP, οι τρεις των οποίων είναι με την φωσφορική ομάδα της AMP: Tyr196 του βρόχου β4/β5, και της Arg309 και Arg310 που ανήκουν στην α8 έλικα. Η αλληλεπίδραση της Tyr196 είναι μοναδική, γιατί στις άλλες ισομορφές αυτό το κατάλοιπο είναι Phe. Η AMP σχηματίζει δεσμό υδρογόνου και με το βρόχο καλύπτρα στην θέση Asp42' και δεσμούς van der Waals με τις Asn44' και Val45'. Ωστόσο η έλικα α2 εμφανίζει μόνο κάποιους ασθενείς δεσμούς με την AMP, σχηματίζοντας δεσμούς van der Waals με τις πλευρικές αλυσίδες των Gln71 and Gln72, και ομοεπίπεδη επιστοίβαξη των αρωματικών δακτυλίων μεταξύ της αδενίνης και της Tyr75 (Εικ. 10). Η AMP εμπλέκεται σε συνολικά 8 δεσμούς υδρογόνου με το κέντρο πρόσδεσης AMP, σταθεροποιώντας τη σύνδεση. Αντίθετα στην ηπατική ισομορφή η AMP αλληλεπιδρά ασθενώς με το κέντρο πρόσδεσης, σχηματίζοντας μόνο 3 δεσμούς υδρογόνου (31).

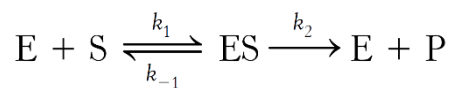


Εικόνα 10: Η δέσμευση του AMP στο κέντρο πρόσδεσής του στις τρεις ισομορφές (30).

1.5. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Τα ένζυμα (E) αποτελούν τους καταλύτες των αντιδράσεων στα βιολογικά συστήματα, και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιτάχυνση των αντιδράσεων για την ικανοποίηση βιολογικών αναγκών. Τα ένζυμα έχουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης για

τα υποστρώματα που δεσμεύουν (S), αλλά και για τις αντιδράσεις που καταλύουν. Όταν ένα ένζυμο καταλύει μια αντίδραση, το υπόστρωμα δεσμεύεται πρώτα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES). Σύμφωνα με τους Michaelis και Menten, το σύμπλοκο ES που σχηματίζεται είναι απαραίτητο ενδιάμεσο προϊόν για την ολοκλήρωση της κατάλυσης. Το σύμπλοκο διασπάται εκ νέου σε E και S ή σχηματίζει το προϊόν (P), όπως παρουσιάζεται στην αντίδραση:



Όπου k_1 , k_{-1} , k_2 οι κινητικές σταθερές των αντιδράσεων που απεικονίζονται.

Ο ρυθμός σχηματισμού των προϊόντων της αντίδρασης αντικατοπτρίζει την ταχύτητα της αντίδρασης, V_0 , και αυξάνεται όταν αυξάνεται και η συγκέντρωση του υποστρώματος. Όμως, η V_0 μπορεί να φτάσει μέχρι μία μέγιστη τιμή, την $V_{\max}$, και δεν μπορεί να αυξηθεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Η ταχύτητα της αντίδρασης μπορεί να υπολογιστεί από την ακόλουθη εξίσωση:

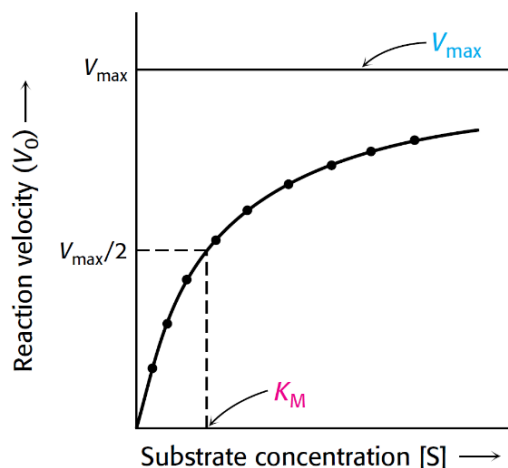
$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Όπου K_M η σταθερά Michaelis, η οποία είναι η ακόλουθη:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Η σταθερά K_M συνήθως διαφέρει ανάλογα το ένζυμο, αλλά και ανάλογα το υπόστρωμα του ενζύμου. Οι μονάδες της σταθεράς είναι συγκέντρωσης και υποδεικνύει την αλληλεπίδραση μεταξύ ενζύμου-υποστρώματος.

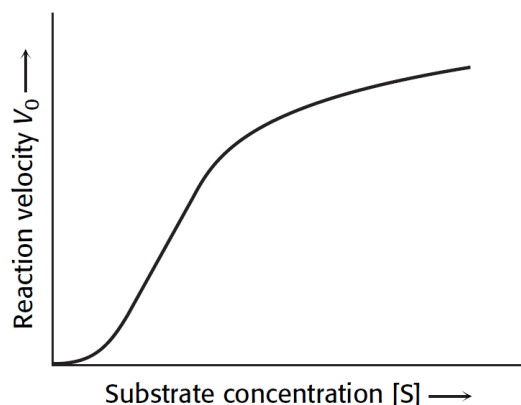
Οι Michaelis & Menten μελέτησαν το ένζυμο ιμβερτάση και δημιούργησαν ένα διάγραμμα της ταχύτητας της αντίδρασης προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (Εικ. 11). Όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι ίση με την K_M , τότε η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με την μισή από την μέγιστη ταχύτητα V_0 (32).



Εικόνα 11: Διάγραμμα ταχύτητας αντίδρασης ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (1).

1.5.1. Κινητική αλλοστερικών ενζύμων

Αν και η κινητική Michaelis-Menten μπορεί να ερμηνεύσει τη συμπεριφορά πολλών ενζύμων, υπάρχουν ένζυμα που δεν την ακολουθούν. Τα αλλοστερικά ένζυμα αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων ενζύμων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο. Τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν συνήθως σιγμοειδή καμπύλη, και χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλαπλών υπομονάδων και ενεργών κέντρων (Εικ. 12). Έτσι, η πρόσδεση ενός υποστρώματος σε κάποιο από τα ενεργά κέντρα είναι δυνατόν να ενισχύει (συνέργεια) ή να αναστέλλει τη σύνδεση σε άλλα κέντρα. Στην περίπτωση συνέργειας, παρατηρείται μια χαρακτηριστική σιγμοειδής καμπύλη ρυθμού. Βέβαια, η δραστικότητα των αλλοστερικών ενζύμων επηρεάζεται και από τη σύνδεση άλλων μορίων σε θέσεις εκτός του καταλυτικού κέντρου. Έτσι, η δραστικότητα των αλλοστερικών ενζύμων μπορεί να προσαρμοστεί στις ανάγκες του κυττάρου (1).



Εικόνα 12: Διάγραμμα κινητικής αλλοστερικού ενζύμου, που εμφανίζεται η χαρακτηριστική σιγμοειδής καμπύλη (1).

1.5.2. Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Όταν ορισμένα μικρά μόρια δεσμεύονται σε ένα ένζυμο, η δραστηριότητά του μπορεί να μειωθεί. Τα μόρια αυτά αποκαλούνται αναστολείς και μπορεί να είναι μη αντιστρεπτά συνδεδεμένα, δηλαδή συνδεδεμένα σταθερά με το ένζυμο και να διαχωρίζονται αργά από το σύμπλοκο ένζυμο/αναστολέας, είτε αντιστρεπτά συνδεδεμένα, δηλαδή να διαχωρίζονται γρήγορα από το σύμπλοκο ένζυμο/αναστολέας.

Η αντιστρεπτή αναστολή χωρίζεται σε διάφορα είδη. Περιλαμβάνει την συναγωνιστική αναστολή, όπου ο αναστολέας δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, την ασυναγωνιστή, όπου ο αναστολέας δεν δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο αλλά σε διαφορετική θέση στο σύμπλοκο ES, και η μικτή που ο αναστολέας δεσμεύεται στο ένζυμο και στο σύμπλοκο ES, σε σημείο εκτός του ενεργού κέντρου. Ιδιαίτερη περίπτωση μικτής αναστολής είναι η μη συναγωνιστική αναστολή, όπου το υπόστρωμα και ο αναστολέας δεσμεύονται ταυτόχρονα σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης. Σε μια τέτοια αναστολή, η K_M παραμένει σταθερή και η V_{max} μειώνεται.

