

**ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ
ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ
ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ**

Τριμελής επιτροπή:

- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Κομιώτης Δημήτριος**

Αναπληρωτής καθηγητής Οργανικής χημείας με έμφαση στη σύνθεση βιοδραστικών μορίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Κοντού Μαρία**

Επίκουρος Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1. Εισαγωγή.....	9
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	9
1.2 Τύποι σακχαρώδη διαβήτη.....	11
1.3 Φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης.....	15
1.3.1 Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη.....	16
1.3.2 Σύνοψη των πολλαπλών φυσιολογικών δράσεων της ινσουλίνης.....	19
1.4 Υπερινσουλινισμός και Υποϊνσουλινισμός.....	19
1.4.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ή ινσουλινοεξαρτώμενος.....	20
1.4.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2	21
2. Βασικές γνώσεις.....	23
2.1 Γλυκόζη.....	23
2.2 Γλυκογόνο.....	25
2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	27
2.2.2 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) και ο ρόλος της στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	28
2.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	31
2.3.1 Γενικά	31
2.3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	33
2.3.3 Κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	39
2.3.4 Ενζυμική αναστολή.....	44
3. Υλικά και μέθοδοι	48
3.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μύς κουνελιού.....	48
3.2 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	52
3.2.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας GPb.....	52
3.2.2 Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b	54
3.3 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m).....	55

3.4 Υπολογισμός αρχικών ταχυτήτων (v) και των τυπικών αποκλίσεων (σ_2).....	56
3.5 Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων V_{max} και K_m και των τυπικών αποκλίσεων (σ_2).....	57
3.6 Προσδιορισμός της K_i	59
3.7 Υπολογισμός της φαινόμενης K_m ($K_{m,app}$) και της K_i -μοντέλο συναγωνιστικής αναστολής.....	59
3.8 Παρασκευή τυφλών.....	66
3.9 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος-Παρασκευή διαλυμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις Glc-1-P.....	67
3.10 Προσδιορισμός φωσφόρου	70
3.11 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων-πρόγραμμα Grafit....	72
4. Αποτελέσματα	72
4.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου.....	72
4.2 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων.....	73
4.3 Κινητική μελέτη αναστολέων.....	76
5. Συμπεράσματα-συζήτηση.....	79
Βιβλιογραφία	80

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2011- Μάιος 2011, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Δημήτρη Λεωνίδα κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την υπομονή που έδειξε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Επίσης πολύτιμη ήταν η συμβολή του στην ορθή διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών, παρέχοντας μου τις πολύτιμες υποδείξεις του και την επιτυχημένη καθοδήγηση του με σκοπό την ολοκλήρωση του θέματος που μου ανέθεσε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Δημήτρη Κομιώτη, καθώς και στη κα. Μαρία Κοντού για τις πολύπλευρες πληροφορίες που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας και για την συνεργασία τους.

Θα ήταν παράλειψη αν δεν ανέφερα την κα Καντσάδη Αναστασία, υποψήφια διδάκτορα, διότι η συμβολή της ήταν καίρια καθώς ήμουν υπό τη συνεχή της παρατήρηση και η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πραγματικά ανεκτίμητη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής βιοχημείας, καθώς και όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας.

Μέρος της πτυχιακής εργασίας συμπεριλήφθηκε στη δημοσίευση:

The σ -Hole Phenomenon of Halogen Atoms Forms the Structural Basis of the Strong Inhibitory Potency of C5 Halogen Substituted Glucopyranosyl Nucleosides towards Glycogen Phosphorylase b.

Kantsadi AL, Hayes JM, Manta S, Skamnaki VT, Kiritsis C, Psarra AM, Koutsogiannis Z, Dimopoulou A, Theofanous S, Nikoleousakos N, Zoumpoulakis P, Kontou M, Papadopoulos G, Zographos SE, Komiotis D, Leonidas DD. **ChemMedChem.** 2012 Jan 20. doi: 10.1002/cmdc.201100533. [Epub ahead of print]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μεταβολική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Ο κύριος στόχος στη θεραπευτική αντιμετώπιση του διαβήτη είναι να διατηρούμε το σάκχαρο του αίματος όσον το δυνατόν πιο κοντά στα φυσιολογικά όρια. Αν αυτό επιτυγχάνεται αποφεύγεται ο κίνδυνος της εμφάνισης των χρόνιων επιπλοκών του διαβήτη. Με σκοπό τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για κάποιο κέντρο σύνδεσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Προς αυτήν την κατεύθυνση, το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκε το ένζυμο φωσφορυλάση β του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μυς κουνελιού και μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα της ένωσης GlcCF₃U. Οι κινητικές μελέτες έδειξαν πως η ένωση αυτή αποτελεί ισχυρό συναγωνιστικό αναστολέα του ενζύμου με σταθερά αναστολής K_i 17 μM. Τα

αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να βοηθήσουν σημαντικά στο σχεδιασμό νέων πιο ισχυρών ενώσεων.

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by concentration increasing of blood sugar (hyperglycemia) and glucose metabolism imbalance, either as a result of decreased insulin secretion or because of decrease in body cells sensitivity to insulin. The main goal in diabetes treating is to keep blood sugar as close as possible to normal limits. If this is achieved, the risk of developing chronic complications of diabetes is avoided. To treat this pathological condition, enzymes and receptors involved in the regulation of glucose limits are used as molecular targets for the directed structure design of compounds which exhibit high affinity for a center connection and can be used as potential hypoglycaemic drugs. To this end, the enzyme glycogen phosphorylase is one of the most important molecular targets for designing new hypoglycemic drugs.

In this report, we isolated the enzyme glycogen phosphorylase b (GPb) from rabbit skeletal muscles and studied by/with kinetic experiments, the effect of the compound GlcCF3U on enzymatic activity. The kinetic studies showed that this compound is a potent competitive inhibitor with inhibition constant K_i :17 PM. The results of this study can greatly help scientists design new, more potent compounds in the future.

2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

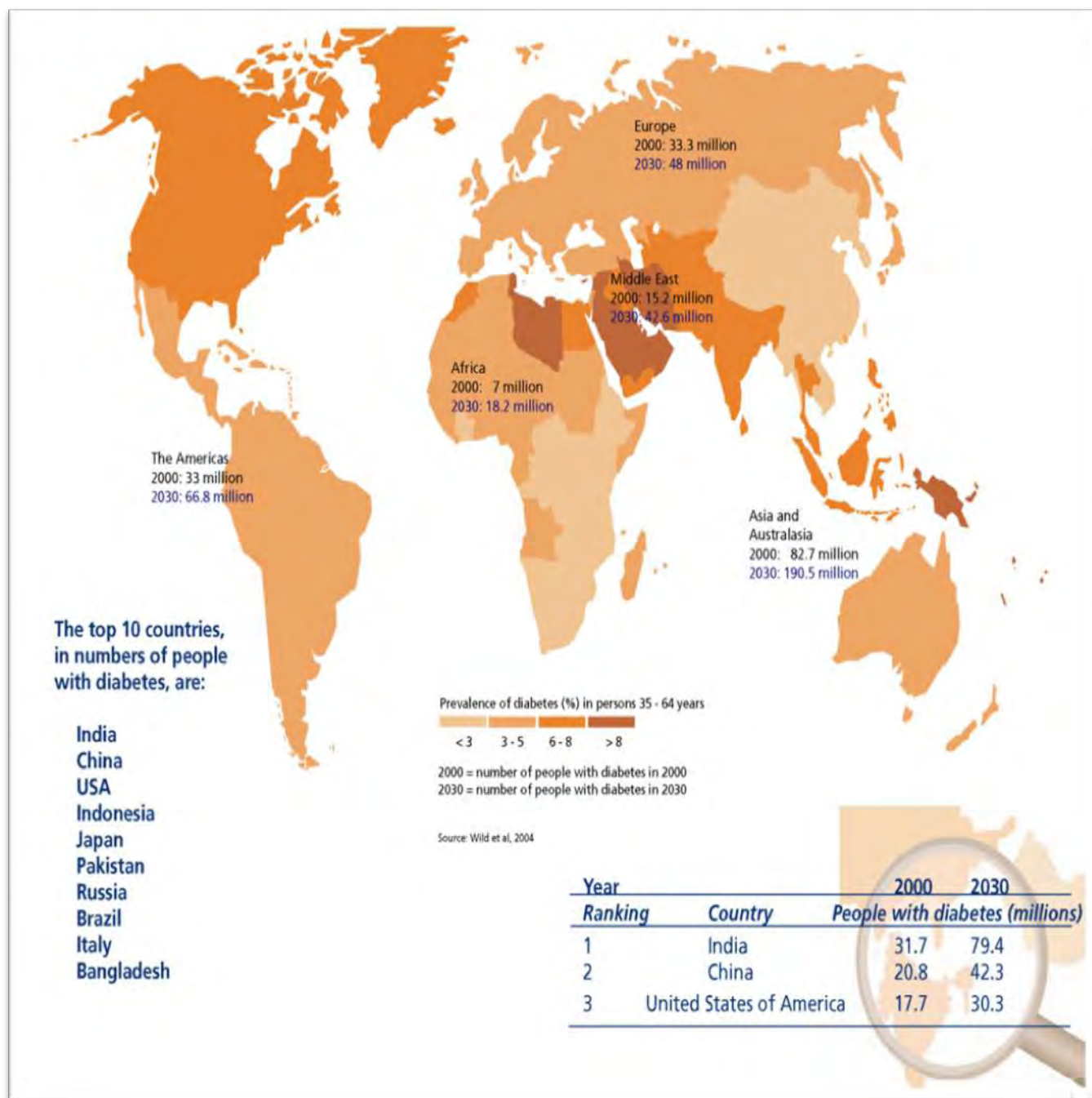
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί ιατρικό πρόβλημα εδώ και 3500 χρόνια. Είναι μία πάθηση κατά την οποία το σώμα δεν παράγει ή δεν χρησιμοποιεί σωστά την ινσουλίνη. Η ινσουλίνη είναι μία ορμόνη που απαιτείται για τον μετασχηματισμό της ζάχαρης, του αμύλου και άλλων τροφών σε ενέργεια, απαραίτητη για καθημερινές ανάγκες. Οι ακριβείς αιτίες που προκαλούν τον σακχαρώδη διαβήτη συνεχίζουν να παραμένουν ένα μυστήριο, αν και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο για τη δημιουργία του, τόσο η γενετική, όσο και περιβαλλοντικοί λόγοι, όπως η παχυσαρκία και η έλλειψη εξάσκησης.

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια πάθηση η οποία μπορεί να παραμένει «σιωπηλή» για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Χαρακτηρίζεται από την αύξηση του σακχάρου του αίματος, με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση διάφορων επιπλοκών που αφορούν την καρδιά, τα αγγεία, τα μάτια, τους νεφρούς και το νευρικό σύστημα. Τα υποκειμενικά ενοχλήματα των ασθενών, συχνά δε συνδέονται με τα ευρήματα του αντικειμενικού ελέγχου και η εξέλιξη της νόσου είναι απρόβλεπτη. Ο διαβήτης δεν μπορεί να ιαθεί οριστικά, μπορεί όμως να ελεγχθεί με τη βοήθεια της φαρμακευτικής θεραπείας αλλά και της πειθαρχίας από πλευράς του ασθενούς όσον αφορά τον τρόπο ζωής του. Η τέλεια ρύθμιση των επιπέδων σακχάρου στόχο έχει την πρόληψη τόσο των οξέων αλλά και των χρόνιων επιπλοκών της νόσου.

Υπολογίζεται, ότι σήμερα το 6,3% του πληθυσμού της γης πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη. Σε περίπου 13 εκατομμύρια άτομα

από αυτούς ο σακχαρώδης διαβήτης έχει διαγνωστεί, ενώ περίπου 5,2 εκατομμύρια άτομα (δηλαδή το 1/3 από το τελικό ποσοστό) δε γνωρίζουν ότι έχουν την πάθηση. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το διαβήτη (IDF) 194 εκ. άνθρωποι υποφέρουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως και αυτός ο αριθμός προβλέπεται να αυξηθεί σε 333 εκ. το 2025, κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού, και τις αλλαγές στον τρόπο ζωής. Στην Ευρώπη σύμφωνα με τα στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, το 2000 υπήρχαν 33.3 εκ άτομα με διαβήτη ενώ προβλέπεται ότι το 2030 ο αριθμός αυτός θα φτάσει τα 48 εκ. Στην Ελλάδα το ποσοστό του πληθυσμού που πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη είναι περίπου 10%. Το 80% των ασθενών με διαβήτη τύπου 2 είναι παχύσαρκοι και σύμφωνα με την επιδημιολογική μελέτη της Ελληνικής Εταιρίας Παχυσαρκίας, το 41% των ανδρών και το 30% των γυναικών είναι υπέρβαροι γεγονός που κατατάσσει τη χώρα μας στις πρώτες θέσεις στην ΕΕ κατανάλωσης φαρμάκων έναντι του σακχαρώδη διαβήτη. [Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας]. Οι πρώτες δέκα χώρες σε αριθμό ασθενών με διαβήτη είναι οι εξής: Ινδία, Κίνα, ΗΠΑ, Ινδονησία, Ιαπωνία, Πακιστάν, Ρωσία, Βραζιλία, Ιταλία και Μπαγκλαντές. Στις χώρες αυτές ένας στους τέσσερις θανάτους σε άτομα ηλικίας 35 με 64 χρόνων, οφείλεται στο σακχαρώδη διαβήτη (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Η επιδημία του διαβήτη παγκοσμίως

1.2 Τύποι σακχαρώδη διαβήτη

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι σακχαρώδη διαβήτη:

- Ο νεανικός διαβήτης τύπου 1. Οι ασθενείς αυτοί αναπτύσσουν συνήθως διαβήτη σε νεαρή ηλικία, χωρίς αυτό να είναι απαραίτητο.

Έχουν απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης και η επιβίωση των ατόμων αυτών εξαρτάται από την εξωγενή χορήγησή της.

- Ο διαβήτης τύπου 2. Οι ασθενείς αυτοί είναι συνήθως μέσης ηλικίας ή ηλικιωμένοι και συχνά παχύσαρκοι. Εμφανίζουν διαταραχή τόσο στην έκκριση, όσο και στη δράση της ινσουλίνης, σε αναλογία που ποικίλλει από άτομο σε άτομο (εικόνα 2).

	Τύπου 1	Τύπου 2
Ηλικία εμφάνισης	Κυρίως < 40 ετών (αιχμή = 12ο έτος)	Κυρίως > 40 ετών (αιχμή = 60ό-70ό έτος)
Βάρος	Λειπόσωμα άτομα. Κατά κανόνα αναφέρεται απώλεια βάρους κατά την αρχική εμφάνιση.	Κατά κανόνα υπέρβαρα ή παχύσαρκα άτομα
Ανάγκη για χορήγηση ινσουλίνης	Η ινσουλίνη είναι απαραίτητη για την επιβίωση.	Η ινσουλίνη δεν είναι απαραίτητη για την επιβίωση.
Ικανότητα έκκρισης ινσουλίνης	Απουσία	Επαρκής

Εικόνα 2: Χαρακτηριστικά στοιχεία των 2 τύπων σακχαρώδη διαβήτη

Συμβαίνει συχνά να υπάρχουν άνθρωποι που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη και να μην το γνωρίζουν, γιατί τα συμπτώματά τους φαίνονται ασήμαντα. Πρόσφατες έρευνες έχουν αποδείξει ότι η

πρόωρη διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη από τα συμπτώματά του, μπορεί να μειώσει τις πιθανότητες εμφάνισης των επιπλοκών του.

Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 1 συνήθως εμφανίζονται απότομα και εξελίσσονται γρήγορα. Στο διαβήτη τύπου 2 τα συμπτώματα εμφανίζονται, συνήθως, σταδιακά και είναι βαθμιαία. Συχνά τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 2 λείπουν τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής.

Μερικά από τα συμπτώματα του σακχαρώδη διαβήτη είναι τα εξής:

- Συχνή ούρηση
- Υπερβολική δίψα
- Υπερβολική πείνα
- Ασυνήθιστη απώλεια βάρους
- Αυξημένη κόπωση
- Κνησμός
- Θαμπή όραση

Σε αντίθεση με άλλες παθήσεις ο σακχαρώδης διαβήτης δεν φαίνεται να είναι αυστηρά κληρονομικός. Βέβαια, υπάρχουν άνθρωποι, οι οποίοι λόγω κληρονομικότητας έχουν περισσότερες πιθανότητες να τον αποκτήσουν από ότι κάποιοι άλλοι.

Ο Διαβήτης Τύπου 1 και ο Διαβήτης Τύπου 2 έχουν διαφορετικές αιτίες. Υπάρχουν όμως δύο παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο και στις δύο περιπτώσεις. Ο πρώτος είναι η κληρονομική προδιάθεση στην πάθηση και ο δεύτερος οι περιβαλλοντικές συνθήκες που μπορεί να ωθήσουν προς εκείνη την κατεύθυνση.

Τα γονίδια από μόνα τους πάντως δεν προκαλούν σακχαρώδη

διαβήτη. Μία απόδειξη αυτού είναι η περίπτωση των διδύμων. Οι δίδυμοι έχουν ίδια γονίδια. Όμως στις περιπτώσεις που ένας από τους διδύμους έχει Διαβήτη Τύπου 1, ο άλλος τον παρουσιάζει μόνο κατά το 50%, δηλαδή τις μισές φορές. Στις περιπτώσεις που ένας από τους διδύμους έχει Διαβήτη Τύπου 2, ο άλλος τον παρουσιάζει τις 3 από τις 4 φορές.

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων κάποιος αποκτά Διαβήτη Τύπου 1, όταν υπάρχει προδιάθεση και από τους δύο γονείς του. Η προδιάθεση αυτή κατά πάσα πιθανότητα βασίζεται σε παράγοντες που αφορούν τους λευκούς, γιατί οι λευκοί παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά Διαβήτη Τύπου 1.

Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, έρευνες έχουν δείξει ότι έχουν να κάνουν κυρίως με το κρύο νερό. Ο Διαβήτης Τύπου 1 εμφανίζεται συχνότερα το χειμώνα από το καλοκαίρι και σε περιοχές με ψυχρά κλίματα από θερμά. Επίσης συγκεκριμένο ρόλο φαίνεται να έχουν οι ιοί. Ίσως ένας ιός που δεν έχει και πολύ σοβαρά συμπτώματα να επηρεάζει τον ανθρώπινο οργανισμό με τέτοιο τρόπο, ώστε να ενισχύει τον Διαβήτη Τύπου 1. Επίσης σημαντική είναι και η διατροφή κατά τη βρεφική ηλικία. Έχει διαπιστωθεί ότι οι άνθρωποι που τρέφονταν δια θηλασμού περισσότερο χρονικό διάστημα, έχουν μικρότερες πιθανότητες να εμφανίσουν Διαβήτη Τύπου 1.

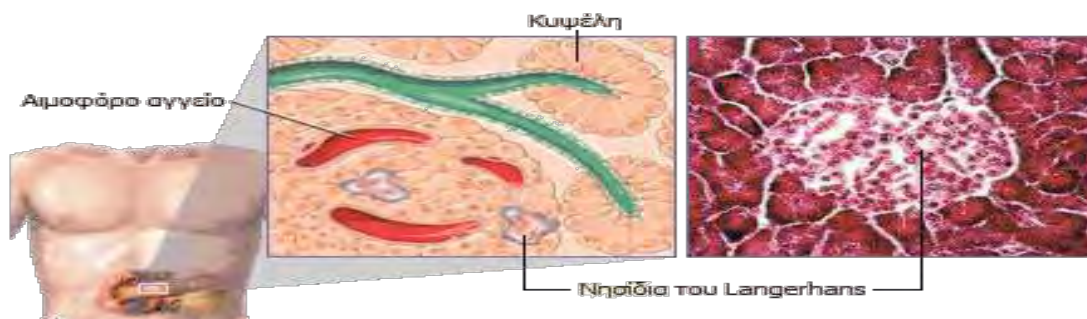
Τέλος, έχει διαπιστωθεί από πειράματα, ότι οι άνθρωποι που είχαν χαμηλά ποσοστά αντισωμάτων στον οργανισμό τους στο παρελθόν, έχουν τώρα μεγαλύτερες πιθανότητες να εμφανίσουν Διαβήτη Τύπου 1.

Ο Διαβήτης Τύπου 2 έχει ισχυρότερη γενετική βάση από τον Διαβήτη Τύπου 1, παρόλα αυτά κι αυτός εξαρτάται πολύ από τις

περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο δυτικός τρόπος ζωής, που ακολουθείται από κακή διατροφή κι ελάχιστη άσκηση, είναι αρκετά επιρρεπής προς τον Διαβήτη Τύπου 2. Αντίθετα οι άνθρωποι των χωρών εκείνων που δεν έχουν ακολουθήσει τον δυτικό τρόπο ζωής, δεν εμφανίζουν συχνά τον Διαβήτη Τύπου 2, ανεξάρτητα από την γενετική τους προδιάθεση. Η παχυσαρκία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες για την εμφάνιση του Διαβήτη Τύπου 2.

1.3 Φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι ορμόνη που παράγεται σε ειδική μοίρα του παγκρέατος (και συγκεκριμένα από ομάδες κυττάρων που ονομάζονται «νησίδια του Langerhans»)(εικόνα 3) και παίζει πρωτεύοντα ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων (σακχάρων) του οργανισμού.

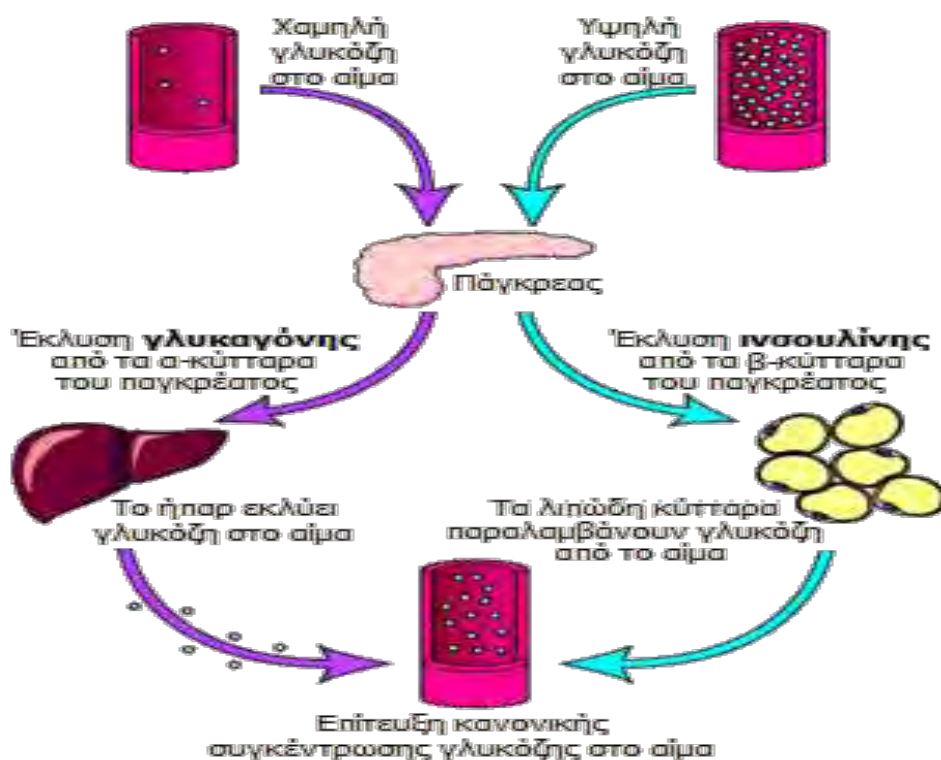


Εικόνα 3: Νησίδια του Langerhans

Η ινσουλίνη δρα σε όλους τους ιστούς του σώματος (ιδιαίτερα όμως στο ήπαρ, στους μύες και στο λιπώδη ιστό), βοηθώντας στην πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα γίνεται με την δράση της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος.

1.3.1 Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη

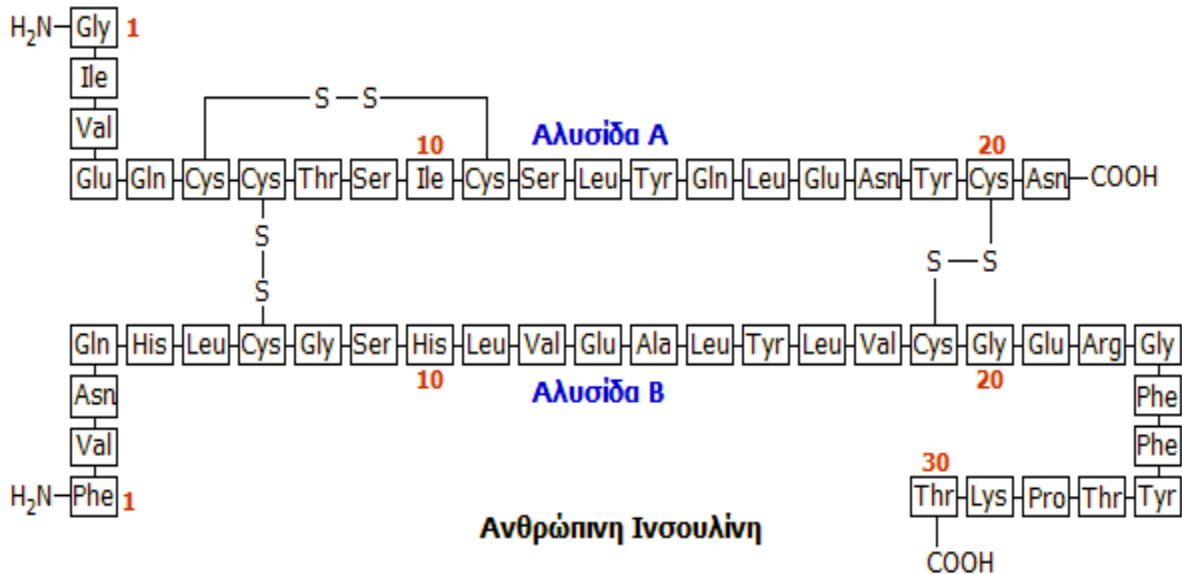
Αποτελούν πολυπεπτιδικές ορμόνες οι οποίες εκκρίνονται απ' ευθείας στην κυκλοφορία του αίματος από το πάγκρεας (ενδοκρινείς ορμόνες). Με τις δύο αυτές ορμόνες ρυθμίζεται η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, που κατά μέσον όρο πρέπει να παραμένει σε μια στενή περιοχή (70 mg/dL έως 110 mg/dL). Και οι δύο ορμόνες παράγονται στα νησίδια Langerhans του παγκρέατος και έχουν ακριβώς αντίθετη δράση, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ρυθμιστική τους ικανότητα (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Η αντίθετη δράση ινσουλίνης- γλυκαγόνης

Η ινσουλίνη(εικόνα 5) εκκρίνεται από τα β-κύτταρα που αποτελούν το 60-85% των κυττάρων των νησιδίων Langerhans. Τα

β-κύτταρα "διεγείρονται" από τα μόρια γλυκόζης και η δράση της είναι ξεκάθαρα αναβολική. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, τόσο αυξάνει ο ρυθμός έκκρισης ινσουλίνης.



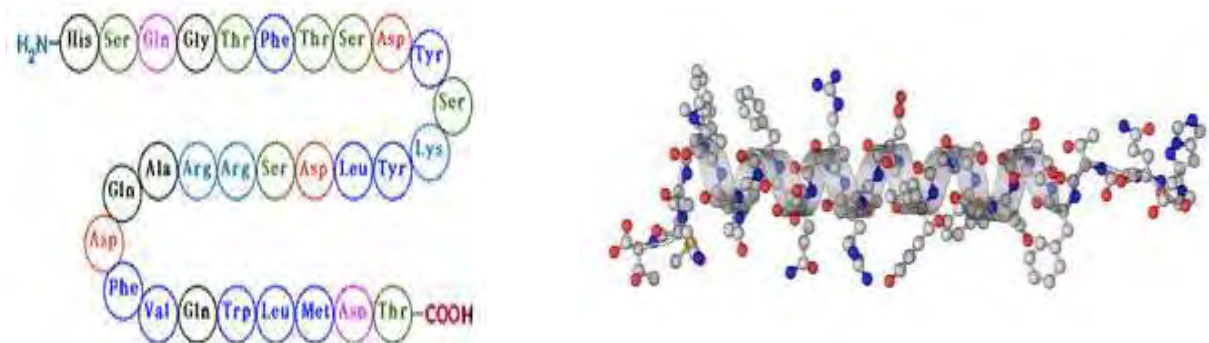
Εικόνα 5: Η ανθρώπινη ινσουλίνη

Με τη σειρά της η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα είδη κυττάρων του οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα (adipocytes). Χωρίς την ινσουλίνη τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη που αποτελεί την κύρια πηγή χημικής ενέργειας. Επιπλέον, η ινσουλίνη προκαλεί την "αποταμίευση" γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ υπό τη μορφή γλυκογόνου (glycogen).

Εάν το ήπαρ "κορεσθεί" σε γλυκογόνο, η γλυκόζη αρχίζει να κατευθύνεται στα λιπώδη κύτταρα όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και γλυκερόλης και τελικά τριγλυκεριδίων. Η ινσουλίνη "καθοδηγεί" τα κύτταρα, όταν αυτά αναζητούν ενέργεια, να καταναλώσουν γλυκόζη αντί λιπαρών οξέων και επομένως

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

Η γλυκαγόνη (εικόνα 6) εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων και η δράση της είναι ξεκάθαρα καταβολική. Αντίθετα με την ινσουλίνη, η έκκρισή της διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης γλυκόζης του αίματος. Η έκκρισή της ενισχύεται από ορισμένα αμινοξέα και από τη μυϊκή δραστηριότητα. Η γλυκαγόνη αυξάνει τη στάθμη της γλυκόζης στο αίμα επειδή διασπά το αποταμιευμένο γλυκογόνο στο ήπαρ (κυρίως) και στους μύες προς γλυκόζη. Επιπλέον, ενεργοποιεί τη λιπόλυση στους λιπώδεις ιστούς.



Εικόνα 6: Η γλυκαγόνη

1.3.2 Σύνοψη των πολλαπλών φυσιολογικών δράσεων της ινσουλίνης:

Στον μεταβολισμό: (1) Έλεγχος της πρόσληψης ορισμένων ουσιών και κυρίως της γλυκόζης από τους μυϊκούς και τους λιπώδεις ιστούς. (2) Ενίσχυση των μηχανισμών αντιγραφής του DNA και της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω ελέγχου της πρόσληψης αμινοξέων. (3) Τροποποίηση της δραστηριότητας πολλών ενζύμων.