Στη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας, συνήθως μια ένωση παρόμοια με το ενζυμικό υπόστρωμα, σχηματίζει σύμπλοκο με το ένζυμο (EI), αναστέλλοντας το σχηματισμό του συμπλόκου ES μειώνοντας την ταχύτητα κατάλυσης. Ως αποτέλεσμα, το υπόστρωμα ανταγωνίζεται τον αναστολέα στο ενεργό κέντρο. Με τη συναγωνιστική αναστολή, η K_M αυξάνεται, ενώ η V_{max} παραμένει σταθερή (1).

1.6. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου ως δυνητικός στόχος φαρμάκων για την θεραπεία εγκεφαλοπαθειών

Κοκκία α και β - γλυκανών εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα υγιών ατόμων. Αυτά τα κοκκία αποτελούνται από πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες που συσχετίζονται με την γήρανση και το κυτταρικό στρες. Μελέτες έχουν δείξει ότι η ύπαρξη αυτών των κοκκίων αποτελεί γενικό φαινόμενο που προκύπτει από την πάροδο των χρόνων ως αποτέλεσμα διαφορών επίκτητων χαρακτηριστικών που οδηγούν σε διαταραχές του μεταβολισμού της γλυκόζης. Συσσώρευση των κοκκίων αυτών συσχετίζεται με μια σειρά νευροεκφυλιστικών ασθενειών, μεταξύ των οποίων η νόσος του Alzheimer και η προοδευτική μυοκλονική επιληψία (ασθένεια Lafora) (28,33).

Η νόσος Lafora είναι μια σπάνια γενετική διαταραχή και το γονίδιο που την προκαλεί είναι αυτοσωμικό υπολειπόμενο. Τα συμπτώματα της παρουσιάζονται στην εφηβεία και συνήθως οδηγούν στο θάνατο 10 χρόνια μετά την εμφάνισή τους. Η διάγνωση της ασθένειας δεν είναι εύκολη καθώς τα αρχικά συμπτώματα της είναι επιληψίες που αντιμετωπίζονται με αντιεπιληπτικά φάρμακα. Τα επόμενα συμπτώματα αποτελούν την αλλαγή στη συμπεριφορά, κατάθλιψη, αταξία και δυσαρθρία. Οι κρίσεις σ' αυτές γίνεται συχνότερες με την πάροδο του χρόνου και οδηγούν τελικά σε κώμα και θάνατο.

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 2 γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην παρουσίαση της νόσου. Το ένα είναι το EMP2A, το οποίο κωδικοποιεί μια φωσφατάση που έχει διπλή εξειδίκευση, την λαφορίνη, και το άλλο είναι το NHLRC1, το οποίο κωδικοποιεί μια E3 λιγάση της ουβικιτίνης, η μάλινη. Τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στους νευρικούς ιστούς. Μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια οδηγούν στη συσσώρευση γλυκογόνου που δεν έχει διακλαδωθεί σωστά (σωμάτια Lafora), τα οποία οδηγούν σε απόπτωση των νευρικών κυττάρων και, τελικά, στον νευροεκφυλισμό (34).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι ο έλεγχος της κινητικής του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, και συγκεκριμένα του ισοενζύμου του εγκεφάλου όπως επίσης και κινητικές μελέτες παρουσία των αλλοστερικών προσδέτων AMP, IMP και ADP. Η έρευνα πάνω σε αυτά θα μας δώσει δεδομένα για την περαιτέρω εξερεύνηση του ενζύμου.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Υλικά-Όργανα

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
Acetic Acid	Fluka, Panreac
Acrylamide	Serva
Adenosine 5'-monophosphate monohydrate (AMP)	Sigma
Ammonium Sulfate	Fluka
Ammonium molybdate	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Sigma
Bis-Acrylamide	Serva
Bradford protein assay 5X	Bio-Rad
Bromophenol Blue	Research organics
Calcium Chloride dehydrate	Merck
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
D-(+)- Glucose	Sigma
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Panreac AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycerol	Panreac
Glycine	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hepes	Serva
Hydrochloric Acid (HCl)	Merck
Imidazole	Sigma
L-Ascorbic Acid	Sigma
Magnesium chloride, anhydrous, 99%	Alfa-Aesar
MTG (3-Mercapto-1,2-propanediol)	Sigma
Potassium Chloride (KCl)	Merck

SDS (Sodium dodecyl Sulfate- SDS)	Serva
Sodium Chloride (NaCl)	CHEM-LAB
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Serva
Triton X-100	Merck
β -Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate (β -G1P)	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Πυκνό διάλυμα αμμωνίας	Fluka
Potassium Bicarbonate	Sigma

Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

Όργανο	Εταιρία
ÄKTA purifier (FPLC system)	GE Healthcare Life Sciences
Stir plate	Nuova
Ultrasonic processor UP400S (400 W, 24kHz)	
Vortex	KISKER
Αναλυτικός ζυγός	KERN
Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Nichiryo
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Πεχάμετρο	Metrohm
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης	Biorad
Υδατόλουτρο, Wisbath	Wisd
Φυγόκεντρος	Hermle Labortechnik GmbH
	Hitachi
Φωτόμετρο	VWR
	PerkinElmer
Χρονόμετρο	Cell signaling technology

2.2. Χρωματογραφία

Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (FPLC)

Το ÄKTA FPLC (GE Healthcare) είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα καθαρισμού πρωτεϊνών. Σε αυτό το σύστημα, τα υγρά διαλύματα μετακινούνται υπό υψηλή πίεση χρησιμοποιώντας μια αντλία θετικής εκτόπισης. Για κάθε τύπο χρωματογραφίας (ιοντοανταλλαγή, συγγένεια, μοριακή διήθηση) χρησιμοποιείται μια ειδική στήλη, το υλικό πλήρωσης της οποίας είναι ένα πολυμερές (δεξτράνη, σεφαρόζη, αγαρόζη) που αντιπροσωπεύει τη στατική φάση και το υγρό διάλυμα που διέρχεται από το σύστημα αυτό είναι η κινητή φάση. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα καθαρισμού πρωτεϊνών ÄKTA Purifier UPC-900 εγκατεστημένο σε ψυκτικό χώρο στους 4° C. Το σύστημα περιλαμβάνει επίσης έναν συλλέκτη κλασμάτων για σωληνάρια των 5 mL και ένα φωτόμετρο UV για τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 280 nm, όπου παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο η περιεκτικότητα των κλασμάτων σε πρωτεΐνες. Ο έλεγχος των παραμέτρων καθαρισμού (διάλυμα, ρυθμός ροής, πίεση και όγκος κλάσματος) ρυθμίζεται από το λογισμικό UNICORN TM σύμφωνα με τις απαιτήσεις της πειραματικής διαδικασίας. Όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα που διέρχονται από το σύστημα πρέπει να φιλτράρονται και να απαερίζονται (35).

Η διαδικασία της χρωματογραφίας για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών έχει ως εξής:

- 1) Εξισορρόπηση: Σε αυτό το στάδιο, ένα ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα Buffer A διέρχεται από το σύστημα. Αυτό το διάλυμα απομακρύνει την αιθανόλη από τη στήλη (που χρησιμοποιείται για την αποθήκευση) και είναι συνήθως το διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη διαλυτοποίηση των κυττάρων. Επομένως, υπάρχει ομοιογένεια μεταξύ του δείγματος που αναλύεται και του διαλύματος εξισορρόπησης. Σε αυτό το στάδιο θεωρείται ότι τίποτα δεν είναι συνδεδεμένο στη στήλη, παρά μόνο ο ακινητοποιημένος προσδέτης. Η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280nm είναι κυρίως σταθερή, αλλά μπορεί να διαφέρει ελαφρώς, γεγονός που οφείλεται συνήθως στα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης.
- 2) Εισαγωγή δείγματος: Το δείγμα τοποθετείται στη στήλη έτσι ώστε η πρωτεΐνη-στόχος να προσδεθεί στα ακινητοποιημένα σωματίδια της στήλης. Τα

συστατικά του δείγματος που δεν κατάφεραν να δεσμευτούν απομακρύνονται από το σύστημα (flow-through) και η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm αυξάνεται από τις πρωτεΐνες που δεν κατάφεραν να δεσμευτούν σταθερά στον προσδέτη της στήλης.

- 3) Πλύση: Μετά την έγχυση του προς ανάλυση δείγματος, η στήλη πλένεται με διάλυμα πλύσης (Wash Buffer) για την απομάκρυνση των μη ειδικά συνδεδεμένων ή λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών. Σκοπός αυτού του βήματος είναι να διασφαλιστεί ότι μόνο πρωτεΐνες με υψηλή συγγένεια για τον προσδέτη παραμένουν στα σφαιρίδια της στήλης. Η στήλη πλένεται συνήθως με 5-10 όγκους διαλύματος πλύσης. Στο στάδιο αυτό παρατηρείται μείωση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm και μετά σταθεροποίηση, η οποία οφείλεται στην απομάκρυνση των ανεπιθύμητων πρωτεϊνών.
- 4) Έκλουση: Το τελευταίο βήμα είναι η έκλουση για την απομόνωση μιας πρωτεΐνης υψηλής καθαρότητας. Η έκλουση πραγματοποιείται με τη χρήση βαθμίδωσης συγκέντρωσης ή με την εντολή στο σύστημα να χρησιμοποιεί μόνο έναν τύπο ρυθμιστικού διαλύματος, το ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer). Η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης περιγράφεται συνήθως στο εγχειρίδιο οδηγιών που προσφέρεται με την χρωματογραφική στήλη. Κατά τη διαδικασία έκλουσης, οι δεσμευμένες πρωτεΐνες-στόχοι απομακρύνονται από τη στήλη και ανακτώνται ως κλάσμα υψηλού καθαρισμού. Στόχος αυτού του βήματος είναι η τελική απομόνωση της πρωτεΐνης-στόχου με τη μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα.

Το pH όλων των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 8, και η σύστασή τους αναφέρεται στο ακόλουθο διάγραμμα:

	Tris	Triton	Ιμιδαζόλιο
Buffer A	50 mM	0,1%	10 mM
Wash Buffer	50 mM	0,1%	20 mM
Elution Buffer	50 mM	0,1%	500 mM

Χρωματογραφία συγγένειας

Η πιο κοινή χρωματογραφική μέθοδος είναι η χρωματογραφία συγγένειας. Η μέθοδος αυτή έχει διαδοθεί ευρέως λόγω της ισχυρής, αντιστρεπτής και ιδιαίτερα επιλεκτικής σύνδεσης μεταξύ ορισμένων χημικών ομάδων. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί σύνδεση μεταξύ ενζύμου-υποστρώματος, αντιγόνου-αντισώματος και ορμόνης-υποδοχέα. Στις στήλες, ο προσδέτης είναι ακινητοποιημένος στη στατική φάση και η επιθυμητή πρωτεΐνη έχει ένα κατάλληλο για σύνδεση τμήμα (ετικέτα ιστιδίνης) στο N- ή C-τελικό άκρο της. Στη συνέχεια, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη αποσπάται με αλλαγή των πειραματικών συνθηκών (αλλαγή του pH, της ιοντικής ισχύος, προσθήκη ανταγωνιστών του προσδέτη). Σε αυτό το πείραμα, η πρωτεΐνη hbGP που μας ενδιαφέρει έχει μια ετικέτα 6 ιστιδινών (6x-His tag) στο N-τελικό άκρο, η οποία παρουσιάζει συγγένεια για δισθενή ιόντα (Ni^{2+} , Co^{2+}), και χρησιμοποιήθηκε ιμιδαζόλιο ως μέσο έκλυσης λόγω της υψηλής συγγένειάς της για το δακτύλιο ιστιδίνης (36).

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Μια άλλη χρωματογραφική μέθοδος είναι η χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Στη μέθοδο αυτή, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθος των μορίων τους. Τυπικά, το μέγεθος των πόρων του πολυμερούς είναι 0,1 mm. Στο εσωτερικό της στήλης, οι πρωτεΐνες και άλλα συστατικά του δείγματος ακολουθούν συγκεκριμένες διαδρομές ανάλογα με το μέγεθός τους. Συγκεκριμένα, τα μεγάλα μόρια διαλύονται στην υδατική φάση εκτός του πλέγματος που σχηματίζουν τα αδιάλυτα πολυμερή της στήλης, ενώ τα μικρά μόρια διαλύονται τόσο εντός όσο και εκτός της υδατικής φάσης του πλέγματος. Έτσι, τα μεγάλα μόρια εκλύονται πρώτα λόγω της σύντομης διαδρομής που διανύουν, ενώ το αντίθετο ισχύει για τα μικρά μόρια.

2.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορα μόρια, όπως οι πρωτεΐνες, DNA και RNA, και στηρίζεται στην ικανότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και να διαχωριστούν μεταξύ τους. Με αυτήν την μέθοδο μπορεί να χαρακτηριστεί το μοριακό βάρος, το φορτίο και η καθαρότητα μιας πρωτεΐνης.

Ο διαχωρισμός μέσω ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται κυρίως σε πηκτή ακρυλαμίδης, η οποία συνθέτει τρισδιάστατο πλέγμα μακρών αλειφατικών αλυσίδων

πολυακρυλαμίδης, που αποτελούν χημικά ουδέτερες ενώσεις που συνδέονται μεταξύ τους μέσω της N-N μεθύλενο-δισ-ακρυλαμίδης (MBA). Ανάλογα με την συγκέντρωση της ακρυλαμίδης και της MBA, μπορεί να ελεγχθεί το μέγεθος των πόρων που σχηματίζονται. Η πηκτή πολυακρυλαμίδης σχηματίζεται μετά από τον πολυμερισμό μονομερών ακρυλαμίδης και του MBA σε θερμοκρασία δωματίου με την χρήση παραγόντων πολυμερισμού, όπως το υπερθειικό αμμώνιο (APS) και το N,N,N,N-τετραμέθυλο-1,2-διάμινο-αιθάνιο (TEMED), το οποίο πραγματοποιεί τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πλέγματος με μέγεθος πόρων που ποικίλει ανάλογα με την συνολική συγκέντρωση της ακρυλαμίδης και MBA, καθώς και του λόγου της σχετικής συγκέντρωσης της MBA ως προς την ακρυλαμίδα. Οι πηκτές με χαμηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου έχουν μεγαλύτερους πόρους και αντίστροφα.

Οι πηκτές SDS χρησιμοποιούν ένα απορρυπαντικό, το SDS, που μετουσιώνει τις πρωτεΐνες. Το SDS είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο και μπορεί να συνδεθεί με τις πρωτεΐνες, εξαλείφοντας τις μοριακές αλληλεπιδράσεις και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Επομένως, όλες οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες και μπορούν να κινηθούν προς τον θετικό πόλο υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Όταν οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε πηκτή με SDS, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται ανάλογα μοριακή τους μάζα και όχι με βάση το φορτίο ή τη διαμόρφωσή τους. Επομένως, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε πηκτές αυτού του τύπου βασίζεται μόνο στο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης και όχι στη διαμόρφωση ή το φορτίο της. Γενικά, όσο μικρότερη είναι η πρωτεΐνη, τόσο πιο γρήγορα κινείται και τόσο μεγαλύτερη είναι η απόσταση που μπορεί να καλύψει. Η διαδικασία για να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη ξεκινά με την προσθήκη SDS. Στην συνέχεια χρησιμοποιείται β-μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και με θέρμανση συντελείται η αποδιάταξη. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, γίνεται αντίχνευση των πρωτεϊνών με την χρώση του κυανού του Coomassie.

2.4. Απομόνωση φωσφορυλάσης από κύτταρα *E. coli* (ανασυνδυασμένη hbGPb)

Από ανασυνδυασμένα κύτταρα *E. coli* που είχαν σχεδιαστεί για την υπερέκφραση της ανθρώπινης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του εγκεφάλου θα γίνει η απομόνωση του

ενζύμου. Τα κύτταρα ήταν αποθηκευμένα σε μορφή pellet και έγινε διάλυση τους σε 50 mL Buffer A. Μετά την διαλυτοποίηση προστέθηκε στο διάλυμα μία νουκλεάση και επώαση για 15 λεπτά. Μετά διαλυτοποιούνται το βακτηριακό ίζημα σε συσκευή υπερήχων (sonicator) για 4 φορές από 30 δευτερόλεπτα ON και 30 δευτερόλεπτα OFF. Το μείγμα στην συνέχεια φυγοκεντρείται για 1 ώρα στους 4° C σε 15000 rpm, και στο τέλος φιλτράρεται το υπερκείμενο με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm. Αποθήκευση σε πάγο.