Η δράση της στα κύτταρα περιλαμβάνει: (1) Ενίσχυση του μηχανισμού σύνθεσης γλυκογόνου και αποθήκευσής του. (2) Ενίσχυση των μηχανισμών σύνθεσης λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων στα λιπαρά κύτταρα. (3) Περιορίζει τη διάσπαση των πρωτεϊνών. (4) Περιορίζει τον σχηματισμό γλυκόζης από μη υδατανθρακικά μόρια. (5) Περιορίζει τις βλάβες που υφίστανται οργανίδια των κυττάρων. (6) Βελτιώνει την πρόσληψη αμινοξέων. (7) Βοηθά στην πρόσληψη καλίου από τα κύτταρα και έτσι μειώνει τη συγκέντρωσή του στο αίμα. (8) Χαλαρώνει το μυϊκό τόνο, αυξάνει τη ροή αίματος ιδιαίτερα μέσω των μικροαρτηριών. (9) Βοηθά στην έκκριση υδροχλωρικού οξέος από τα επιθηλιακά καλυπτήρια κύτταρα του στομάχου.

1.4 Υπερινσουλινισμός και Υποϊνσουλινισμός

Υπερέκκριση ινσουλίνης προκαλεί υπογλυκαιμία. Από την κατάσταση αυτή θίγεται ιδιαίτερα το νευρικό σύστημα, που εξαρτά τις ενεργειακές του ανάγκες κυρίως από τη γλυκόζη. Αυξημένη συγκέντρωση ινσουλίνης στο αίμα (από υπερέκκριση ή χορήγηση) μπορεί να προκαλέσει και κωματώδη κατάσταση.

Η μείωση της διαθέσιμης ινσουλίνης στον οργανισμό μπορεί να οφείλεται σε καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, σε μειωμένη ανταπόκριση των β-κυττάρων, σε αντισώματα κατά της ινσουλίνης, σε αυξημένη αποδόμηση της στο ήπαρ αλλά και σε δομικές ανωμαλίες στο μόριο της ινσουλίνης.

Επίσης μπορεί να είναι μειωμένη η ανταπόκριση στην ινσουλίνη των κυττάρων «στόχου», που μπορεί να οφείλεται σε μείωση του διαθέσιμου αριθμού υποδοχέων ινσουλίνης, σε μειωμένη χημική συγγένεια μεταξύ ινσουλίνης και υποδοχέων ή σε κάποια ενδοκυτταρική ανωμαλία.

Η κλινική εικόνα από την ανεπάρκεια ινσουλίνης είναι γνωστή ως σακχαρώδης διαβήτης.

1.4.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ή ινσουλινοεξαρτώμενος

Προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη και συνήθως εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 20 ετών γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ως «νεανικός διαβήτης». Ο όρος ινσουλινοεξαρτώμενος σημαίνει ότι το πάσχον άτομο χρειάζεται ινσουλίνη για να ζήσει.

Στον διαβήτη τύπου 1 απουσιάζει η ινσουλίνη με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της γλυκαγόνης να βρίσκεται σε υψηλότερο επίπεδο από το φυσιολογικό. Επειδή υπάρχει ανεπάρκεια ινσουλίνης, παρεμποδίζεται η είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα. Το ήπαρ παραμένει σε κατάσταση γλυκονεογένεσης και κετογένεσης ενώ αναστέλλεται η γλυκόλυση.

Ο υψηλός λόγος γλυκαγόνης/ινσουλίνης στο διαβήτη προάγει επίσης τη διάσπαση του γλυκογόνου. Έτσι παράγεται περίσσεια γλυκόζης από το ήπαρ η οποία απελευθερώνεται στο αίμα. Η γλυκόζη απεκκρίνεται με τα ούρα (γλυκοζουρία) όταν η συγκέντρωση της είναι μεγαλύτερη από εκείνη που μπορεί να επαναρροφηθεί από τα νεφρικά σωληνάκια. Η απεκκρινόμενη γλυκόζη συνοδεύεται από νερό, οπότε ο διαβητικός που δεν λαμβάνει κάποια αγωγή πεινά και διψά (πολυφαγία, πολυδιψία).

1.4.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, γνωστότερος και ως «γεροντικός διαβήτης», πλήττει κυρίως ενήλικες. Είναι ο πιο κοινός τύπος διαβήτη αντιστοιχώντας σε περισσότερο από το 90% των πασχόντων. Ο χαρακτηρισμός του ως διαβήτης των ενηλίκων, οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια εμφανίζεται έξαρση της πάθησης σε άτομα νεαρής ηλικίας. Λαμβάνοντας υπόψη τον ρυθμό με τον οποίο αυξάνονται οι περιπτώσεις εμφάνισης της συγκεκριμένης μεταβολικής διαταραχής υπολογίζεται ότι σε μερικές δεκαετίες, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, θα είναι ένα από τα συνηθέστερα και μεγαλύτερα προβλήματα της παγκόσμιας υγείας.

Ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί σε άτομα με γενετική προδιάθεση ωστόσο δεν θεωρείται ούτε κληρονομικός, ούτε μεταδοτικός. Η παχυσαρκία αποτελεί σαφή παράγοντα

προδιάθεσης, αφού σε ποσοστό 80% περίπου, τα άτομα με διαβήτη τύπου II είναι παχύσαρκα.

Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου 1, στον οποίο η ινσουλίνη απουσιάζει παντελώς, ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινσουλίνης. Σε αυτή τη μορφή διαβήτη έχουν παρατηρηθεί ακόμα και υψηλά επίπεδα ινσουλίνης. Στο διαβήτη τύπου 2, η ινσουλίνη η οποία παράγεται από το πάγκρεας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται το σάκχαρο σαν κύρια πηγή ενέργειας. Συνεπώς, η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται –σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου 1 - από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου II ονομάζεται και "μη ινσουλινοεξαρτώμενος" (NIDDM: Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα των ιστών να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη και τα επαγόμενα αποτελέσματα της δράσης της. Σε μερικούς ασθενείς παρουσιάζεται μειωμένος αριθμός ή συγγένεια των υποδοχέων ινσουλίνης (υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης), ενώ σε άλλους, παρόλο που η σύνδεση της ινσουλίνης είναι κανονική, παρατηρείται ανώμαλη μεταγωγή σήματος εντός του κυττάρου.

Ο Διαβήτης Τύπου 2 συνήθως εξελίσσεται αργά, με τα συμπτώματα και τις επιπλοκές να αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου. Συχνά δεν υπάρχουν συμπτώματα όταν γίνεται η διάγνωση του Διαβήτη Τύπου 2. Η δυσκολία πρόγνωσης της ασθένειας σε συνδυασμό με την απουσία θεραπείας έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων θεραπευτικών αγωγών για τον έλεγχο και τη σταθεροποίηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Η αγωγή για τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2

περιλαμβάνει κυρίως κατάλληλη διατροφή, άσκηση και χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 περιλαμβάνουν ινσουλίνη, σουλφονουλουρίες, διγουανιδίνες (μετμορφίνη), αναστολείς της α-γλυκοζιτάσης, θειαζολιδινεδιόνες, τα οποία έχουν διαφορετικό τρόπο και στόχο δράσης.

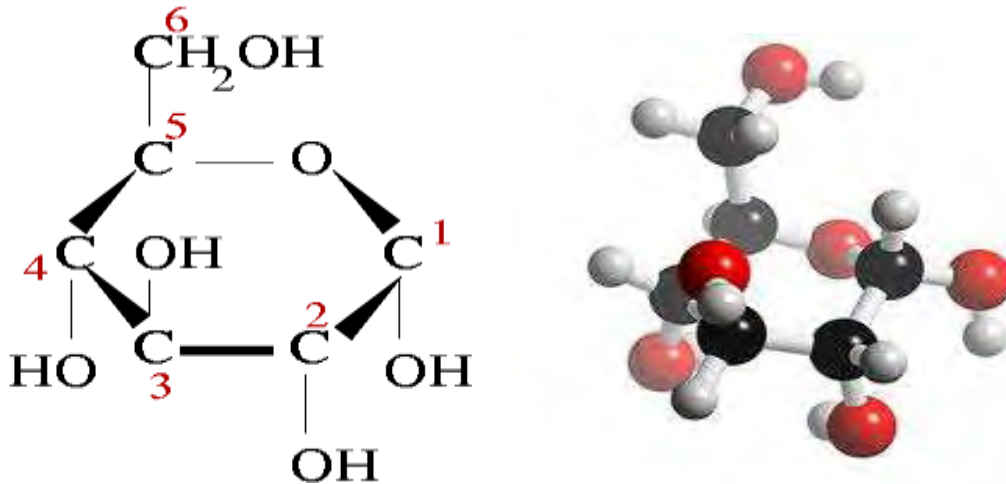
Ωστόσο οι θεραπείες αυτές έχουν αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών αποδεικνύονται και ανεπαρκείς. Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην διερεύνηση άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως για παράδειγμα ανταγωνιστές των υποδοχέων γλυκογόνου, αναστολείς της ηπατικής παραγωγής ινσουλίνης καθώς και συνδυαστικές θεραπείες. Υπάρχει λοιπόν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών μέσων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου.

2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

2.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο

(Εικόνα 7). Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη.



Εικόνα 7: Δομή γλυκόζης (συντακτική και τρισδιάστατη δομή)

Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι, το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Έτσι ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό, ενώ τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν ως καύσιμο μόνο τη γλυκόζη. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης. Η συγκέντρωση της στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml

(4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη .

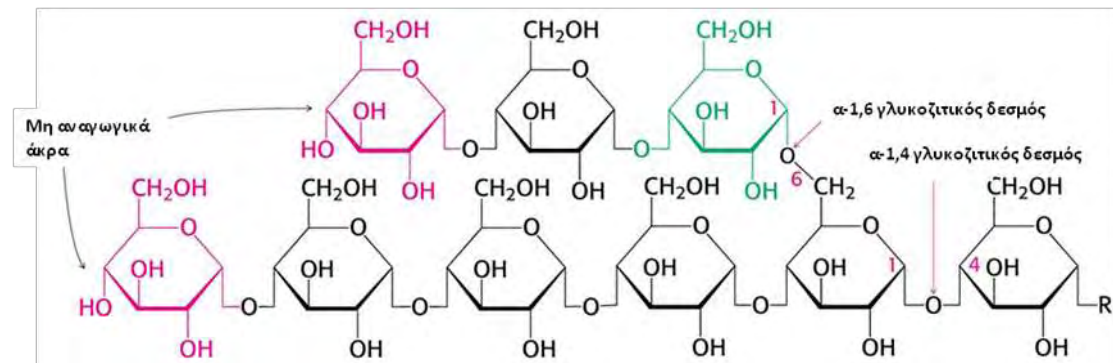
Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη. Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και τη διαιτητική κατάσταση του οργανισμού.

2.2 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι το ανάλογο του αμύλου, ένα πολυμερές της γλυκόζης στα φυτά, και μερικές φορές αναφέρεται ως και *το άμυλο των ζώων*. Το γλυκογόνο έχει παρόμοια δομή με την αμυλοπηκτίνη, αλλά είναι σε μεγαλύτερο βαθμό διακλαδισμένο και πιο συμπαγές από το άμυλο.

Το γλυκογόνο αποτελείται από μόρια α -D-γλυκόζης και είναι η κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Η δομή του γλυκογόνου

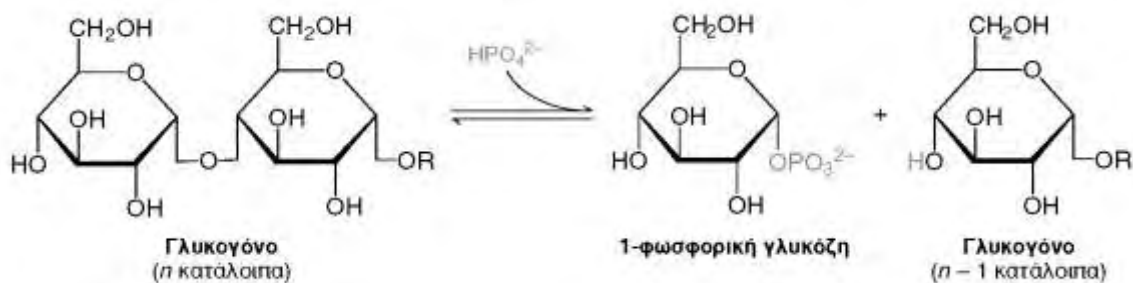
Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό,τι στους μύς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο.

2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η αποδοτική αποικοδόμηση του γλυκογόνου για να προμηθεύσει 6-φωσφορική γλυκόζη χρειάζεται τέσσερις ενζυμικές δραστηριότητες:

- μια να αποικοδομεί το γλυκογόνο
- δύο να ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο ώστε να παραμένει ένα υπόστρωμα για αποικοδόμηση
- μία να μετατρέπει το προϊόν καταβολισμού του γλυκογόνου σε μια μορφή κατάλληλη για περαιτέρω μεταβολισμό.

Καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου αποτελεί η φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού ιόντος αναφέρεται ως φωσφορόλυση. (Εικόνα 9)



Εικόνα 9: Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση.

Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται.

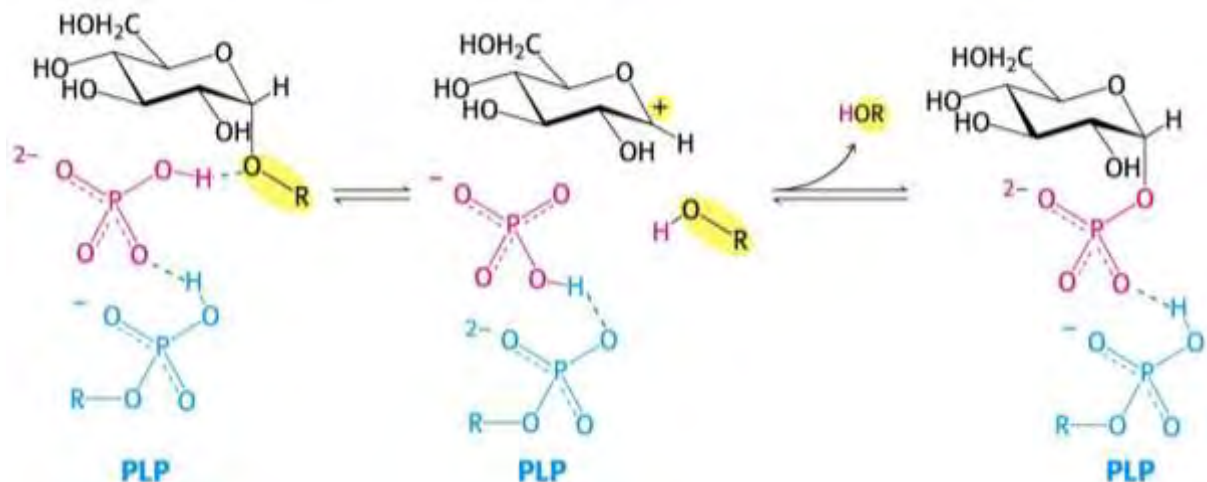
Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6.

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη.

2.2.2 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) και ο ρόλος της στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση αντιμετωπίζει μια ιδιαίτερη πρόκληση: να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο.

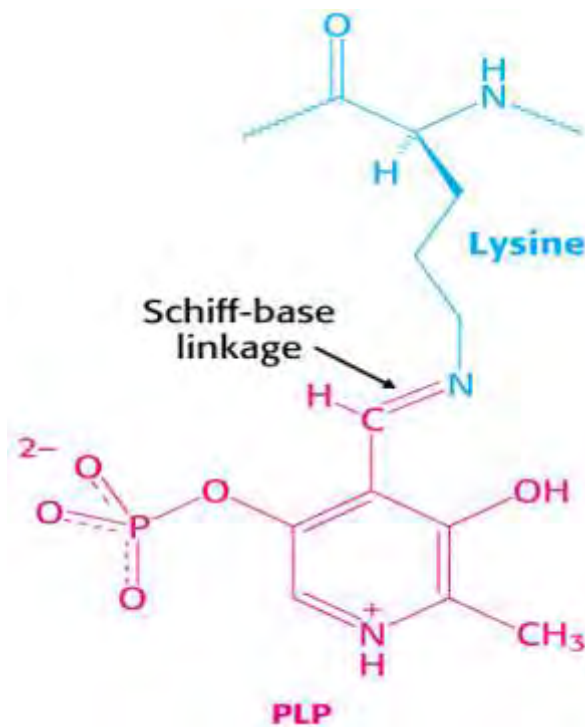
Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β , δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η ένδειξη PLP αφορά τη φωσφορική πυριδοξάλη συνδεδεμένη με μία βάση του Schiff στην ϵ -NH₂ της λυσίνης 680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α -D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο.

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του

ενζύμου (Εικόνα 11). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης.



Εικόνα 11: Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης

2.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

2.3.1 Γενικά

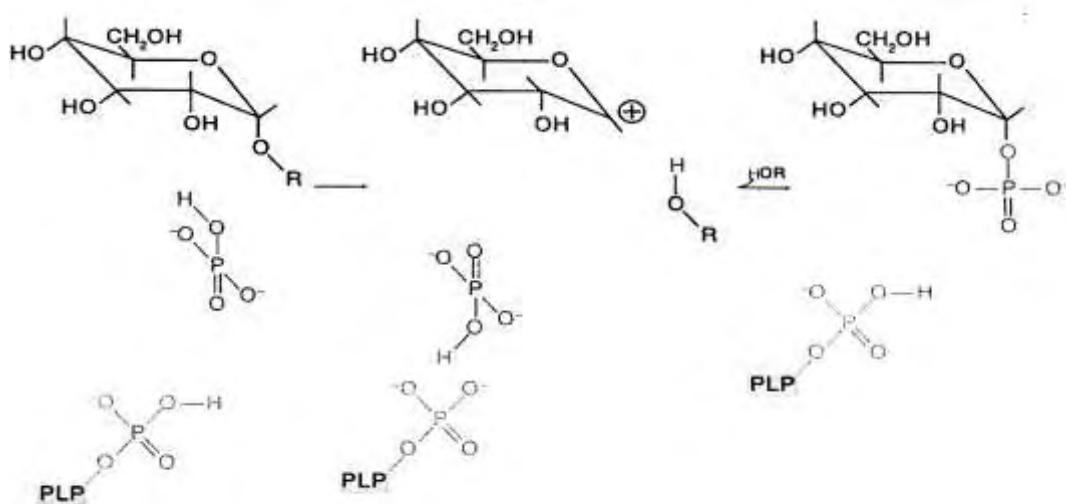
Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης.

Δομικά η GP είναι μια ομοδιμερή πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ότι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B₆. Με βάση διάφορα πειράματα που έγιναν στο παρελθόν αποδείχτηκε το γεγονός ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστικότητα του ενζύμου. Η κάθε

υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μία κοιλότητα που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινο-τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H₂O. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε-αμινομάδα της λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση.



Εικόνα 12: Προτεινόμενος μηχανισμός φωσφορυλίωσης του γλυκογόνου από την GP. Η ένδειξη PLP αφορά τη φωσφορική πυριδοξάλη συνδεδεμένη με μία βάση του Schiff στην ϵ -NH₂ της λυσίνης 680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α -D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο.

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση ρυθμίζοντας φυσιολογικά τη δραστηριότητά της GP. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G,(PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP).

2.3.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

Ο συντονισμός των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες γίνεται με την βοήθεια ρυθμιστικών ενζύμων, η λειτουργική δομή των οποίων τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την καταλυτική τους δράση ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Ως αλλοστερικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τουλάχιστον δυο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο ευθύνεται για την βιολογική δράση της πρωτεΐνης, συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ στο αλλοστερικό

συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση ένας άλλος μεταβολίτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αλλοστερικός τροποποιητής προκαλεί μια διακριτή, αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται αλλοστερική μετάπτωση. Αυτή τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή.

Γενικά, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από τη συγκεκριμένη δομή του ίδιου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωσή του που επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή.

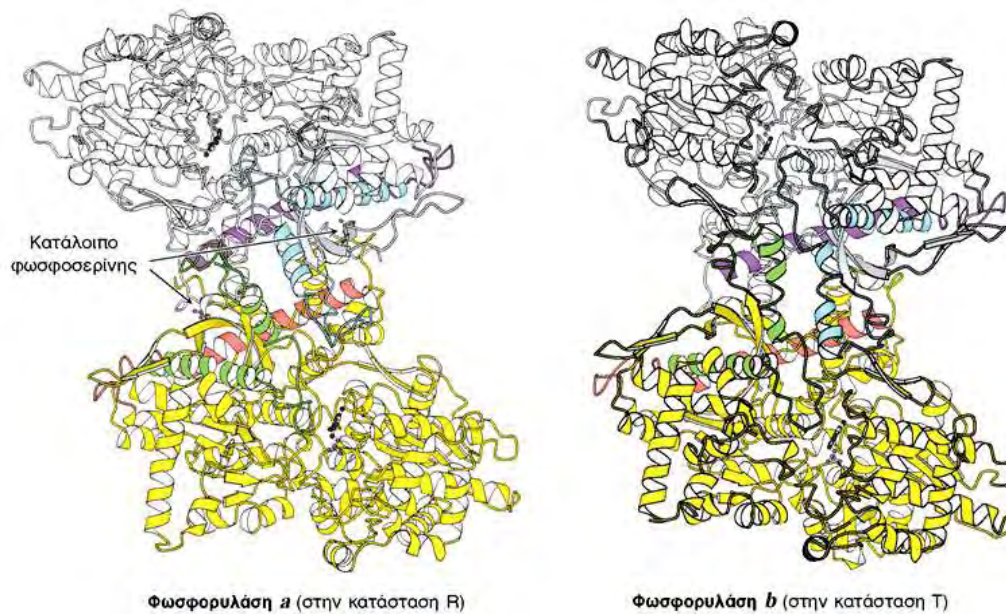
Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται σε ομοτροπικές, μεταξύ ταυτόσημων ενώσεων και ετεροτροπικές, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Δηλαδή, το μόριο να έχει έναν τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δυο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την T μορφή και τη R μορφή, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά L. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από τη μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγενειά τους με συγκεκριμένους υποκαταστάτες μεταβάλλεται. Η σύνδεση του υποστρώματος σε οποιοδήποτε μονομερές δεν επηρεάζει κατά κανένα τρόπο την σύνδεσή του στα υπόλοιπα μονομερή (δηλαδή οι

μικροσκοπικές σταθερές διάστασης στα σύμπλοκα μεταξύ μονομερών T ή R διαμόρφωσης και υποστρώματος είναι αντίστοιχα ίδιες.

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα. Συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η αύξηση ή αντίστοιχα η μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, σε περισσότερο ή λιγότερο σιγμοειδή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται ανάλογα με το αν η αλλοστερική μετάπτωση προκαλείται από αναστολέα ή ενεργοποιητή του ενζύμου. Σημειώνεται ότι η σιγμοειδής συμπεριφορά αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλοστερικών πρωτεϊνών.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T (Εικόνα 13). Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση a) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α -έλικες, οι οποίες μετακινούν

μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη.



Εικόνα 13: Οι δομές της φωσφορυλάσης *a* και *b*. Η φωσφορυλάση *a* είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή R διαμόρφωση. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρυθμισμό φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν είναι φωσφορυλιωμένη και απαντάται κυρίως στην T διαμόρφωση.

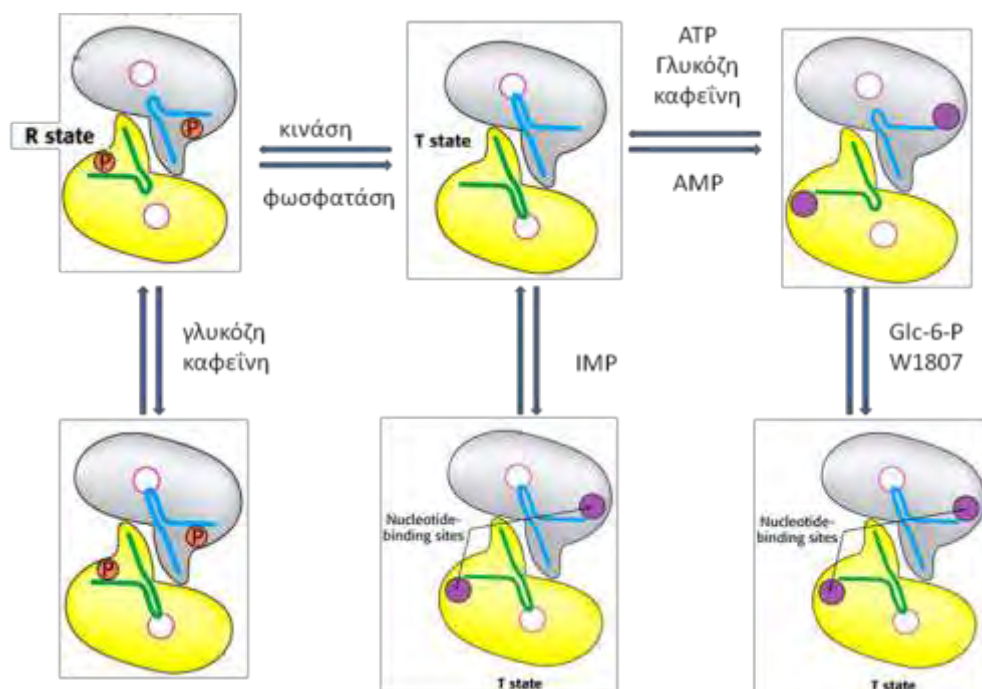
Η μυϊκή φωσφορυλάση *b* είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης *b* στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης *b* από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Κάτω από

φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα η φωσφορυλάση a είναι είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μυς εξασφαλίζει την παραμονή της 6- φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια.

Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο. Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την T διαμόρφωση. Τέλος στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την T κατάσταση, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την R κατάσταση και το ATP που απλά ανταγωνίζεται το AMP .

Η ανενεργός μορφή της φωσφορυλάσης b μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν in

in vitro να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} . Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P. (Εικόνα 14).



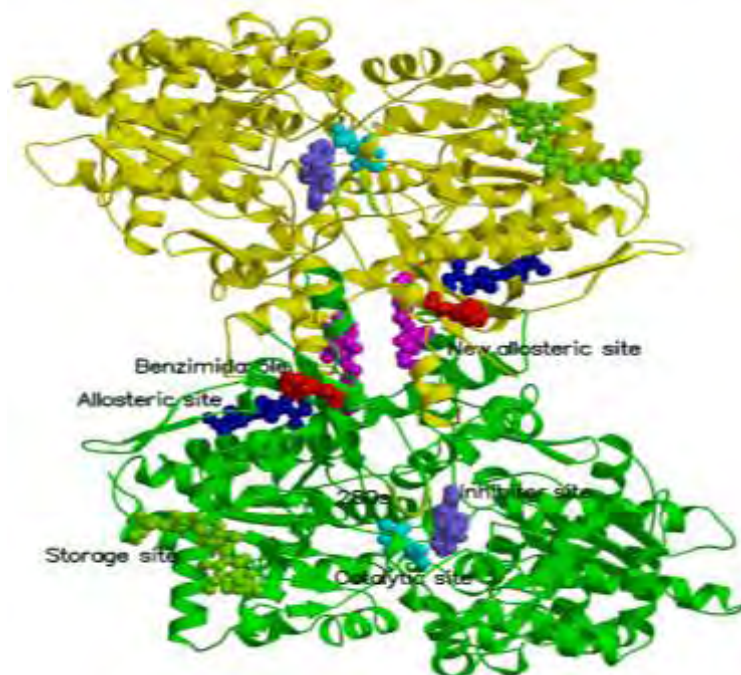
Εικόνα 14: Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοίωση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α, αλλά όχι η β παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την κατάσταση R

στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο.

2.3.3 Κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου μπορεί να χωριστεί σε δυο αυτοτελείς περιοχές, την 1 και την 2. Η περιοχή 1, που ονομάζεται και ρυθμιστική, αποτελείται από τα αμινοξέα 10-484. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο φωσφορύλιωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα καθώς και ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή 2, που ονομάζεται και καταλυτική, αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων.



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση της δομής του διμερούς μορίου της GPb. Το διμερές μόριο της GPb όπως φαίνεται κατά μήκος του μοριακού άξονα συμμετρίας δεύτερης τάξης στο οποίο υποδεικνύονται τα κέντρα σύνδεσης των διάφορων τροποποιητών: με μωβ το κέντρο αναστολής (φλαβοπιριδόλη), με κυανό το καταλυτικό κέντρο (GlucNaC), με μπλε το αλλοστερικό κέντρο (Acurea), με πράσινο το αποθηκευτικό κέντρο (κυκλοδεξτρίνη), και με ροζ το νέο αλλοστερικό κέντρο (CP320626).

- **Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14**

Η φωσφορυλίωση της σερίνης 14 είναι υπεύθυνη για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή a στη μορφή b. Το κέντρο φωσφορυλίωσης βρίσκεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η φωσφορυλίωση της Ser 14, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο του ενζύμου. Στην GPb, αυτά τα αμινοξέα είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στη GPa έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των 2 υπομονάδων.

- **Το αλλοστερικό κέντρο**

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å περίπου από την Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις 2 διαμορφώσεις, T και R, της GPa και της GPb. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από 3 υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

1. Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
2. Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων ριβόζης

3. Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων πουρίνης

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο (AMP, IMP, G1P, Pi, SO_4^{2-}), είτε ενεργοποιούν, είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP, όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων.

- **Το καταλυτικό κέντρο**

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από την σύνδεση των υποστρωμάτων (Glc-1-P, Pi) και αναλόγων τους. Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε μια απόσταση 15 Å από την επιφάνεια. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση επιτυγχάνεται μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται από τον βρόχο αμινοξικής αλληλουχίας 282-285. Κατά τη μετάπτωση από T σε R, ο βρόχος 282-285 εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από τη βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 οδηγεί στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας.

- **Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών**

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε ένα αυλάκι που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας. Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί και ως κέντρο ρύθμισης, μιας και η κατάληψη του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης.