Καθαρισμός της hbGP

HiTrap TALON crude (ακίνητοποιημένα ιόντα Co²⁺ σε σφαιρίδια σεφαρόζης)

Για την εξισορρόπηση της στήλης χρησιμοποιήθηκε το Buffer A, όπου περάστηκαν 10 όγκοι της στήλης με ροή 0,5 mL/min. Έπειτα έγινε η έγχυση του δείγματος στην στήλη με ροή 0,3 mL/min και έγινε συλλογή κλασμάτων των 5 mL. Η έκπλυση της στήλης έγινε με το Wash Buffer για 10 όγκους στήλης με ροή 1 mL/min, έως η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να πλησιάσει το 0. Τέλος έγινε έκλυση με διάλυμα με μεγάλη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (500 mM). Τα κλάσματα αναλύθηκαν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες και ελέγχθηκε σε ποια κλάσματα υπάρχει η πρωτεΐνη με μεγαλύτερη καθαρότητα. Τα κλάσματα που έχουν την μεγαλύτερη καθαρότητα συγκεντρώνονται και ακολουθεί διαπίδυση σε διάλυμα 50:50:1. Το διάλυμα αυτό συνίσταται από 50 mM β-φωσφορική γλυκερόλη, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, και 1 mM EDTA. Μετά την διαπίδυση, προστίθεται στο δείγμα θρομβίνη (0,5 u/mg) για 4 ώρες. Η θρομβίνη προστίθεται για την κοπή της ετικέτας ιστιδίνης από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Superdex S200.

Για την εξισορρόπηση της στήλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 50:50:1 ίσο με τον όγκο της στήλης (120 mL), το δείγμα εκχύνεται στο σύστημα με ρυθμό ροής 0,5 mL/min. Ο όγκος των συλλεχθέντων κλασμάτων ήταν 1 mL και ακολούθησε τοποθέτηση των δειγμάτων σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης υπό διατακτικές συνθήκες. Τέλος, έγινε συμπύκνωση του δείγματος με φίλτρο με κατώφλι 30 kDa.

2.5. Φωσφορυλίωση της GPb και μετατροπή σε GPa

Για να εκτιμηθεί η δραστηριότητα της hbGP_a, η hbGP_b πρέπει να φωσφορυλιωθεί. Η φωσφορυλίωση αυτή πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της rmPhkγ σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό. Η φωσφορυλίωση έγινε μετά τον καθαρισμό της hbGP και χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα, 2 mM ATP, 10 ng/mL rmPhkγ-trunc και 0,5 mg/mL hbGP. Προστέθηκαν 5 mg/mL BSA για να αποφευχθεί η προσκόλληση του ενζύμου στα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα. Η αντίδραση ξεκίνησε μετά την προσθήκη ATP και έγινε επώαση σε υδατόλουτρο στους 30 °C για 1 ώρα και 30 λεπτά. Στο τέλος της αντίδρασης, το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετήθηκε σε πάγο για να σταματήσει η αντίδραση.

2.6. Κινητικές μελέτες της ανασυνδυασμένης hbGP_a παρουσία AMP, IMP, ADP

Για την ποσοτικοποίηση της αντίδρασης τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* καταλύθηκε η αντίστροφη αντίδραση που μας δίνει ως προϊόν ορθοφωσφορικά ιόντα των οποίων η συγκέντρωσή τους μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτομετρικές τεχνικές. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δραστηριότητα της hbGP_b παρουσία AMP και η δραστηριότητα της hbGP_a παρουσία AMP, IMP και ADP.

Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου

Για να ποσοτικοποιηθούν και να αναλυθούν τα αποτελέσματα των κινητικών αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ασκορβικού-μολυβδαινικού. Τα φωσφορικά ιόντα, που είναι το προϊόν της αντίδρασης, μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου σε pH 5. Το σύμπλοκο μπορεί να αναχθεί από το ασκορβικό οξύ, σχηματίζοντας ένα χρωμοφόρο σύμπλοκο που απορροφά σε μήκος κύματος 850 nm. Η αύξηση της απορρόφησης υποδηλώνει αύξηση της συγκέντρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων στο δείγμα. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

Διάλυμα 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου/ 100 mM οξικού ψευδαργύρου (pH 5): επιτρέπει τον σχηματισμό συμπλόκου με τα ορθοφωσφορικά ιόντα. Η ρύθμιση του pH έγινε με διάλυμα πυκνού HCl και διατήρηση σε αδιαφανές μπουκάλι.

Διάλυμα 10% (w/v) ασκορβικού οξέος (pH 5): ρύθμιση pH με πυκνό διάλυμα NaOH. Συχνή ανανέωση του διαλύματος και διατήρηση σε αδιαφανές μπουκάλι.

Τα διαλύματα αναμιγνύονται σε λόγο 4 προς 1 και στην συνέχεια το διάλυμα παραμένει σε σκοτεινό μέρος για 15 λεπτά για να σχηματιστούν έγχρωμες ενώσεις. Έπειτα προστίθενται 700 μL του διαλύματος στα δείγματα, τα οποία επωάζονται σε υδατόλουτρο για 15 λεπτά και ακολουθεί η φωτομέτρηση τους. Για να υπολογιστεί η ποσότητα των ορθοφωσφορικών ιόντων σε ένα άγνωστο δείγμα πρέπει να κατασκευαστεί και ένα πρότυπο δείγμα γνωστής συγκέντρωσης ορθοφωσφορικών ιόντων ως σημείο αναφοράς.

Υπολογισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο της δραστηριότητας του ενζύμου είναι η ακόλουθη:

Σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 30° C επωάζεται το ενζυμικό διάλυμα για 15 λεπτά και το διάλυμα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος για 3 λεπτά.

Στον χρόνο 0 ξεκινάμε την αντίδραση, προσθέτοντας 36 μL του ενζυμικού διαλύματος στα διάφορα δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης υποστρωμάτων και ενεργοποιητών-αναστολέων (AMP, IMP, ADP) όγκου 144 μL . Ο τελικός όγκος των διαλυμάτων είναι 180 μL .

Κάθε 5 λεπτά παίρνουμε 40 μL από κάθε δείγμα και προστίθενται σε νέο δοκιμαστικό σωληνάριο που περιέχει 10 μL SDS (1% w/v) με σκοπό την διακοπή της αντίδρασης. Αυτό γίνεται μέχρι τα 20 λεπτά.

Στα τελευταία σωληνάρια προστίθενται 700 μL διαλύματος ασκορβικού/μολυβδαινικού και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά. Μετά τα δείγματα είναι έτοιμα για φωτομέτρηση και μέτρηση της ποσότητας των ορθοφωσφορικών ιόντων (P_i). Μαζί με τα δείγματα γίνεται φωτομέτρηση τυφλού του ενζυμικού διαλύματος, τυφλού του υποστρώματος και διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης P_i .

Τα ενζυμικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν την ακόλουθη σύσταση:

	GPa/GPb (πριν την ανάμιξη, 36 μL)	GPa/GPb (μετά την ανάμιξη, 180 μL)
Γλυκογόνο	1%	0,2%
ρ.δ. 50:50:1	5%	1%
Ένζυμο (GPa ή GPb)	5 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$

Τα διαλύματα με τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν την ακόλουθη σύσταση:

- Κατά την εξέταση hbGPb με AMP η σύσταση των διαλυμάτων ήταν με 100 μM G1P και AMP συγκέντρωσης 10-20-30-200 και 1000 μM
- Κατά την εξέταση hbGPa με AMP η σύσταση των διαλυμάτων ήταν με 100 μM G1P και AMP συγκέντρωσης 0,1-0,25-0,5-1-2 και 4 μM
- Κατά την εξέταση hbGPa με IMP η σύσταση των διαλυμάτων ήταν με 100 μM G1P και IMP συγκέντρωσης 0,01-0,05-0,1-0,25-0,5 και 1 μM
- Κατά την εξέταση hbGPa με ADP η σύσταση των διαλυμάτων ήταν με 100 μM G1P και ADP συγκέντρωσης 0,5-1-2-4 και 10 μM

2.7. Ανάλυση κινητικών δεδομένων

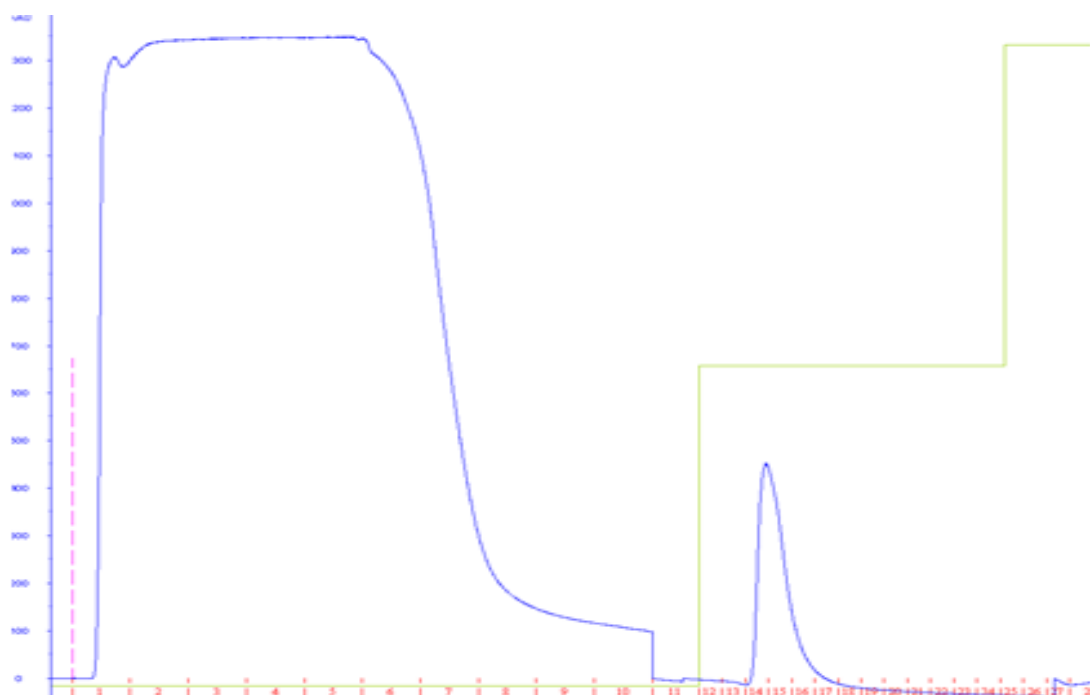
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των κινητικών μελετών έγινε μέσω του υπολογιστικού προγράμματος GraFit, με το οποίο σχεδιάστηκαν και τα διαγράμματα της κινητικής του ενζύμου, για τον προσδιορισμό των παραμέτρων όπως η K_M και η $V_{\max}$. Πρώτον, η απορρόφηση του δείγματος στα 850 nm κανονικοποιήθηκε ως προς την απορρόφηση της G1P και των ορθοφωσφορικών ιόντων στο διάλυμα και μετατράπηκε σε μmol ορθοφωσφορικών ιόντων χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη. Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης μετρήθηκαν φωτομετρικά διαλύματα ορθοφωσφορικών ιόντων γνωστής συγκέντρωσης. 40 μL διαλύματος φωσφορικών ιόντων 1 mM περιέχουν 0,04 μmol ορθοφωσφορικών. Εάν η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος είναι A, η

απορρόφηση αυτή υποδηλώνει την παρουσία 0,04 μmol ορθοφωσφορικού. Έτσι, υπολογίζεται ο αριθμός της ποσότητας των ιόντων για κάθε δείγμα.

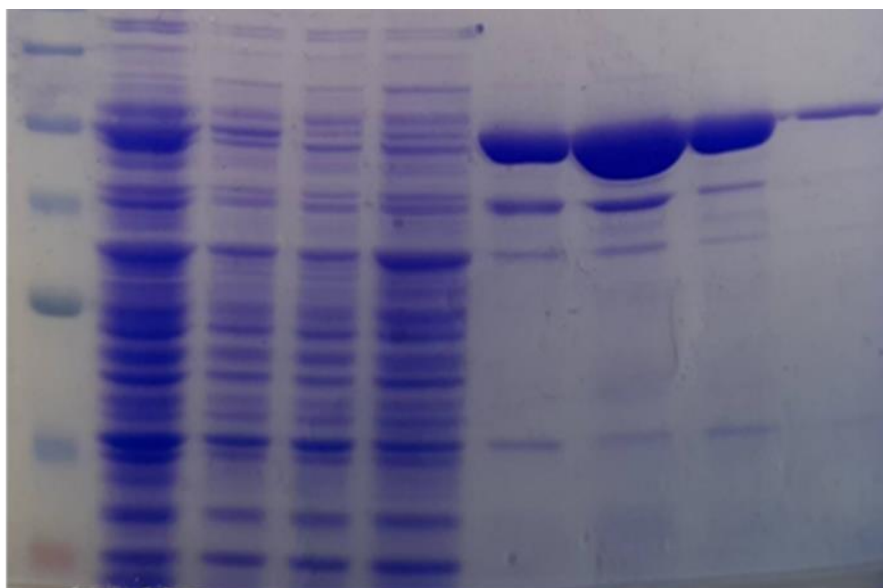
3. Αποτελέσματα

3.1. Απομόνωση του ανασυνδιασμένου ενζύμου bGP

Στο πρώτο στάδιο της απομόνωσης της bGP πραγματοποιείται χρωματογραφία συγγένειας. Η στήλη περιέχει Co^{2+} , στο οποίο προσδένεται ισχυρά η πρωτεΐνη προς απομόνωση λόγω της ετικέτας ιστιδίνης που περιέχει. Στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν πριν την έκλυση περιείχαν μικρή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, το οποίο δεν αποτρέπει τη δέσμευση της πρωτεΐνης αλλά βοηθά στην μη ειδική πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών. Στα δείγματα γίνεται ηλεκτροφόρηση για την ταυτοποίηση των κλασμάτων που περιέχουν την περισσότερη πρωτεΐνη και σε μεγαλύτερη καθαρότητα.

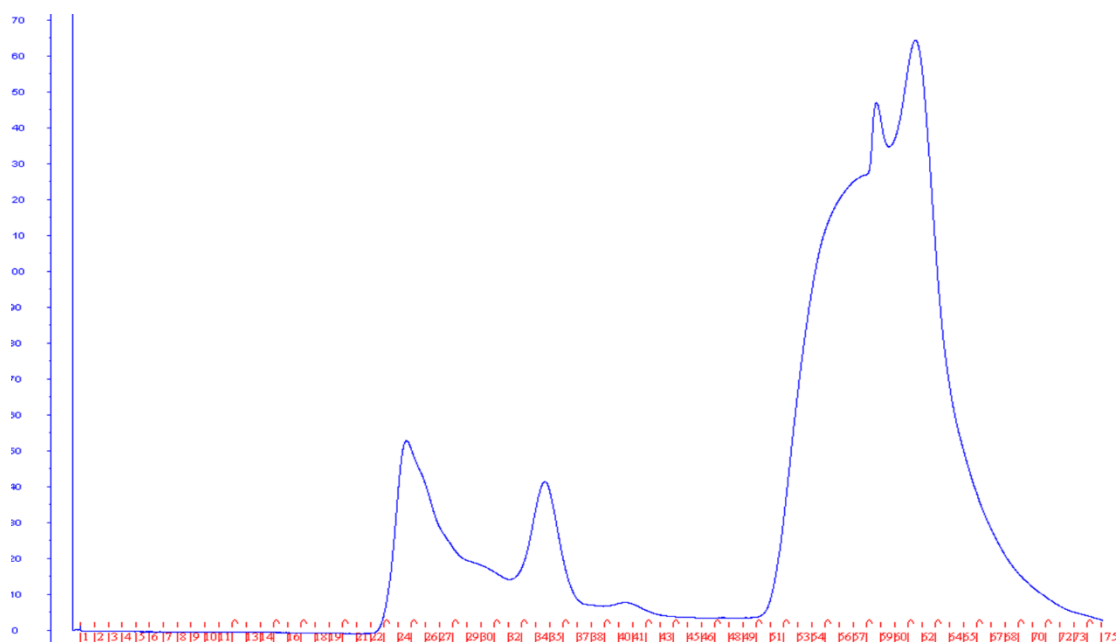


Εικόνα 13: Χρωματογράφημα συγγένειας (1^ο στάδιο απομόνωσης της hbGP). Στα κλάσματα 1-10 περιέχουν τις πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με την στήλη (Flow Through). Στα κλάσματα 11-13 αποτελούνται από τις πρωτεΐνες που έχουν χαμηλή συγγένεια με την στήλη (Wash) και στα κλάσματα 14-16 περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη.