- **Το κέντρο αναστολής**

Το κέντρο αναστολής, είναι ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης το οποίο εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου, σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Το κέντρο αναστολής περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (13-484 αμινοξέα), καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (485-842 αμινοξέα). Στην T διαμόρφωση, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού, που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχθεί ότι: πουρίνες όπως η αδενίνη, νουκλεοσίδια όπως η αδενοσίνη και η ινοσίνη, φωσφονουκλεοτίδια όπως το AMP, το IMP και το ATP, το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σωματίδια, συνδέονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GP_a και GP_b, όχι όμως και στη ηπατική GP_a, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα.

Στην T διαμόρφωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η Phe285 του βρόχου 280 εντοπίζεται κοντά στη Tyr613 από την έλικα α-19, και μαζί αυτά τα δύο υδρόφοβα μόρια, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η σύνδεση στο κέντρο αυτό, έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου και συγχρόνως την φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η σύνδεση των αναστολέων με το ένζυμο δεν οφείλεται σε ηλεκτροστατικούς δεσμούς, καθώς θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει, ότι η κύρια πηγή ενέργειας σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων.

- **Το νέο αλλοστερικό κέντρο**

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPb. Σε αυτό συνδέεται η ένωση CP320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδια καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοκυρανοζυλουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GPb. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GPα.

2.3.4 Ενζυμική αναστολή

Γενικά είναι αποδεκτό ότι μόνο μία μικρή περιοχή (ενεργός περιοχή) του συνολικού ενζυμικού μορίου εμπλέκεται άμεσα στην καταλυτική διεργασία. Ένας δε κύριος ρόλος του υπόλοιπου μορίου είναι να διατηρεί την ενεργό περιοχή σε στερεοδιατάξεις καταλυτικά δραστικές, ώστε να δεσμεύει και να δρα στα υποστρώματα. Συνέπεια τούτου είναι τα ένζυμα, στην πράξη, να εμφανίζουν δύο άριστες (βέλτιστες) συνθήκες. Μία που αφορά στη δομική σταθερότητα του μορίου γενικά, και μια που αφορά άμεσα στην καταλυτική ικανότητα (δραστικότητα) και αντικατοπτρίζει την κατάσταση στην ενεργό περιοχή.

Ως αναστολείς (παρεμποδιστές, inhibitors) θεωρούνται ουσίες οι οποίες, σε χαμηλή συγκέντρωση, ελαττώνουν την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, έχοντας την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με το ένζυμο και να παρεμποδίζουν τη δράση του. Οι αναστολείς λειτουργούν εκλεκτικά, αλληλεπιδρώντας με λίγες και συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης επί του ενζυμικού μορίου.

Οι αναστολείς διακρίνονται σε αντιστρεπτούς (reversible) και μη αντιστρεπτούς (irreversible). Οι αντιστρεπτοί αναστολείς, δεσμεύονται κατά τρόπο αντιστρέψιμο με το ένζυμο, οπότε το τελευταίο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστηριότητά του, όταν αφαιρεθεί ο αναστολέας. Ο βαθμός αναστολής της ενζυμικής αντιδράσεως παρουσία αναστολέα παραμένει σταθερός τουλάχιστον για το αρχικό στάδιο της αντίδρασης και εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις αναστολέα, ενζύμου και υποστρώματος.

Αντίθετα, οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται κατά τρόπο μόνιμο (π.χ. σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού), οπότε το ένζυμο αδρανοποιείται, συνήθως, οριστικά.

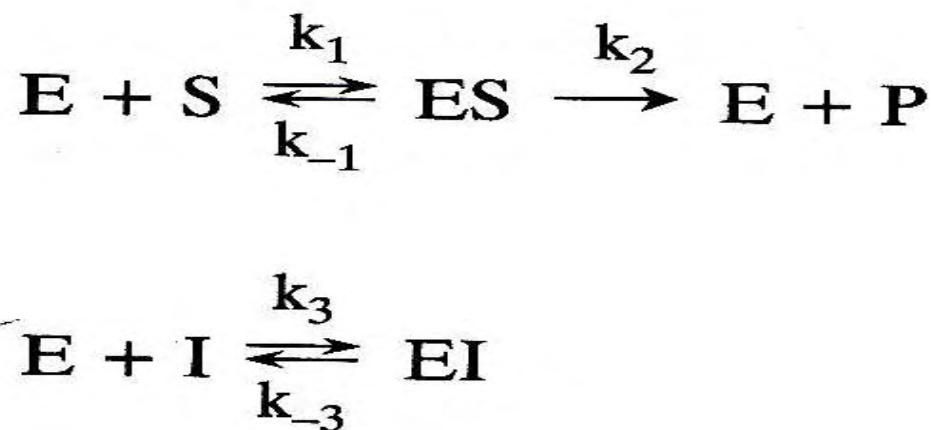
Στην κλασική ενζυμική κινητική διακρίνονται διάφορα είδη αντιστρεπτής αναστολής, π.χ. συναγωνιστική, ανταγωνιστική, μικτή, μη συναγωνιστική, μερική, υποστρώματος, προϊόντος και αλλοστερική. Όλες διακρίνονται μεταξύ τους μέσω κινητικής μελέτης που βασίζεται στην αρχική αντίδραση.

- Η ενζυμική αναστολή γίνεται από ειδικά μικρά μόρια ή ιόντα που αναστέλλουν ακόμη και μη αλλοστερικά ένζυμα.
- Στη μη αντιστρεπτή αναστολή, ο αναστολέας ενώνεται ομοιοπολικά με το ένζυμο ή συνδέεται τόσο ισχυρά, ώστε ο διαχωρισμός του από το ένζυμο να είναι πολύ αργός. Οι ομοιοπολικοί αναστολείς παρέχουν έναν τρόπο χαρτογράφησης του ενεργού κέντρου του ενζύμου.
- Η αντιστρεπτή αναστολή χαρακτηρίζεται από μια ταχεία ισορροπία μεταξύ του ενζύμου και του αναστολέα.
- Ένας συναγωνιστικός αναστολέας εμποδίζει το υπόστρωμα από την πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο. Ελαττώνει την ταχύτητα της αντίδρασης με το να ελαττώνει την αναλογία μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας ελαττώνει τον αριθμό μετατροπής.
- Η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να διακριθεί από τη μη συναγωνιστική αναστολή, με το να προσδιοριστεί εάν η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας από ειδικά μικρά μόρια και ιόντα είναι σημαντική γιατί αποτελεί έναν από τους κύριους μηχανισμούς ελέγχου στα βιολογικά συστήματα.

Επίσης, πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες δρουν με αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Περαιτέρω, η ενζυμική αναστολή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την κατανόηση του μηχανισμού της ενζυμικής δράσης. Κατάλοιπα αμινοξέων κρίσιμα για την κατάλυση μπορούν συχνά να προσδιοριστούν με τη χρησιμοποίηση ειδικών αναστολέων. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, γιατί συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα.

Στη συναγωνιστική αναστολή, το ένζυμο μπορεί να προσδένει υπόστρωμα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI) αλλά όχι και τα δύο (εικόνα 16).



Εικόνα 16: Συναγωνιστική αναστολή: Εάν ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος S, τότε τα I και S συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός αναστολέας.

Πολλοί συναγωνιστικοί αναστολείς μοιάζουν με το υπόστρωμα και προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης, με το να ελαττώνει την αναλογία μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα με ένα υπόστρωμα.

Η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα σ' ένα μόριο ενζύμου. Αυτό σημαίνει ότι οι περιοχές πρόσδεσής τους δεν επικαλύπτονται. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα με το υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος (εικόνα 17).



Εικόνα 17: Τρόποι δράσης αναστολέων: α) Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος απουσία αναστολέα. β) Συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το υπόστρωμα δεν συνδέεται. γ) Μη συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται σε σημείο διαφορετικό με το ενεργό κέντρο. Το υπόστρωμα συνεχίζει να συνδέεται, αλλά το ένζυμο δεν καταλύει την αντίδραση λόγω της παρουσίας του αναστολέα.

Μια πιο περίπλοκη αναστολή, που ονομάζεται μεικτή αναστολή, παράγεται όταν ένας αναστολέας και επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού

Η μέθοδος των Fischer & Krebs είναι αυτή που χρησιμοποιείται ώστε να απομονωθεί η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού, με μικρές μόνο τροποποιήσεις (χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) .

Υλικά:

- Κουνέλια (2 μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃),
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρεις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH7.0)

- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO_3 και 10mM EDTA στους 100°C και συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους)

Όργανα:

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

Πορεία:

Βήμα 1^ο: Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μύς από 2 κουνέλια. Οι μύς αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των

εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2^ο: Όξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH₃COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολρότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κεκορεσμένο KHCO₃ και ογκομέτρηση του διαλύματος.

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L πρωτεϊνικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M με pH 7.5 για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5500rpm για 30min στους 0-4°C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH7.0 όγκου ίσο με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1M pH7.0 ίσο με το 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά από επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH₃COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετράται.

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1mL AMP 0.1M (pH 7.0) και (CH₃COO)₂Mg 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, (το AMP και το (CH₃COO)₂Mg διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστο 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραιώσης (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων

(συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP.

Βήμα 6^ο: Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C σε ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20°C .

3.2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

3.2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen_(n)**:



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Πορεία:

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM β-γλυκερινοφωσφορικού νατρίου 50 mM 2-μερκαπτοαιθανολης, 1mM EDTA pH 6.8 και λαμβάνεται το εναιώρημα ενζύμου. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου ανά mL, γλυκογόνο 5 % (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου 5% (v/v). Επίσης, σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D-Glc-1-P 2.0mM με προσθήκη 200μL υποστρώματος α-D- Glc -1-P 9.0mM, 18μL AMP 50mM και 502μL H₂O.

Στη συνέχεια, το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C για 15 λεπτά. Μετά την επώαση, προστίθενται 180μL από το ενζυμικό μείγμα στον σωλήνα του υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες : 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υποστρώματα α-D-Glc-1-P από 2 mM έως 20 mM , η θερμοκρασία είναι 30° C και το pH 6.8. Ανά τακτά και καθορισμένα χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού), λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το διάλυμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1%. Το SDS, είναι

απορρυπαντικό και προκαλεί την αποδιάταξη και την αδρανοποίηση του ενζύμου.

Έπειτα, γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) στα δείγματα. Εκτός από αυτά τα δείγματα, ο προσδιορισμός του φωσφόρου γίνεται και σε τυφλά δείγματα, όπως α-D-Glc-1-P, λόγω της υδρόλυσης της αλλά και στο γλυκογόνο λόγω της παρουσίας των φωσφορικών.

3.2.2 Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b

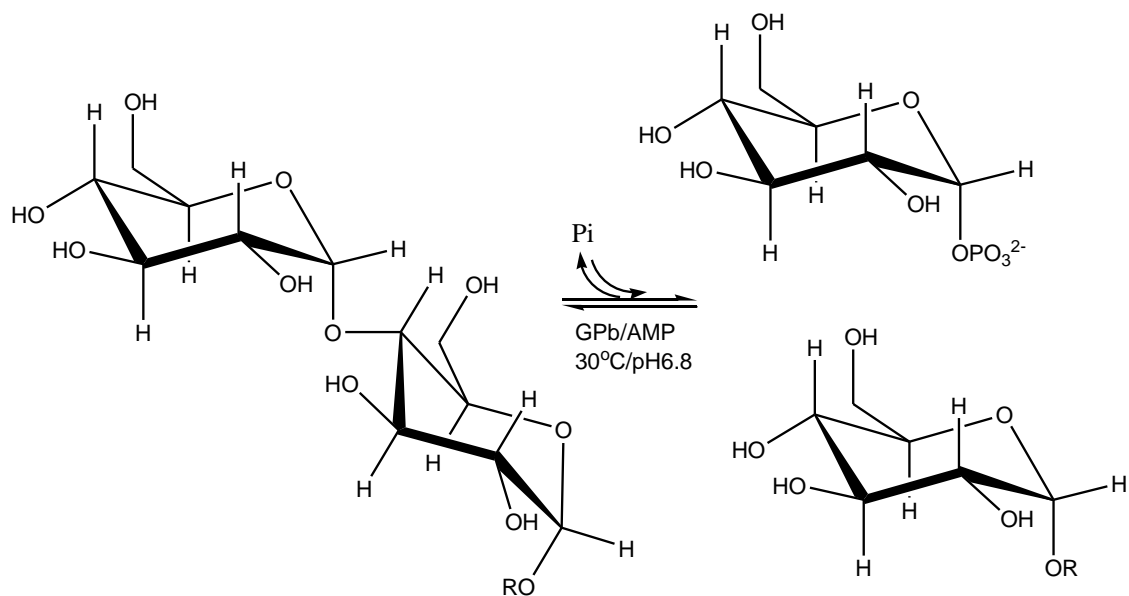
Το ένζυμο φυλάσσεται σε εναιώρημα γλυκερόλης. Από το εναιώρημα αυτό παίρνουμε 10 μ L και το αραιώνουμε με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Στη συνέχεια το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ο προσδιορισμός γίνεται με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1cm.

Στη συνέχεια παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιέχει 25 μ g ενζύμου /mL, γλυκογόνο 1%(w/v), νερό καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου 5% (v/v), έτσι ώστε με την προσθήκη του διαλύματος με το υπόστρωμα, η αντίδραση να λαμβάνει χώρα σε καθορισμένες συνθήκες όπως 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υπόστρωμα α-D-Glc-1-P σταθερής συγκέντρωσης και επίσης μεταβαλλόμενη συγκέντρωση αναστολέα. Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση με θερμοκρασία 30° C για 15 λεπτά.

3.3 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α -D- Glc-1-P).

Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (GPb) βασίζεται στην ακόλουθη αντίδραση:



Εικόνα 18 : Σχηματική παρουσίαση της αντίδρασης στην οποία βασίζεται η κινητική μελέτη της GPb.

Στην αντίδραση αυτή η λιγότερο ενεργή μορφή του ενζύμου (T διαμόρφωση), μετά από ενεργοποίηση με AMP, δρα αντίστροφα, προς σχηματισμό γλυκογόνου, παρουσία G-1-P (α -D-1-φωσφορικής

γλυκόζης), και ελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi) . Η καταλυόμενη αντίδραση σε συνθήκες κορεσμού σε AMP και γλυκογόνο (1.0 mM και 1.0% w/v αντίστοιχα) ακολουθεί μία κινητική κατά Michaelis Menten, σύμφωνα με την οποία η καμπύλη της ταχύτητας ως προς το υπόστρωμα, την 1-φωσφορική γλυκόζη, αποτελεί τμήμα υπερβολής. Σε μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση του υποστρώματος όσο και την ποσότητα του ενζύμου. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, όπου επέρχεται κορεσμός, η ταχύτητα εξαρτάται αποκλειστικά από την ποσότητα του ενζύμου στο μίγμα της αντίδρασης.

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς Km της GPb πραγματοποιείται κινητική μελέτη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος G-1-P.

3.4 Υπολογισμός των αρχικών ταχυτήτων (v) και των τυπικών αποκλίσεων (σ^2)

Οι απορροφήσεις των δειγμάτων διορθώνονται με την αφαίρεση της τιμής απορρόφησης των τυφλών της Glc-1-P (για την κάθε συγκέντρωση) και του γλυκογόνου, ενώ από την τιμή της απορρόφησης του τυφλού του πρότυπου διαλύματος φωσφορικών προκύπτει η τιμή της απορρόφησης του 1μmol φωσφορικών, οπότε όλες οι τιμές των απορροφήσεων ανάγονται σε μmol φωσφορικών ιόντων.