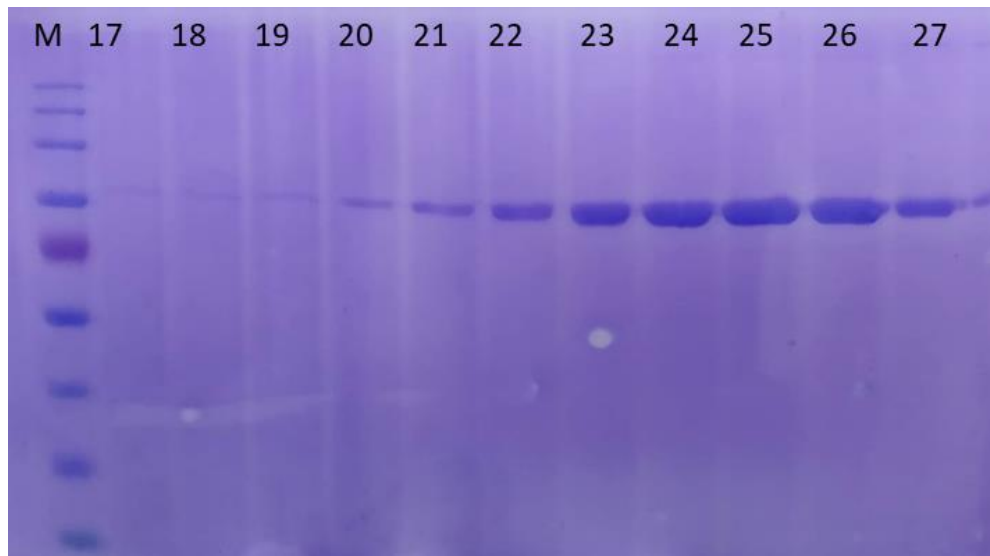


Εικόνα 14: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης από τα δείγματα χρωματογραφίας συγγένειας. Οι διαδρομές που παρατηρούνται είναι (από αριστερά προς δεξιά): Μάρτυρας, Total (ολικό δείγμα πριν τη φυγοκέντρηση), Input (δείγμα που εισήχθη για χρωματογραφία), Flow Through, Wash, κλάσματα 14-17.

Μετά την πρώτη χρωματογραφία συγγένειας γίνεται η αποκοπή της ετικέτας ιστιδίνης με την θρομβίνη και ακολούθησε χρωματογραφία μοριακής διήθησης για τον διαχωρισμό διάφορων υπολειμμάτων, καθώς και της θρομβίνης.

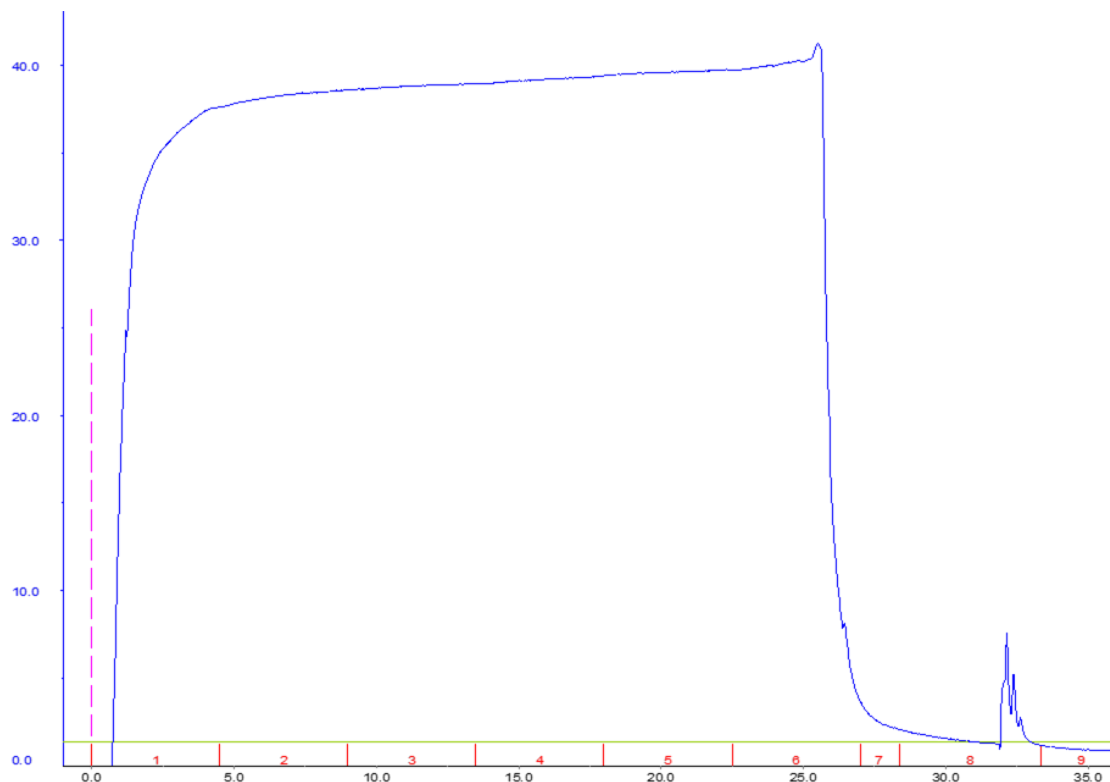


Εικόνα 15: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης (2ο στάδιο απομόνωσης hbGP). Η επιθυμητή πρωτεΐνη εντοπίζεται στα κλάσματα 23-28.

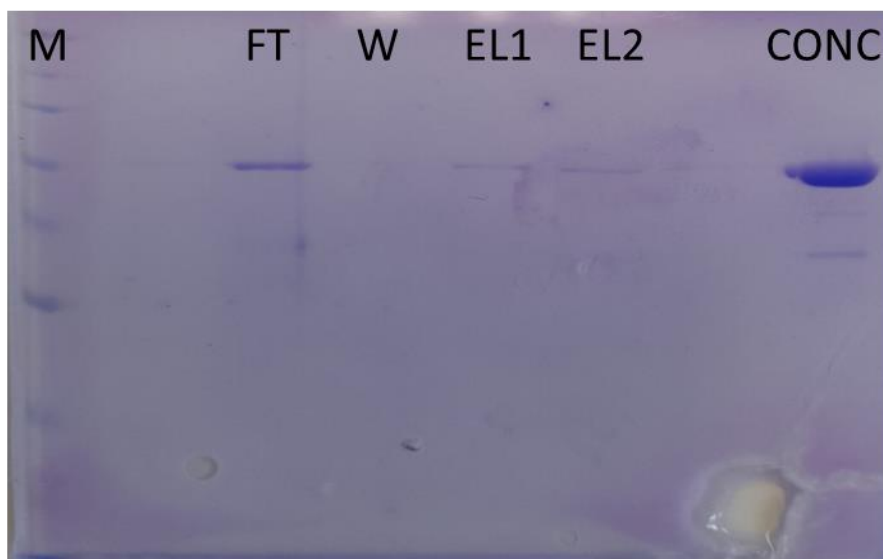


Εικόνα 16: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης από τα δείγματα χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Οι διαδρομές που παρατηρούνται είναι (από αριστερά προς δεξιά): Μάρτυρας, κλάσματα 17-27.

Τέλος, ακολουθεί μία ακόμη χρωματογραφία συγγένειας για να διαχωριστεί η πρωτεΐνη που έχει αποκοπεί η ετικέτα ιστιδίνης με αυτήν που δεν έχει αποκοπεί. Σε αυτήν την χρωματογραφία η πρωτεΐνη προς απομόνωση βρίσκεται στο Flow Through.



Εικόνα 17: 2^ο χρωματογράφημα συγγένειας (3^ο στάδιο απομόνωσης της hbGP). Στα κλάσματα 1-6 περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη, καθώς δεν προσδένεται στην στήλη, άρα δεν έχει την ετικέτα ιστιδίνης.



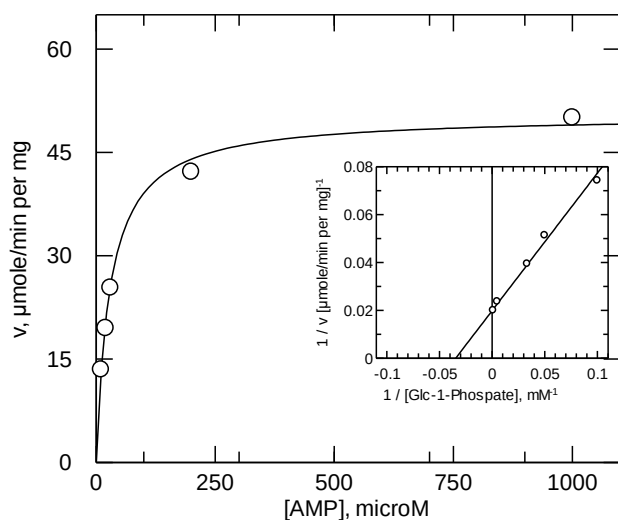
Εικόνα 18: Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης από τα δείγματα της 2^{ης} χρωματογραφίας συγγένειας. Οι διαδρομές που παρατηρούνται είναι (από αριστερά προς τα δεξιά): Μάρτυρας, Flow Through (επιθυμητή πρωτεΐνη), Wash, κλάσματα έκπλυσης 1 και 2, και τέλος η συμπυκνωμένη πρωτεΐνη.

Στα τελικά κλάσματα που περιέχουν την περισσότερη και καθαρότερη πρωτεΐνη πραγματοποιείται συμπύκνωση και με τη μέθοδο Bradford γίνεται η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Στο τέλος πραγματοποιείται η συμπύκνωση του πρωτεϊνικού δείγματος.

3.2. Κινητικές μελέτες

3.2.1. Προσδιορισμός της K_a της μη φωσφορυλιωμένης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (bGPb) ως προς την συγκέντρωση της AMP.

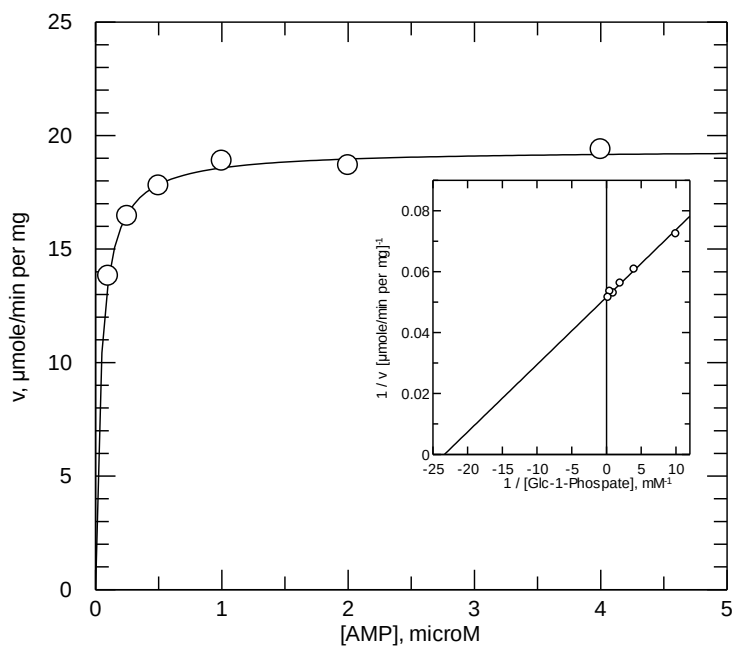
Η K_a της bGPb ως προς την συγκέντρωση της AMP βρέθηκε ότι είναι $29,00 \pm 2,05 \mu\text{M}$



Εικόνα 19: Διάγραμμα κινητικής bGPb-AMP Michaelis-Menten και Lineweaver-Burk, από τα οποία γίνεται δυνατός ο προσδιορισμός της K_a της GP σε σχέση με την συγκέντρωση του AMP.

3.2.2. Προσδιορισμός της K_a της φωσφορυλιωμένης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (bGPα) ως προς την συγκέντρωση της AMP.

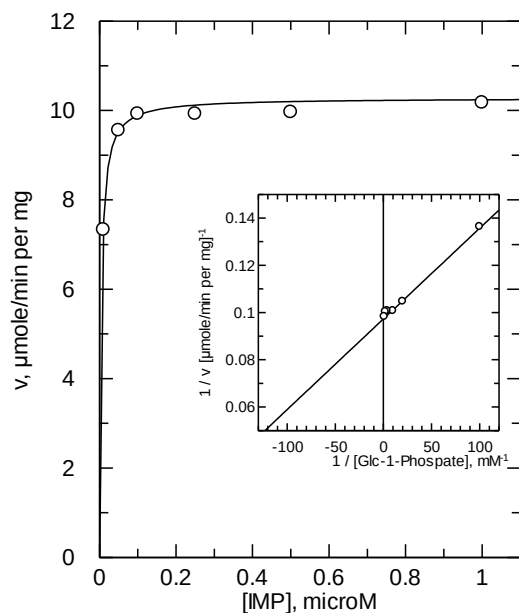
Η K_a της bGPα ως προς την συγκέντρωση της AMP βρέθηκε ότι είναι $42,9 \pm 3,2 \text{ nM}$



Εικόνα 20: Διάγραμμα κινητικής bGPα-AMP Michaelis-Menten και Lineweaver-Burk, από τα οποία γίνεται δυνατός ο προσδιορισμός της K_a της GP σε σχέση με την συγκέντρωση του AMP.

3.2.3. Προσδιορισμός της K_a της φωσφορυλιωμένης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (bGPα) ως προς την συγκέντρωση της IMP.

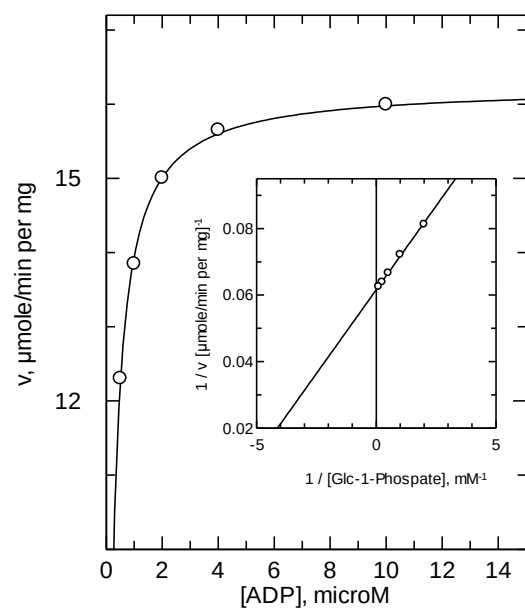
Η K_a της bGPα ως προς την συγκέντρωση της IMP βρέθηκε ότι είναι $3,9 \pm 0,3$ nM



Εικόνα 21: Διάγραμμα κινητικής bGPα-IMP Michaelis-Menten και Lineweaver-Burk, από τα οποία γίνεται δυνατός ο προσδιορισμός της K_a της GP σε σχέση με την συγκέντρωση του IMP.

3.2.4. Προσδιορισμός της K_a της φωσφορυλιωμένης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (bGPα) ως προς την συγκέντρωση της ADP.

Η K_a της bGPα ως προς την συγκέντρωση της ADP βρέθηκε ότι είναι $163,7 \pm 5,7$ nM



Εικόνα 22: Διάγραμμα κινητικής bGPa-ADP Michaelis-Menten και Lineweaver-Burk, από τα οποία γίνεται δυνατός ο προσδιορισμός της K_a της GP σε σχέση με την συγκέντρωση του ADP.

4. Συζήτηση

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ένα από τα πιο σημαντικά ένζυμα για τη μελέτη του μεταβολισμού του γλυκογόνου, και για αυτό έχουν γίνει αρκετές μελέτες πάνω σε αυτό το ένζυμο. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται σε τρείς ισομορφές οι οποίες εντοπίζονται στον εγκέφαλο στους μυς και στο ήπαρ. Οι 2 τελευταίες ισομορφές έχουν μελετηθεί αρκετά μέχρι στιγμής καθώς έχουν απομονωθεί και κρυσταλλωθεί εδώ και πολλά χρόνια. Όσον αφορά τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου, η απομόνωση και η κρυστάλλωση της πραγματοποιήθηκε πρόσφατα και δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία εξετάστηκε η δραστηριότητα του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου στην μη φωσφορυλιωμένη της μορφή (GPb) παρουσία AMP, και της φωσφορυλιωμένης μορφής (GPa) παρουσία των AMP, IMP και ADP. Τα τρία αυτά μόρια αποτελούν φυσικούς προσδότες και ο έλεγχος της δραστηριότητας παρουσία αυτών των μορίων θα βοηθήσει στην κατανόηση των διαδικασιών που πραγματοποιούνται μέσα στα κύτταρα για την ενεργοποίηση του ενζύμου.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου εμφανίζει πολλές ομοιότητες με τις άλλες 2 ισομορφές, αλλά και αρκετές διαφορές, κυρίως όσον αφορά τη ρύθμισή της και την ενεργοποίησή της. Περισσότερες αναλύσεις στην δομή και τον τρόπο αλληλεπίδρασης της με αλλοστερικούς παράγοντες θα μας βοηθήσουν στην κατανόηση και τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών που σχετίζονται με τις διαταραχές του μεταβολισμού του γλυκογόνου στον εγκέφαλο. Το μονοπάτι της εξερεύνησης αυτής της ισομορφής ξεκίνα τώρα, με την μελέτη των ενδοκυτταρικών παραγόντων που επηρεάζουν την ενεργότητα αυτού του ενζύμου.