Οι τιμές των αρχικών ταχυτήτων (v) και το τυπικό τους σφάλμα (σ^2) υπολογίζονται εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή. Η

μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων είναι η εξής:

$$k = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{\text{όριο}}{\text{όριο} - \mu\text{molP}_i} \right) \text{όριο/mg ενζύμου}$$

όπου k: είναι η αρχική ταχύτητα ν της αντίδρασης

t: ο χρόνος της αντίδρασης

όριο: προκύπτει από το γινόμενο της συγκέντρωσης της Glc-1-P που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος επί τον όγκο του δείγματος επί την μέγιστη υδρόλυση της Glc-1-P (78%) στην ισορροπία της αντίδρασης.

3.5 Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων V_{max} και K_m και των τυπικών αποκλίσεων (σ₂)

Οι αρχικές ταχύτητες που προκύπτουν από την παραπάνω εξίσωση επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων (ετεροσκεδαστικότητα 'explicit weighting'). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους V_{max} και K_m, (εικόνα 18) και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό αυτό χρησιμοποιείται η γνωστή εξίσωση Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S}$$

Όπου:

v : Η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης.

V_{\max} : Η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

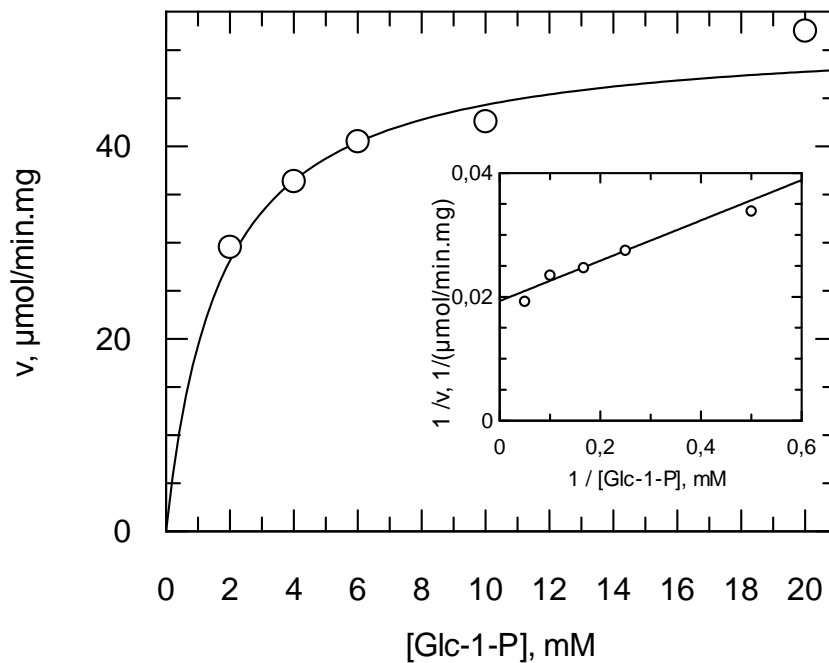
$[S]$: Η συγκέντρωση του υποστρώματος.

E : Το ένζυμο

S : Το υπόστρωμα

ES : Το σύμπλοκο ενζύμου - υποστρώματος

P : Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης



Εικόνα 19: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Ένθετο: Διάγραμμα Lineweaver- Burke.

3.6 Προσδιορισμός της K_i

Η K_i , είναι η σταθερά αναστολής, ή σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα, EI, και ισούται προς $[E][I]/[EI]$.

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας της σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των φωσφορικών ιόντων Pi. Η μείωση αυτή εκφράζεται ως αναστολή, σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, δρουν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή, διότι η σύνδεση τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος και συνεπώς τη φυσιολογική δράση του ενζύμου. Συμφωνά με το μοντέλο αυτής της αναστολής, ο αναστολέας δεσμεύεται στο καταλυτικό κέντρο και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

3.7 Υπολογισμός της φαινόμενης K_m ($K_{m,app}$) και της K_i - μοντέλο συναγωνιστικής αναστολής (competitive inhibition)

Συναγωνιστική αναστολή είναι μία μορφή ενζυμικής αναστολής όπου η πρόσδεση ενός αναστολέα στο ένζυμο εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος και αντίστροφα.

Μηχανισμός

Στην συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας συνδέεται στο ίδιο ενεργό κέντρο όπου συνδέεται και το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου, στο καταλυτικό κέντρο, χωρίς να υπάρξει κάποια

αντίδραση. Έτσι, το μόριο του υποστρώματος δεν μπορεί να συνδεθεί όταν ο αναστολέας είναι ήδη συνδεδεμένος και το αντίθετο. Σε αυτή την περίπτωση, η V_{max} της αντίδρασης παραμένει η ίδια (καθώς η παρουσία του αναστολέα μπορεί να υπερνικηθεί από υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος), ενώ η φαινόμενη συγγένεια του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο μειώνεται (αυτό σημαίνει ότι η φαινόμενη σταθερά διάστασης K_d ($K_{dissociation}$) αυξάνεται). Η μεταβολή της K_m (σταθερά Michaelis-Menten) ακολουθεί την αλλαγή της K_d . Έτσι η φαινόμενη K_m ($K_{m,apparent}$) αυξάνεται και η τιμή της δίνεται από τον τύπο:

$$K_{m,app} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Εδώ θα πρέπει να επισημανθεί ότι δεν είναι απαραίτητο αναστολέας και υπόστρωμα να δένονται στο ίδιο κέντρο του ενζύμου. Από τη στιγμή που η πρόσδεση του αναστολέα εμποδίζει τη πρόσδεση του υποστρώματος ο μηχανισμός αναστολής είναι συναγωνιστικός. Μπορεί η πρόσδεση του αναστολέα να γίνεται σε ένα δευτερεύον κέντρο του ενζύμου και αυτό να προκαλεί τέτοιες δομικές αλλαγές που να μην επιτρέπουν τη σύνδεση του υποστρώματος.

Μαθηματική επεξεργασία

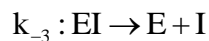
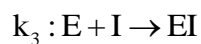
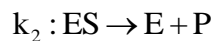
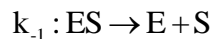
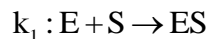
Στην απλούστερη περίπτωση ενός μονοϋποκατεστημένου ενζύμου η οποία υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten, το τυπικό σχήμα



τροποποιείται ώστε να περιλάβει τη σύνδεση του αναστολέα στο ελεύθερο ένζυμο:



Πρέπει να τονιστεί ότι ο αναστολέας I δεν δένεται στο σύμπλοκο ES και το υπόστρωμα S δεν δένεται στο σύμπλοκο EI. Είναι γενικότερα αποδεκτό ότι αυτή η συμπεριφορά είναι ενδεικτική για δύο ενώσεις, οι οποίες δένονται στο ίδιο κέντρο, όμως αυτό δεν είναι αυστηρά απαραίτητο. Για να παραχθεί η εξίσωση που περιγράφει αυτή την κινητική, ορίζονται αρχικά οι μικροσκοπικές σταθερές ισορροπίας για κάθε βήμα:



Γίνεται η παραδοχή μίας στάσιμης κατάστασης, ότι δηλαδή η συγκέντρωση κάθε μορφής του ενζύμου (ελεύθερο ή συμπλοκοποιημένο) παραμένει αμετάβλητη.

$$\frac{dE}{dt} = \frac{d}{dt} ES = \frac{d}{dt} EI = 0$$

Επιπλέον, η γνωστή συνολική ενζυμική συγκέντρωση είναι $E_T = E + ES + EI$, η ταχύτητα μετριέται υπό τον όρο ότι οι συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα δεν αλλάζουν

ουσιαστικά και ένα ασήμαντο ποσό προϊόντος έχει συσσωρευθεί.
Έτσι δημιουργούνται οι παρακάτω εξισώσεις:

$$(1) \quad E_T = E + ES + EI$$

$$(2) \quad \frac{dE}{dt} = 0 = -k_1 * E * S + k_{-1} * ES + k_2 * ES - k_3 * E * I + k_{-3} * EI$$

$$(3) \quad \frac{dES}{dt} = 0 = k_1 * E * S - k_{-1} * ES - k_2 * ES$$

$$(4) \quad \frac{dEI}{dt} = 0 = k_3 * E * I - k_{-3} * EI$$

Όπου S, I και E_T είναι γνωστά. Η αρχική ταχύτητα ορίζεται ως
 $v = dP/dt = k_2 ES$ έτσι πρέπει να καθορισθεί η άγνωστη ES ως προς
τις S, I and E_T

Από την (3) μπορούμε να προσδιορίσουμε την E ως προς ES :

$$k_1 * E * S = (k_{-1} + k_2) * ES$$

Διαιρώντας με $k_1 S$:

$$E = \frac{(k_{-1} + k_2) * ES}{k_1 * S}$$

Αντικαθιστώντας τον όρο $(k_{-1} + k_2)/k_1$ με την μακροσκοπική σταθερά
K_m:

$$(5) \quad E = \frac{K_m * ES}{S}$$

Αντικαθιστώντας την (5) στην (4) έχουμε:

$$0 = \frac{k_3 * I * K_m * ES}{S} - k_{-3} * EI$$

Από όπου προκύπτει:

$$EI = \frac{k_3 \cdot I \cdot K_m \cdot ES}{S \cdot k_{-3}}$$

Σε αυτό το σημείο μπορούμε να καθορίσουμε τη σταθερά διάστασης για τον αναστολέα ως $K_i = k_{-3}/k_3$, έτσι έχουμε

$$(6) \quad EI = \frac{I \cdot K_m \cdot ES}{S \cdot K_i}$$

Αντικαθιστώντας τις (5) και (6) στην (1) έχουμε:

$$E_T = K_m \cdot \frac{ES}{S} + ES + \frac{I \cdot K_m \cdot ES}{S \cdot K_i}$$

Λύνοντας ως προς ES, βρίσκουμε:

$$E_T = ES \cdot \left(\frac{K_m}{S} + 1 + \frac{I \cdot K_m}{S \cdot K_i} \right) = ES \cdot \frac{K_m \cdot K_i + S \cdot K_i + I \cdot K_m}{S \cdot K_i}$$

οπότε $ES = \frac{E_T \cdot S \cdot K_i}{K_m \cdot K_i + S \cdot K_i + I \cdot K_m}$

Επιστρέφοντας στην έκφραση της ταχύτητας v , τώρα έχουμε:

$$v = k_2 \cdot ES = \frac{k_2 \cdot E_T \cdot S \cdot K_i}{K_m \cdot K_i + S \cdot K_i + I \cdot K_m}$$

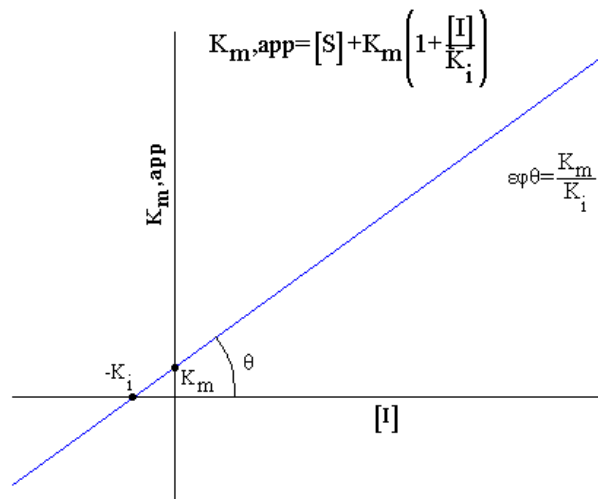
Τροποποιώντας την εξίσωση και αντικαθιστώντας την k_2 με k_{cat} , έχουμε

$$v = \frac{k_{cat} \cdot E_T \cdot S}{K_m + S + K_m \cdot (I/K_i)}$$

Τέλος αν αντικαταστήσουμε το $k_{cat} \cdot E_T$ με V_{max} παίρνουμε:

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{S + K_m \cdot (1 + I/K_i)}$$

Επίσης, ο υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K_i σε συστήματα καθαρής συναγωνιστικής αναστολής μπορεί να γίνει από το αντίστοιχο δευτερεύον διάγραμμα των $K_{m,app}$ ως προς τις συγκεντρώσεις του αναστολέα και θεωρώντας ότι η τιμή της K_i αντιστοιχεί σε $K_{m,app}=0$ (Segel, 1975).



Εικόνα 20: Διάγραμμα $K_{m,app}=f([I])$, από όπου από το σημείο τομής με τον άξονα x και την κλίση της ευθείας προκύπτει η τιμή της K_i

ΥΛΙΚΑ

- Απιονισμένο νερό
- Ενζυμικό διάλυμα
- Διάλυμα α -D-Glc-1-P
- Διάλυμα AMP 50mM

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης (β- GP), 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Γλυκογόνο 1% (w/v)
- Διάλυμα SDS 1%
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων Pi 1mM pH 6,8
- Διάλυμα αναστολέα
- Ιμιδαζόλιο
- χλωριούχο κάλιο, KCl, MB 74,56 g/mol (SIGMA) η μεγάλη συγκέντρωση του KCl είναι απαραίτητη για τη διατήρηση σταθερής ιοντικής ισχύς στα πειράματα
- EDTA, C₁₀H₁₄N₂O₈.Na₂.2H₂O, MB 372,5 g/mol (SERVA)
- Διθειοθρεϊτόλη, DTT, C₄H₁₀O₂S₂, MB 154,25 g/mol (SIGMA), η DTT όπως και η μερκαπτοαιθανόλη δρα ως αναγωγικό μέσο για την αποφυγή φαινομένων όπως η μερική οξείδωση του ενζύμου.

ΟΡΓΑΝΑ

- Υδατόλουτρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Ηλεκτρονικός ζυγός
- Πιπέτες
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Συσκευή Vortex
- Χρονόμετρο
- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο
- Χρονόμετρο

3.8 Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της K_m του ενζύμου βασίζεται στο προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb, γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση φωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου.

Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά:

- Τυφλό νερού για τη ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με τη μέγιστη συγκέντρωση Glc-1-P που χρησιμοποιείται και αναγωγή της τιμής της απορρόφησης που προκύπτει λόγω της φυσικής υδρόλυσης της Glc-1-P στις άλλες συγκεντρώσεις του πειράματος
- Τυφλό γνωστού πρότυπου διαλύματος φωσφορικών από όπου προσδιορίζεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$
- Τυφλό γλυκογόνου λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών ιόντων

Παρασκευάζονται τουλάχιστον από δύο τυφλά για κάθε περίπτωση εκτός του νερού και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεών τους, ενώ αν η χρονική διάρκεια ενός πειράματος (όπως σε περιπτώσεις που εξετάζεται κάποιος αναστολέας) κρίνεται μεγάλη, τότε φτιάχνονται δύο σειρές τυφλών από τουλάχιστο δύο δείγματα η κάθε μία, οι οποίες μετριοούνται η μία στην αρχή του πειράματος και η άλλη στο τέλος από όπου λαμβάνεται και πάλι ο μέσος όρος των τιμών.