Βιβλιογραφία

1. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.
2. Mesquita I, Rodrigues F. Cellular Metabolism at a Glance. Exp Suppl. 2018;109:3-27. doi: 10.1007/978-3-319-74932-7_1.
3. Adeva-Andany MM, González-Lucán M, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C, Ameneiros-Rodríguez E. Glycogen metabolism in humans. BBA Clinical. 2016 Jun 1;5:85–100. doi: 10.1016/j.bbacli.2016.02.001.
4. Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. Biochem J. 2012 Feb 1;441(3):763–87. doi: 10.1042/BJ20111416
5. Nelson DL, Cox MM. Lehninger's Βασικές Αρχές Βιοχημείας, 7η Αγγλική έκδοση, 2η ελληνική έκδοση. Broken Hill; 2018.
6. N.V. Bhagavan, Chung-Eun Ha. Chapter 14 - Carbohydrate Metabolism II: Gluconeogenesis, Glycogen Synthesis and Breakdown, and Alternative Pathways. Essentials of Medical Biochemistry. 2nd ed. Academic Press. 2015. doi: 10.1016/B978-0-12-416687-5.00014-2
7. Engelking LR. Chapter 23 - Glycogen. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry 3rd ed. Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-391909-0.50023-2
8. Leão R. GLYCOGEN. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. 2nd ed. Elsevier. doi: 10.1016/B0-12-227055-X/00563-0
9. Wu L, Butler NJM, Swanson RA. Technical and Comparative Aspects of Brain Glycogen Metabolism. Adv Neurobiol. 2019;23:169-185. doi: 10.1007/978-3-030-27480-1_6.
10. Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. Biochem J. 2008 Aug 15;414(1):1-18. doi: 10.1042/BJ20080595
11. Fujii Y, Makino Y, Sato M. A new interpretation of sulfate activation of rabbit muscle glycogen phosphorylase. Glycoconj J. 2018 Jun;35(3):299-309. doi: 10.1007/s10719-018-9823-x.
12. Pilkis SJ, Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. Annu Rev Physiol. 1992;54:885-909. doi: 10.1146/annurev.ph.54.030192.004321.
13. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelman G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. Nature. 2001 Sep 13;413(6852):131-8. doi: 10.1038/35093050.
14. Brook CG, Marshall NJ. Βασική ενδοκρινολογία. 4η έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου; 2003.
15. Hudson JW, Hefferon KL, Crerar MM. Comparative analysis of species-independent, isozyme-specific amino-acid substitutions in mammalian muscle, brain and liver glycogen phosphorylases. Biochim Biophys Acta. 1993 Jul 10;1164(2):197-208. doi: 10.1016/0167-4838(93)90248-p.
16. Mathieu C, Dupret JM, Rodrigues-Lima F. The Structure and the Regulation of Glycogen Phosphorylases in Brain. Adv Neurobiol. 2019;23:125-145. doi: 10.1007/978-3-030-27480-1_4.
17. Livanova NB, Chebotareva NA, Eronina TB, Kurganov BI. Pyridoxal 5'-phosphate as a catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase B. Biochemistry (Mosc). 2002 Oct;67(10):1089-98. doi: 10.1023/a:1020978825802.
18. Liang J, Han Q, Tan Y, Ding H, Li J. Current Advances on Structure-Function Relationships of Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Enzymes. Front Mol Biosci. 2019 Mar 5;6:4. doi: 10.3389/fmolb.2019.00004.

19. Rossignoli G, Phillips RS, Astegno A, Menegazzi M, Voltattorni CB, Bertoldi M. Phosphorylation of pyridoxal 5'-phosphate enzymes: an intriguing and neglected topic. *Amino Acids*. 2018 Feb;50(2):205-215. doi: 10.1007/s00726-017-2521-3.
20. Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Oct;13(10):572-587. doi: 10.1038/nrendo.2017.80.
21. Agius L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Mol Aspects Med*. 2015 Dec;46:34-45. doi: 10.1016/j.mam.2015.09.002.
22. Nadeau OW, Fontes JD, Carlson GM. The regulation of glycogenolysis in the brain. *J Biol Chem*. 2018 May 11;293(19):7099-7107. doi: 10.1074/jbc.R117.803023.
23. Parmenopoulou V, Kantsadi AL, Tsirkone VG, Chatzileontiadiou DS, Manta S, Zographos SE, Molfeta C, Archontis G, Agius L, Hayes JM, Leonidas DD, Komiotis D. Structure based inhibitor design targeting glycogen phosphorylase B. Virtual screening, synthesis, biochemical and biological assessment of novel N-acyl- β -d-glucopyranosylamines. *Bioorg Med Chem*. 2014 Sep 1;22(17):4810-25. doi: 10.1016/j.bmc.2014.06.058.
24. Leonidas DD, Zographos SE, Tsitsanou KE, Skamnaki VT, Stravodimos G, Kyriakis E. Glycogen phosphorylase revisited: extending the resolution of the R- and T-state structures of the free enzyme and in complex with allosteric activators. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2021 Sep 1;77(Pt 9):303-311. doi: 10.1107/S2053230X21008542.
25. Hayes JM, Kantsadi AL, Leonidas DD. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: Potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochemistry Reviews*. 2014 May 18;13(2):471-498. doi: 10.1007/s11101-014-9360-6.
26. Pinotsis N, Leonidas DD, Chrysina ED, Oikonomakos NG, Mavridis IM. The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Protein Sci*. 2003 Sep;12(9):1914-24. doi: 10.1110/ps.03149503.
27. Kantsadi AL, Apostolou A, Theofanous S, Stravodimos GA, Kyriakis E, Gorgogietas VA, Chatzileontiadiou DS, Pegiou K, Skamnaki VT, Stagos D, Kouretas D, Psarra AM, Haroutounian SA, Leonidas DD. Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food Chem Toxicol*. 2014 May;67:35-43. doi: 10.1016/j.fct.2014.01.055.
28. Bak LK, Walls AB, Schousboe A, Waagepetersen HS. Astrocytic glycogen metabolism in the healthy and diseased brain. *J Biol Chem*. 2018 May 11;293(19):7108-7116. doi: 10.1074/jbc.R117.803239.
29. Matsui T, Soya M, Soya H. Endurance and Brain Glycogen: A Clue Toward Understanding Central Fatigue. *Adv Neurobiol*. 2019;23:331-346. doi: 10.1007/978-3-030-27480-1_11.
30. Mathieu C, Li de la Sierra-Gallay I, Duval R, Xu X, Coccagn A, Léger T, Woffendin G, Camadro JM, Etchebest C, Haouz A, Dupret JM, Rodrigues-Lima F. Insights into Brain Glycogen Metabolism: THE STRUCTURE OF HUMAN BRAIN GLYCOGEN PHOSPHORYLASE. *J Biol Chem*. 2016 Aug 26;291(35):18072-83. doi: 10.1074/jbc.M116.738898.
31. Mathieu C, Dupret JM, Rodrigues Lima F. The structure of brain glycogen phosphorylase-from allosteric regulation mechanisms to clinical perspectives. *FEBS J*. 2017 Feb;284(4):546-554. doi: 10.1111/febs.13937.
32. Price NC, Stevens L. Βασικά στοιχεία ενζυμολογίας. 3η έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου;1999.

33. Kanungo S, Wells K, Tribett T, El-Gharbawy A. Glycogen metabolism and glycogen storage disorders. *Ann Transl Med.* 2018 Dec;6(24):474. doi: 10.21037/atm.2018.10.59.
34. Nitschke F, Ahonen SJ, Nitschke S, Mitra S, Minassian BA. Lafora disease - from pathogenesis to treatment strategies. *Nat Rev Neurol.* 2018 Oct;14(10):606-617. doi: 10.1038/s41582-018-0057-0.
35. Reicheitl S. *Affinity Chromatography Methods in Molecular Biology.* 2015, New York: Springer.
36. HealthCare G. *Affinity Chromatography - Principles and Methods.* 2007.