3.9 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος

Παρασκευή διαλυμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις

Glc-1-P

Από το πυκνό διάλυμα της Glc-1-P (400mM) και το ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (200 mM), KCl (400 mM), EDTA (4 mM), DTT (4 mM) αναμιγνύονται κατάλληλοι όγκοι ώστε να προκύψει διάλυμα Glc-1-P (90mM), ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) και με pH 6.8.

Εν συνεχεία, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) και pH 6.8 με αραιώση του ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου (200 mM), KCl (400 mM), EDTA (4 mM), DTT (4 mM).

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της Glc-1-P προκύπτουν με αραιώσεις του διαλύματος Glc-1-P 90mM με το ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM). Έτσι προκύπτουν συνολικά τα παρακάτω διαλύματα:

- Glc-1-P 90mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 67.5mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 45mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 40.5mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 27mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 18mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8

- Glc-1-P 9mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8

Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C για να αποφευχθεί υδρόλυση της Glc-1-P.

Πορεία:

Για να προσδιοριστεί η σταθερά της αναστολής, πραγματοποιούνται 5 πειράματα το καθένα με διαφορετική συγκέντρωση α-D-Glc-1-P, έχοντας όμως σταθερή την συγκέντρωση του αναστολέα και του AMP. Αρχικά παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα όπως έχει περιγράψει πιο πάνω. Στη συνέχεια παρασκευάζουμε τα διαλύματα των υποστρωμάτων. Κάθε διάλυμα υποστρώματος θα πρέπει να έχει τελικό όγκο 720 μL. Να σημειωθεί ότι σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζουμε και ένα πείραμα ελέγχου χωρίς αναστολέα. Τα διαλύματα υποστρώματος, τοποθετούνται επίσης στο υδατόλουτρο, ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με τον ενζυμικό διάλυμα, πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει αναλυτικά την παρασκευή των διαλυμάτων του υποστρώματος για μία συγκεκριμένη συγκέντρωση αναστολέα.

	Σωλήνας 1	Σωλήνας 2	Σωλήνας 3	Σωλήνας 4	Σωλήνας 5
α-D-Glc-1-P	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
	2μM	4μM	6μM	10μM	20μM
AMP 50mM	18 μL	18 μL	18 μL	18 μL	18 μL

Αναστολέα ς	X μL	X μL	X μL	X μL	X μL
Νερό	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL
Τελικός όγκος	720 μL	720 μL	720 μL	720 μL	720 μL

Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος καθώς και των διαλυμάτων του υποστρώματος, μεταφέρονται 180 μL από το ενζυμικό διάλυμα σε κάθε διάλυμα υποστρώματος με τη σειρά, έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια ανά 1 λεπτό και σε χρόνους 1, 2, 3, και 4 λεπτών λαμβάνονται και μεταφέρονται 200 μL από το διάλυμα της αντίδρασης σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιέχουν από 50 μL SDS 1% και η αντίδραση σταματά, λόγω της αδρανοποιητικής δράσης του SDS. Στη συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις α-D-Glc-1-P.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί, προστίθενται από 2.5 mL διάλυμα ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά στους 30° C και μετά ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των φωσφορικών ιόντων (Pi), που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα, από τις οποίες θα προκύψουν και αλλά πειραματικά δεδομένα για την δημιουργία της καμπύλης για τον υπολογισμό της

σταθεράς αναστολής (K_i). Στη συνέχεια ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit, προκειμένου να προσδιοριστεί η K_i .

3.10 Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστηριότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου.

Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φωσφορικά ιόντα P_i πρέπει να είναι μεταξύ 0,05-0,4 μM , προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Υλικά:

- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου, με ρύθμιση pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με HCl 1N.

- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), με ρύθμιση pH 5.0 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N.

Στη συνέχεια αναμιγνύουμε τα διαλύματα με αναλογία όγκων 4:1, δηλ 4 όγκους αντιδραστήριου μολυβδαινικού και έναν όγκο ασκορβικού.

Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φώς και χρησιμοποιείται μετά από 15 min μετά την παρασκευή του και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

Πορεία:

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2.5mL από το παραπάνω αντιδραστήριο χρώσης. Μετά από ισχυρή ανάδευση οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850nm.

Ακολουθεί η περιγραφή των συνθηκών των κινητικών πειραμάτων που έγιναν για την ένωση που περιλαμβάνεται στην παρούσα εργασία:

- G1P: 2, 4, 6, 10 20 mM
- AMP: 1 mM
- Γλυκογόνο: 0.2% w/v

Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν: 10 μM , 30 μM , και 50 μM .

3.11 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μετά από τον προσδιορισμό φωσφόρου στα δείγματα του κινητικού πειράματος, επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Grafit .

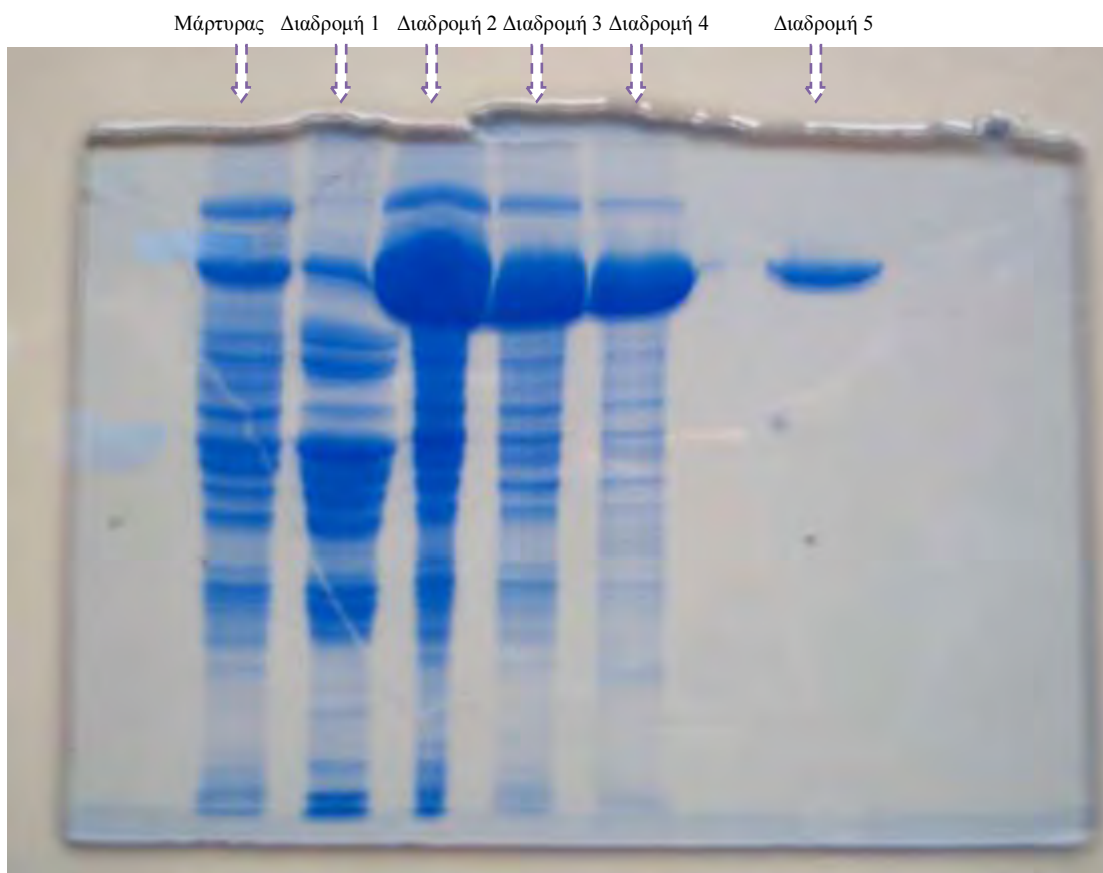
Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων υφίστανται διορθώσεις με βάση τα δείγματα αναφοράς για τα G-1-P και το γλυκογόνο. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten, $v=V_{\max}[S]/K_m + [S]$ (οπού v : ταχύτητα, V_{\max} : μέγιστη ταχύτητα, $[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος, K_m : σταθερά Michaelis-Menten). Γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{\max} .

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 1).

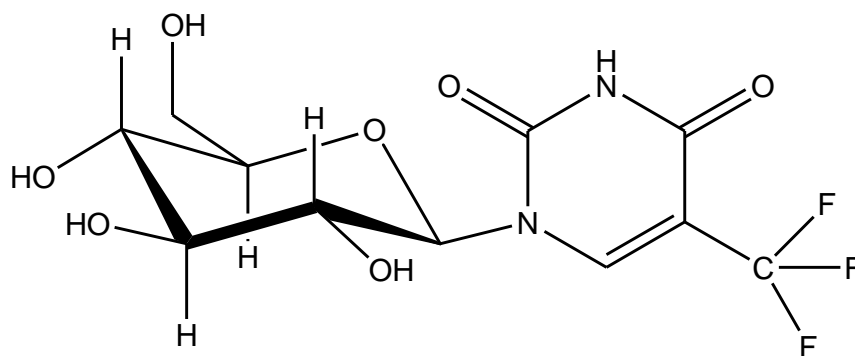


Εικόνα 21: Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

4.2 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η δράση της ουσίας GlcCF₃U (DK26, εικόνα 21), ένας αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που ανήκει στη νέα σειρά C5 παραγώγων αλογόνου ουρακυλο-γλυκοπυρανόζης. Ο ένωση αυτή είχε στην 5' θέση 1 ομάδα τριφθορομεθυλίου. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της σταθεράς K_i, ακολουθώντας

τη μεθοδολογία προσδιορισμού της K_i . Όπως αναφέρθηκε και πιο πριν, η K_i είναι η σταθερά αναστολής, ή σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα, EI , και ισούται προς $[E][I]/[EI]$. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή της σταθεράς K_i , τόσο πιο ισχυρά συνδέεται ο αναστολέας με το ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης και προκαλεί μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης φωσφορικών ιόντων.

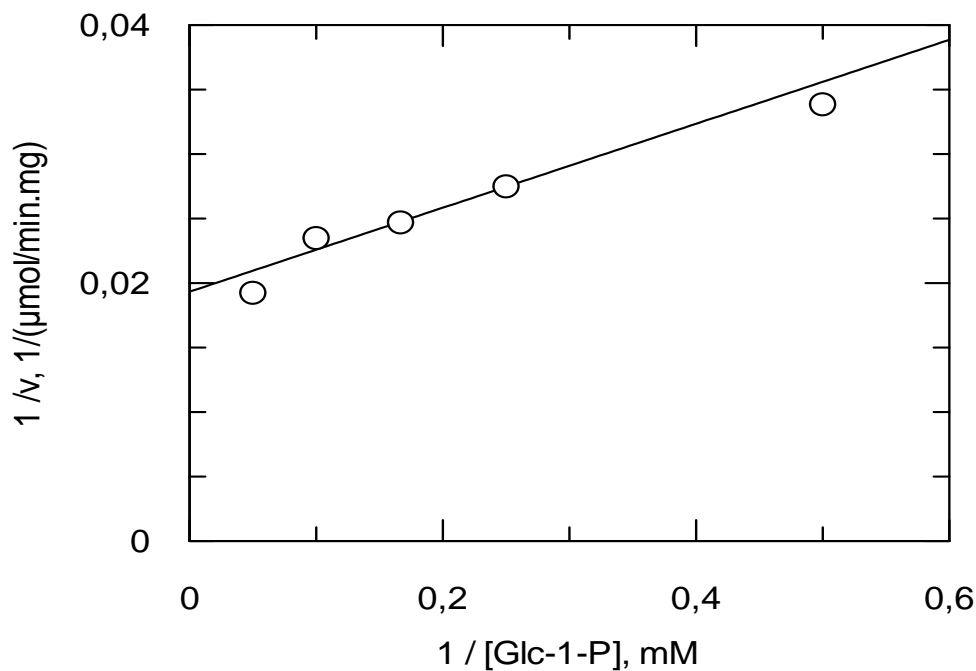
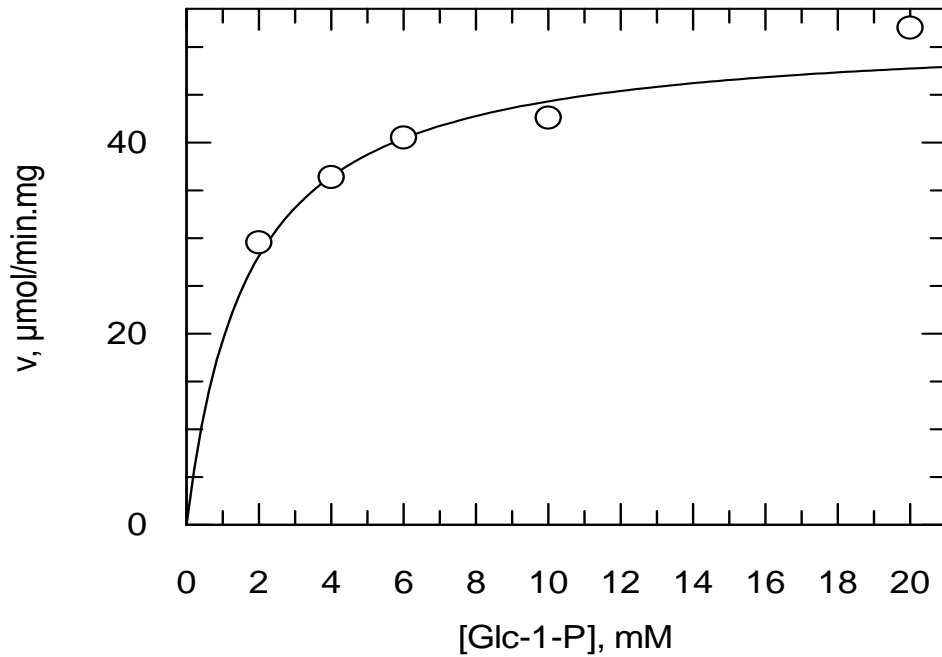


Εικόνα 22: Ο χημικός τύπος του υπό μελέτη αναστολέα {GlcCF3U (DK26)}

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (G-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m .

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=1.68 \pm 0.38$ mM, και $V_{max}=51.76 \pm 2.87$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Στην εικόνα 18

παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, *sp. activity*, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (Glc-1-P).



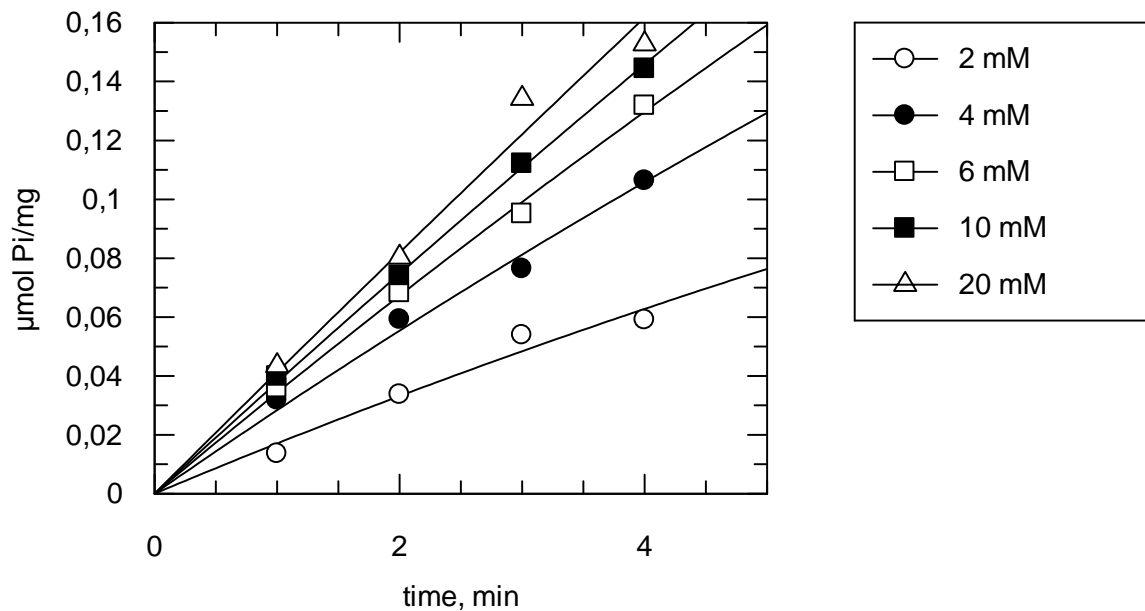
Εικόνα 23: (πάνω) Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης (4.0, 6.0,

10.0, 20.0 mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση AMP (1.0mM) και γλυκογόνου (0.2%w/v). Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

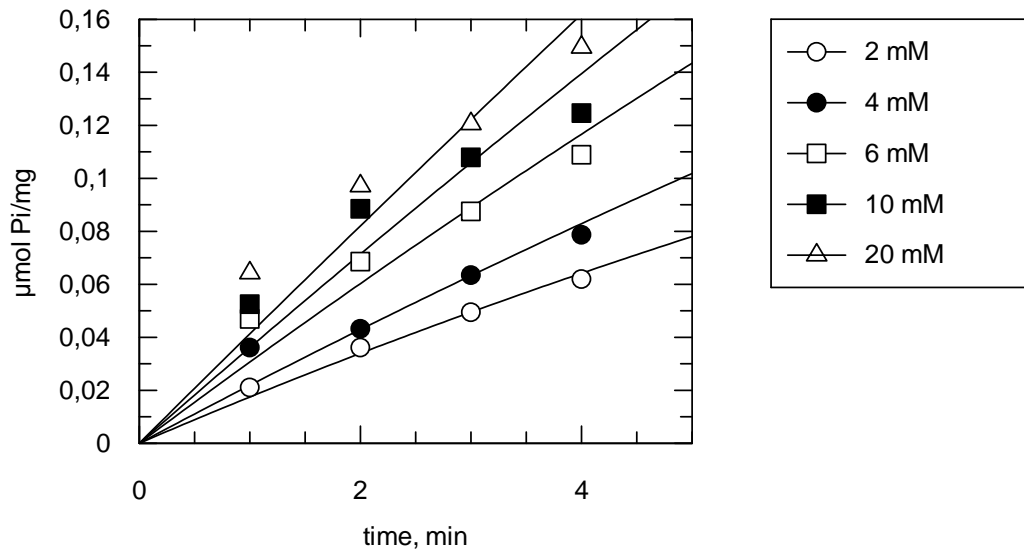
(κάτω) Αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk της σχέσης του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης.

4.3 Κινητική μελέτη αναστολέων

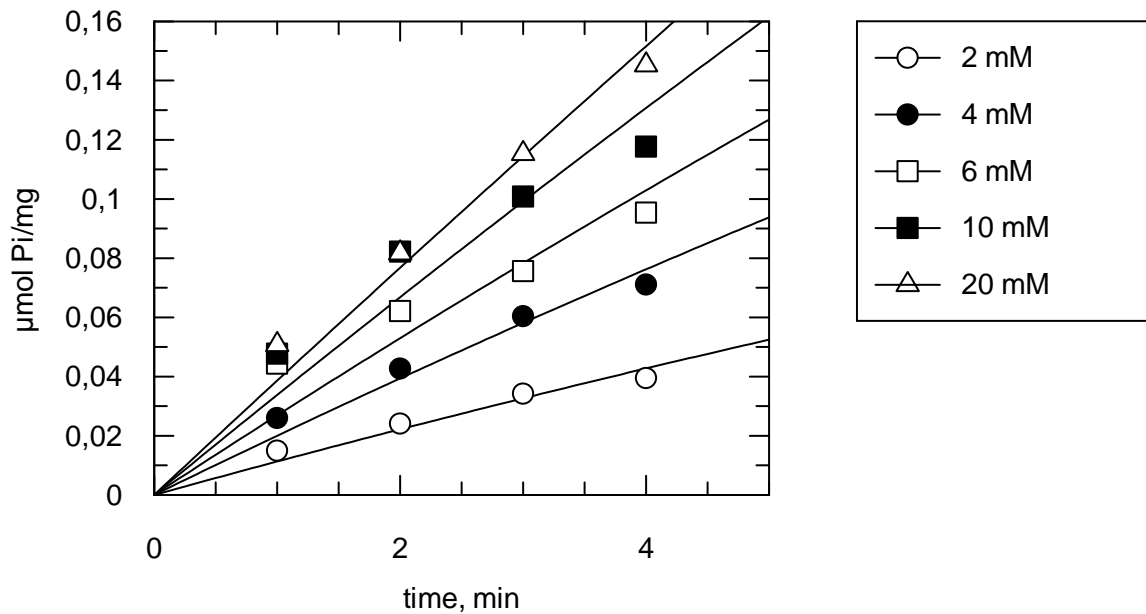
Στις εικόνες που ακολουθούν απεικονίζονται τα διαγράμματα της παραγωγής προϊόντος της αντίδρασης ($\mu\text{mol Pi}/\text{mg}$ ενζύμου) σε συνάρτηση με το χρόνο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας (sp. act.) του ενζύμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα.



10 μM DK26

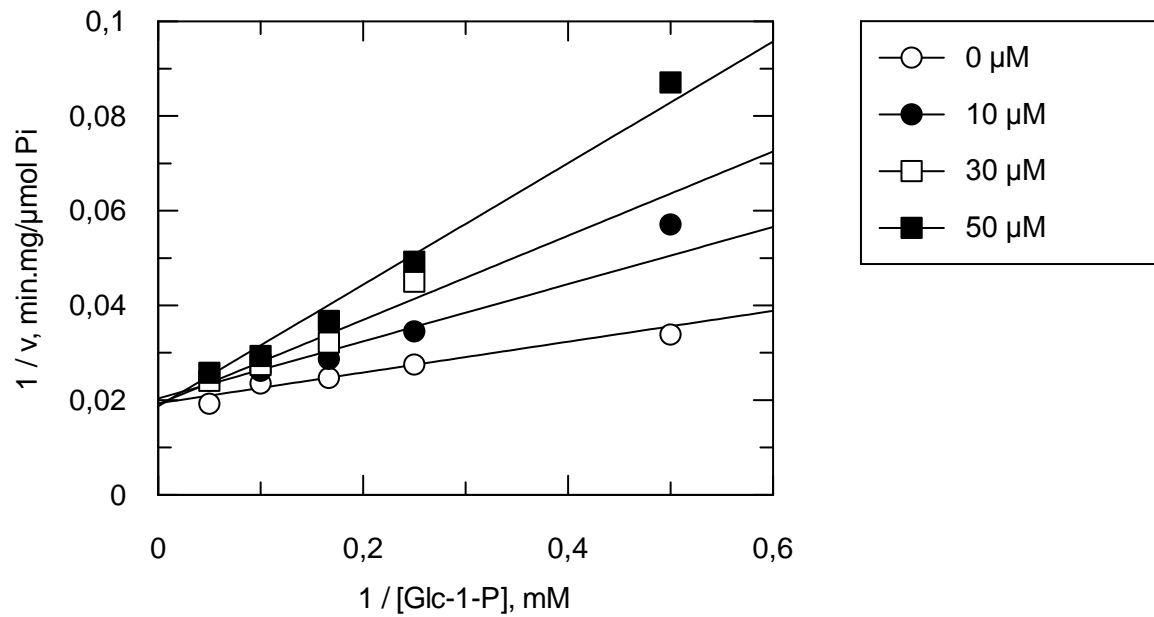


30 μM DK26



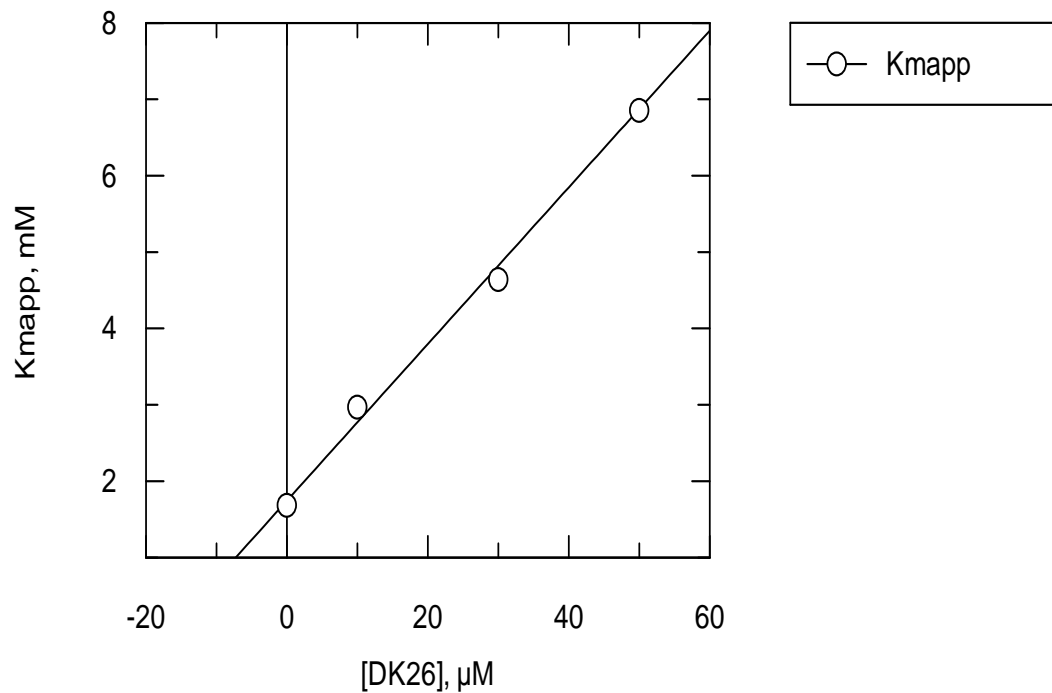
50 μM DK26

Όπως φαίνεται από το παρακάτω σχήμα με το αντίστροφο διάγραμμα *Lineweaver-Burk* για την ένωση με την οποία ασχολούμαστε, αυτή είναι συναγωνιστικός αναστολέας ως προς την Glc-1-P της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.



Εικόνα 24: Διάγραμμα του αντίστροφου της ειδικής δραστηριότητας ($S_p Act.$) σε συνάρτηση με το αντίστροφο της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα

Η σταθερά αναστολής, K_i , για την ένωση αυτή βρέθηκε από παρακάτω διάγραμμα $17.00 \pm 1.28 \mu M$



Εικόνα 25: Διάγραμμα της K_{mapp} ως προς τη συγκέντρωση του αναστολέα.

5. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η σύνδεση ενός τροποποιημένου παραγώγου της γλυκοπυρανόζης (GlcCF₃U) στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Ειδικότερα, η παρούσα μελέτη διεξήχθη στο πλαίσιο γενικότερης μελέτης της επίδρασης της C5 υποκατάστασης από αλογόνα της ουρακίλο-γλυκοπυρανόζης στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας. Έτσι αν και η σταθερά αναστολής της GlcCF₃U (17 μM) είναι πολύ χαμηλότερη από εκείνη της γλυκόζης (2.5 mM) που αποτελεί το φυσιολογικό αναστολέα του ενζύμου, και άρα η GlcCF₃U θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένωση οδηγός για το σχεδιασμό νέων εν δυνάμει φαρμάκων, φαίνεται πως η προσθήκη της τριφθορομεθυλοομάδας στο δακτύλιο της ουρακίλης δεν βελτιώνει την ανασταλτική ισχύ των ανάλογων αναστολέων μιας και η μητρική ένωση GlcU, (χωρίς την ομάδα) εμφανίζει παρόμοια σταθερά αναστολής (12.4 μM).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anatomy and Physiology. Saladin, Kenneth S. McGraw-Hill, 2007.
- Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L. Βιοχημεία, ΤΟΜΟΣ Ι (2007)
- Browner MF, Fletterick RJ (February 1992). "Phosphorylase: a biological transducer". *Trends in Biochemical Science*
- Cheta, Dan. Preventing diabetes: theory, practice, and new approaches. Chichester, Eng., New York,
- Edwin G. Krebs, Edmond H. Fischer, Molecular Properties and Transformations of Glycogen Phosphorylase in Animal Tissue
- Gisela Dahlquist, MD, PHDAaddress correspondence to Gisela Dahlquist, MD Environmental Factors and Type 1 Diabetes, Umeå University, S-901 85 Umeå, Sweden.
- Johnson LN (March 1992). "Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors".
- Kantsadi AL, Hayes JM, Manta S, Skamnaki VT, Kiritsis C, Psarra AM, Koutsogiannis Z, Dimopoulou A, Theofanous S, Nikoleousakos N, Zoumpoulakis P, Kontou M, Papadopoulos G, Zographos SE, Komiotis D, Leonidas DD, The σ -Hole Phenomenon of Halogen Atoms Forms the Structural Basis of the Strong Inhibitory Potency of C5 Halogen Substituted Glucopyranosyl Nucleosides towards Glycogen Phosphorylase b. **ChemMedChem. 2012 Jan 20. doi: 10.1002/cmdc.201100533.**
- Livanova NB, Chebotareva NA, Eronina TB, Kurganov BI (May 2002). "Pyridoxal 5'_Phosphate as a Catalytic and Conformational Cofactor of Muscle Glycogen Phosphorylase b

- Newgard CB, Hwang PK, Fletterick, RJ (1989). "The family of glycogen phosphorylases: structure and function". *Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology*
- Oikonomakos NG, Kontou M, Zographos SE, Tsitoura HS, Johnson LN, Watson KA, Mitchell EP, Fleet GW, Son JC, Bichard CJ, et al. (Jul 1994). "The design of potential antidiabetic drugs: experimental investigation of a number of beta-D-glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase".
- Palm D, Klein HW, Schinzel R, Buehner M, Helmreich, EJM (February 1990). "The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis". *Biochemistry*
- Stephen G. Withers, Neil B. Madsen, Brian D. Sykes
- Αθ. Σμοκοβίτη ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ (2007)
- Γεωργάτσος Ι. Γ., Γιουσάνης Τ. Α., Κυριακίδης Δημήτριος Α Ενζυμολογία: Κεφάλαιο 11,12(2001)
- Παπάζογλου Ν. Μητρώο Εργασιών Ελλήνων ερευνητών και συγγραφέων με γνωστικό αντικείμενο του σακχαρώδη διαβήτη. Γ' έκδ. (2009)
- Κατσίλαμπρος Ν, Διακομουπούλου Ε, Ιωαννίδης Ι, Λιάτης Σ. Ο σακχαρώδης διαβήτης στην κλινική πράξη: Ο διαβήτης από το Α ως το Ω με ερωτήσεις και απαντήσεις. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας (2005)
- Μελιδώνης Α. , Σακχαρώδης διαβήτης 2010: Σύγχρονες προσεγγίσεις σε θέματα αιχμής, Ιατρικές Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος