



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ  
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ



ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΑΚΗ ΜΑΡΙΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2015

ΛΑΡΙΣΑ

## ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

### Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Δρ. Μπαλατσός Νικόλαος**

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική**

Λέκτορας Βιοχημείας – Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2014 – Φλεβάρης 2015 , στο εργαστήριο Δομική και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Για τη συμβολή του στην εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής. Πρώτα απ ' όλα τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος, Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του. Η καθοδήγηση, η ενθάρρυνση και η βοήθεια του υπήρξαν πολύτιμες για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

Επίσης οφείλω να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος, Δρ. Νικόλαο Μπαλατσός για την πολύτιμη βοήθειά του όποτε αυτή κρίθηκε απαραίτητη καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στην Λέκτορα Βιοχημείας – Μεταβολισμού του Τμήματος, Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη για την υποστήριξη και το ενδιαφέρον που υπέδειξε για την παρούσα πτυχιακή εργασία.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφιο διδάκτορα κ. Αναστασία Καντσάδη για την πολύτιμη συνεργασία και ουσιαστική βοήθεια στην αξιολόγηση των πειραματικών δεδομένων. Ακόμη, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Dr.Alberto Minassi του Πανεπιστημίου Piemonte Orientale της Νοβάρα καθώς μας διέθεσε τον αναστολέα για την πτυχιακή μου εργασία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και όσους συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1. Σακχαρώδης Διαβήτης.....	6
1.1.1 Γενικά.....	6
1.1.2 Ο φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης.....	8
1.1.3 Διαβήτης Τύπου 1.....	10
1.1.4 Διαβήτης Τύπου 2.....	10
1.2 Πρωτεϊνικές Κινάσες.....	12
1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνικών κινασών.....	12
1.2.2 Μηχανισμοί της ρύθμισης των πρωτεϊνικών κινασών.....	13
1.3 Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	14
1.3.1 Γλυκογόνο.....	14
1.3.2 Βιοσύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	15
1.4 Κινάση της φωσφορυλάσης.....	18
1.4.1 Γενικά.....	18
1.4.2 Δομή της κινάσης της φωσφορυλάσης.....	19
1.4.3 Ιδιότητες των γ και δ υπομονάδων της κινάσης της φωσφορυλάσης.....	20
1.4.4 Ιδιότητες των α και β υπομονάδων της κινάσης της φωσφορυλάσης.....	21
1.4.5 Υποστρώματα – Ρύθμιση της δράσης της σκελετικής κινάσης της φωσφορυλάσης.....	23
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	29
2.1 Καθαρισμός της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από μυϊκό ιστό κουνελιού.....	29

2.2 Απομόνωση της κινάσης της φωσφορυλάσης από μετασχηματισμένα κύτταρα E.coli.....	32
2.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της $\gamma$ – καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης.....	36
2.4 Κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS – πολυακρυλαμιδίου.....	40
2.5 Κινητική μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	42
2.5.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας της κινάσης της φωσφορυλάσης.....	42
2.5.2 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis – Menten( $K_m$ ).....	42
2.5.3 Προσδιορισμός του $IC_{50}$ αναστολέα.....	46
2.6.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit.....	48
2.7 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας.....	49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	50
3.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης $\beta$ του γλυκογόνου.....	50
3.2 Απομόνωση της $\gamma$ – καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	51
3.3 Κινητική μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	54
3.4 Κινητική μελέτη των κουρκουμινών.....	55
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	58
ABSTRACT.....	59
BIBΛΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

## 1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης:

### 1.1.1 Γενικά:

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης(ΣΔ) αποτελεί ένα σύνδρομο μεταβολικών διαταραχών, που χαρακτηρίζεται από χρόνια αύξηση των επιπέδων γλυκόζης του αίματος (υπεργλυκαιμία) και προκύπτει ως αποτέλεσμα της ανεπαρκούς έκκρισης και/ή δράσης της ινσουλίνης. Η κατάσταση αυτή μπορεί να συνοδεύεται από ποικίλες διαταραχές του μεταβολισμού των υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπών. Η βαρύτητα των διαφόρων κλινικών εκδηλώσεων εξαρτάται από τα αίτια, τον βαθμό ελλείμματος της ινσουλινικής δράσης, συνυπάρχουσες παθήσεις και την έκταση της ιστικής βλάβης διαβητικής αιτιολογίας.

Η ταξινόμηση του ΣΔ από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO 1985) έχει υιοθετηθεί διεθνώς. Η Αμερικάνικη Διαβητολογική Εταιρεία (American Diabetes Association, ADA) επανεξέτασε τα κριτήρια ταξινόμησης του ΣΔ και συνέστησε τροποποιήσεις το 1997, οι οποίες έγιναν ακολούθως δεκτές από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Οι όροι διαβήτης τύπου 1 και τύπου 2 αντικατέστησαν τις παλιές κατηγορίες του ινσουλινοεξαρτώμενου και μη ινσουλινοεξαρτώμενου σακχαρώδη διαβήτη. Ο διαβήτης τύπου 1 ή νεανικός διαβήτης πλήττει κυρίως άτομα νεαρής ηλικίας και χαρακτηρίζεται από καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που συνήθως οδηγεί σε έλλειψη ινσουλίνης και η επιβίωση των ατόμων αυτών εξαρτάται από την εξωγενή χορήγησή της. Ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται και ως διαβήτης των ενηλίκων και κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία. Παρ' όλα αυτά υπάρχει η πιθανότητα να εμφανιστεί και σε άτομα μικρότερης ηλικίας. Συνήθως πάντως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 χρονών και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών. Ο διαβήτης τύπου 1 και 2 συγκρίνονται στον Πίνακα 1.1.

<b>Χαρακτηριστικό</b>	<b>ΣΔ Τύπου 1</b>	<b>ΣΔ Τύπου 2</b>
Συνήθης ηλικία έναρξης	Συνήθως κάτω των 30 ετών	Συνήθως άνω των 40 ετών
Συνυπάρχουσα παχυσαρκία	Ναι	Όχι
Τάση ανάπτυξης διαβητικής	Ναι	Όχι

κετοξέωσης που χρειάζεται ινσουλίνη για να ελεγχθεί		
Παρουσία κλασικών συμπτωμάτων υπεργλυκαιμίας κατά τη διάγνωση	Ναι, συχνά σοβαρά	Μπορεί και να απουσιάζουν. Αν υπάρχουν είναι συνήθως μέτριας βαρύτητας
Ενδογενής έκκριση ινσουλίνης	Πολύ μικρή, σχεδόν μη ανιχνεύσιμη	Ποικίλλει, σε κάθε περίπτωση μικρότερη από το αναμενόμενο από τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης του αίματος
Αντίσταση στην ινσουλίνη	Δεν υπάρχει	Υπάρχει αλλά ποικίλλει ως προς το μέγεθος
Κληρονομική συνιστώσα	Κάτω από 50%	Πάνω από 90%
Θετικά αντιησιδιακά αντισώματα κατά τη διάγνωση	Ναι	Όχι
Παθολογοανατομική εικόνα νησιδίων παγκρέατος	Φλεγμονή, εκλεκτική απώλεια της πλειοψηφίας των β-κυττάρων	Μικρότερα νησίδια φυσιολογικής μορφολογίας, συχνές εναποθέσεις αμυλοειδούς
Αυξημένος σχετικός κίνδυνος για μικρο- και μακροαγγειακές επιπλοκές	Ναι	Όχι
Ανταπόκριση υπεργλυκαιμίας σε από του στόματος αντιδιαβητικούς παράγοντες	Όχι	Ναι, στα αρχικά στάδια στην πλειοψηφία των ασθενών

Ένας στους δέκα Έλληνες πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη ενώ ο αριθμός των πασχόντων έχει τετραπλασιαστεί τα τελευταία 30 χρόνια. Ο διαβήτης τύπου 1 αυξάνεται κατά 3% κάθε χρόνο στα παιδιά και στους εφήβους. Επίσης ο διαβήτης τύπου 2 προσβάλλει πλέον όλο και μικρότερες ηλικίες νέους και παιδιά. Ο διαβήτης έχει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στο δυτικό κόσμο πράγμα που σχετίζεται με τη διατροφή και την καθιστική ζωή.

Ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί σε άτομα με γενετική προδιάθεση ωστόσο δεν θεωρείται ούτε κληρονομικός, αν και στις περισσότερες περιπτώσεις το γενετικό υπόβαθρο μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τον επιπολασμό του ΣΔ είναι Η ηλικία, η παχυσαρκία, ο καθιστικός τρόπος ζωής, το φύλο καθώς και οι σύγχρονες διατροφικές

συνήθειες και ο αγχώδης τρόπος ζωής (Steven Levene, Richard Donnelly, 2008, Έκδοση 2<sup>η</sup>, Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2, Εκδόσεις Βήτα).

### 1.1.2 Ο φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης:

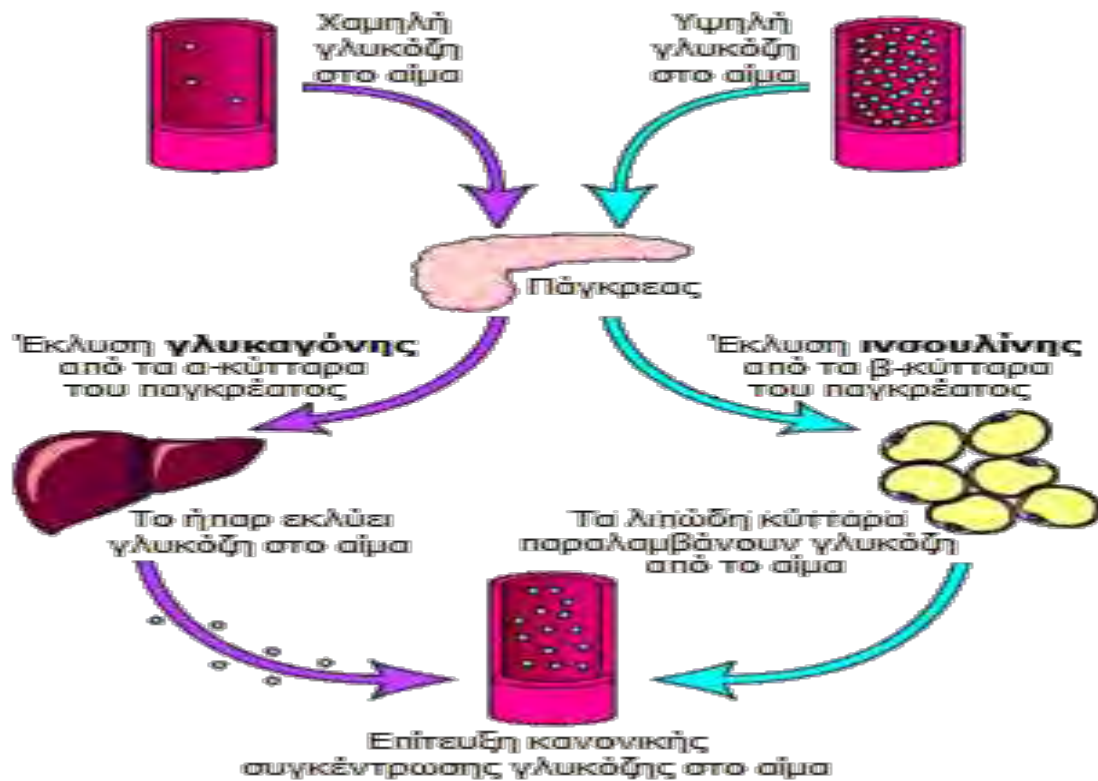
Η ινσουλίνη είναι πολυπεπτιδική ορμόνη που κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού. Διαχειρίζεται την κατάσταση του κορεσμού μετά από τη λήψη τροφής και έχει κύρια αποστολή τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων της γλυκόζης στο πλάσμα. Ταυτόχρονα, έχει πολύ σημαντικό αναβολικό ρόλο στο μεταβολισμό και ασκεί ευρύ φάσμα ρυθμιστικών επιδράσεων σε ενζυμικά συστήματα διαφόρων ειδών κυττάρων, σε ιστούς και όργανα του ανθρώπινου σώματος. Η ινσουλίνη εκκρίνεται από την ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος. Παράγεται στα β-κύτταρα, που αποτελούν το 60%, περίπου, των κυττάρων των νησιδίων του Langerhans. Η ινσουλίνη αποθηκεύεται σε εκκριτικά κοκκία των β-κυττάρων, σε μορφή κρυσταλλικού εξαμερούς συμπλέγματος και εκκρίνεται στην κυκλοφορία ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Το κύριο ερέθισμα για την σύνθεση και την απελευθέρωση της ινσουλίνης, από τα β-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος, είναι η αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο πλάσμα μετά από τη λήψη τροφής.

Η ινσουλίνη είναι ισχυρός αναβολικός και υπογλυκαιμικός παράγοντας με δράσεις που ανταγωνίζονται εκείνες των καταβολικών ορμονών, της γλυκαγόνης, της επινεφρίνης και της νορεπινεφρίνης, ενώ κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών.

Η βιολογική απάντηση της ινσουλίνης στην περιφέρεια, μετά την αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στην κυκλοφορία, είναι η άμεση εξωτερίκευση των μεταφορέων γλυκόζης GLUT-4 από το κυτταρόπλασμα στην επιφάνεια των κυττάρων των γραμμωτών μυών και του λιπώδους ιστού. Με τη λειτουργία της ταχείας εισόδου της γλυκόζης από την κυκλοφορία, μέσω των ελεγχόμενων από την ινσουλίνη υποδοχέων GLUT-4, οι ιστοί αυτοί αποτελούν την μεγάλη δεξαμενή ταχείας αποθήκευσης της περίσσειας της γλυκόζης μετά τη λήψη τροφής. Αυτός είναι ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο διατηρούνται τα επίπεδα της γλυκόζης του πλάσματος στα φυσιολογικά όρια, που είναι απαραίτητα για την ομοιόσταση και τη φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Άλλες δράσεις της ινσουλίνης, που συμβάλλουν στην ομοιόσταση της γλυκόζης, είναι η προαγωγή της πρόσληψης γλυκόζης από το ήπαρ, η αποθήκευση της γλυκόζης στο ήπαρ και τους μύς στη μορφή του γλυκογόνου και η αναστολή της δραστηριότητας των ενζύμων που προκαλούν τη διάσπαση του γλυκογόνου. Ακόμη, αναστέλλει στο ήπαρ τις ενζυμικές διεργασίες που οδηγούν στη γλυκονεογένεση, δηλαδή την εκ νέου σύνθεση γλυκόζης. **(ΕΙΚΟΝΑ 1)**



Η ινσουλίνη επίσης προάγει τη σύνθεση ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ και αναστέλλει την οξείδωση των λιπαρών οξέων και το σχηματισμό κετονοσωμάτων. Διαδραματίζει επίσης σημαντικό αναβολικό ρόλο στο μεταβολισμό των αμινοξέων και των πρωτεϊνών. Η απώλεια μυϊκής μάζας και ο καταβολισμός των πρωτεϊνών είναι χαρακτηριστικά του σακχαρώδη διαβήτη τύπου Ι, όπου υπάρχει έλλειμμα δράσης της ινσουλίνης (Stephen McPhee, 2006, Παθολογική Φυσιολογία, Χαράλαμπος Μουτσόπουλος, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας).



**Εικόνα 1: Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα.** Όταν η συγκέντρωση γλυκόζης είναι αυξημένη στο αίμα, απελευθερώνεται από το πάγκρεας ινσουλίνη που κατευθύνεται στο ήπαρ. Η ινσουλίνη προκαλεί σύνθεση γλυκογόνου στο ήπαρ με επακόλουθο, τη μείωση της συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα (πορεία με κίτρινα βέλη). Η χαμηλή συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης που λαμβάνεται από το πάγκρεας και το ήπαρ. Στο ήπαρ η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης (πορεία με μπλε βέλη). Η γλυκόζη μεταφέρεται στο αίμα και αυξάνει την συγκέντρωση του σακχάρου.

### **1.1.3 Διαβήτης Τύπου 1:**

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 οφείλεται σε καταστροφή των β- κυττάρων του παγκρέατος με αποτέλεσμα την εμφάνιση της σοβαρής ινσουλινοπενίας. Συνήθως προσβάλλει άτομα κάτω των 30 ετών, με τη μεγαλύτερη εμφάνιση της νόσου κατά την εφηβεία.

Σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 1, η γλυκόζη δε μεταβιβάζεται στα κύτταρα, καθώς δεν υπάρχει διαθέσιμη ινσουλίνη. Όταν η γλυκόζη συσσωρεύεται στο αίμα αντί να μεταβιβάζεται στα κύτταρα, τα κύτταρα του σώματος δε διαθέτουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά κι έτσι άλλα συστήματα του οργανισμού οφείλουν να παράγουν ενέργεια προκειμένου να πραγματοποιηθούν σημαντικές σωματικές λειτουργίες. Κατά συνέπεια, υπάρχει μεγάλη ποσότητα γλυκόζης στο αίμα, κάτι που μπορεί να προκαλέσει: 1) αφυδάτωση, 2) απώλεια βάρους (απώλεια της γλυκόζης από τα ούρα έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια βάρους), 3) διαβητική κετοξέωση (τα κετονικά σώματα είναι αυξημένα λόγω της σοβαρής ανεπάρκειας της ινσουλίνης) και 4) βλάβες στο σώμα (βλάβες στο νευρικό σύστημα και τα μικροσκοπικά αιμοφόρα αγγεία των ματιών, των νεφρών και της καρδιάς).

Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 1 περιλαμβάνουν: έντονη δίψα, αυξημένη όρεξη, ξηρότητα στο στόμα, ναυτία και περιστασιακά εμετό, πόνους στην κοιλιά, συχνή ενούρηση, ανεξήγητη απώλεια βάρους, κόπωση και αδυναμία, θολή όραση κ.α. (Steven Levene, Richard Donnelly, 2008, Έκδοση 2<sup>η</sup>, Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2, Εκδόσεις Βήτα).

### **1.1.4 Διαβήτης τύπου 2:**

Η χρόνια υπεργλυκαιμία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2) προκύπτει τελικά ως αποτέλεσμα διαφορετικών και προοδευτικά εξελισσόμενων παθογενειών που προκαλούν: διαταραχές στην ικανότητα των β- κυττάρων του παγκρέατος να εκκρίνουν ινσουλίνη (δυσλειτουργία β- παγκρεατικού κυττάρου) και/ή διαταραχές στην ικανότητα της ινσουλίνης να αναστέλλει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης (γλυκονεογένεση) και να προάγει της γλυκόζης από τους περιφερικούς ιστούς (αντίσταση στην ινσουλίνη).

Στον ΣΔ2, και οι δυο παραπάνω διαταραχές συνυπάρχουν και προκαλούνται από πληθώρα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο ΣΔ2 εμφανίζεται συχνότερα να κληρονομείται ως πολυγονιδιακή νόσος, στην αιτιοπαθογένεια της οποίας συμμετέχουν επίσης περιβαλλοντικοί παράγοντες και αυτό εκδηλώνεται συχνά σε μικρή ηλικία.

Νωρίς στον διαβήτη τύπου 2, τα β κύτταρα αρχίζουν να χάνουν προοδευτικά την ικανότητά τους για άμεση αύξηση της εκκρινόμενης ινσουλίνης (διαταραχή πρώτης φάσης ινσουλινοέκκρισης). Η παρατεταμένη υπεργλυκαιμία μειώνει τη λειτουργικότητα των β κυττάρων ακόμη περισσότερο, με μηχανισμούς «γλυκοτοξικότητας». Η απώλεια της πρώτης φάσης της ινσουλινοέκκρισης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου.

Σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη, η ινσουλίνη δε μπορεί να εκδηλώσει τις συνήθεις δράσεις της σε επίπεδο περιφερικών ιστών, ενώ στις ίδιες συγκεντρώσεις είναι αποτελεσματική στα υγιή άτομα. Η αντίσταση στην ινσουλίνη προηγείται της ανάπτυξης του ΣΔ2 και μπορεί να προκύψει από ποικιλία μεταλλάξεων. Πιστεύεται ότι η ελαττωμένη δράση της ινσουλίνης σχετίζεται στενά με τους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου, όπως είναι η παχυσαρκία (μεταβολικό σύνδρομο, Reaven 1988)

Ο διαβήτης Τύπου 2 συνήθως εξελίσσεται αργά, με τα συμπτώματα και τις επιπλοκές να αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου. Η προβλεπόμενη ραγδαία αύξηση του επιπολασμού του ΣΔ τα προσεχή χρόνια κάνει όλο και πιο επιτακτική την ανάγκη εφαρμογής αποτελεσματικών στρατηγικών πρόληψης της νόσου. Η αγωγή για τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II περιλαμβάνει κυρίως κατάλληλη διατροφή, άσκηση και χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου II περιλαμβάνουν ινσουλίνη, σουλφονουλουρίες, διγουανιδίνες (μετμορφίνη), αναστολείς της α-γλυκοζιτάσης, θειαζολιδινεδιόνες, τα οποία έχουν διαφορετικό τρόπο και στόχο δράσης. (Οικονομάκος, 2001).

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 (Morral 2003).

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 (Οικονομάκος, 2001).

## 1.2 Πρωτεϊνικές Κινάσες

### 1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνικών κινασών:

Οι κινάσες των πρωτεϊνών είναι ένζυμα που συνήθως καταλύουν τη μεταφορά της γ φωσφορικής ομάδας του ATP στην υδροξυλομάδα μιας σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Υπάρχουν πάνω από 518 ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες που αναγνωρίστηκαν δια μέσου των συντηρημένων μοτίβων αλληλουχιών. Αυτές συνιστούν την τρίτη πολυπληθέστερη πρωτεϊνική υπερ-οικογένεια και αντιπροσωπεύουν περίπου το 1,7% του ανθρώπινου γονιδιώματος.

Η κατάταξη των κινασών γίνεται ανάλογα με το αμινοξύ που φωσφορυλιώνουν. Επομένως διακρίνονται σε: α) κινάσες τυροσίνης, β) κινάσες σερίνης/θρεονίνης και γ) κινάσες διπλής εξειδίκευσης που φωσφορυλιώνουν τυροσίνη και σερίνη/θρεονίνη. Στον Πίνακα 1.2 φαίνονται κάποιες από τις κινάσες των πρωτεϊνών που έχουν απομονωθεί καθώς και οι παράγοντές που τις ενεργοποιούν (Krebs, 1985).

**Πίνακας 1.2: Κινάσες των πρωτεϊνών που φωσφορυλιώνουν τα αμινοξέα σερίνη ή θρεονίνη**

Ενεργοποιητές	Ένζυμα
Κυκλικό AMP	Κινάσες των πρωτεϊνών που εξαρτώνται από το κυκλικό AMP (Τύπος I, Τύπος II, Τύπος II')
Κυκλικό GMP	Κινάση των πρωτεϊνών που εξαρτάται από το κυκλικό GMP
Ca <sup>2+</sup> (καλμοντουλίνη)	Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου Κινάση των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης (MLCK) των σκελετικών μυών Κινάση των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης (MLCK) των λείων μυών Πολυλειτουργικές κινάσες των πρωτεϊνών που εξαρτώνται από Ca <sup>2+</sup> - καλμοντουλίνη
Διακυλογλυκερόλη ( Ca <sup>2+</sup> , φωσφολιπίδια)	Κινάση των πρωτεϊνών C
Δίκλωνο RNA	eIF 2 Kinase 1

Οι πρωτεϊνικές κινάσες συσχετίζονται από μια κοινή περιοχή περίπου 250 – 300 αμινοξέων επίσης γνωστή και ως καταλυτική υπομονάδα. Οι καταλυτικές περιοχές των ενζύμων αυτών χωρίστηκαν σε 11 επιμέρους περιοχές ανάλογα με την ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων. Απ' αυτές τις επιμέρους περιοχές, μερικές έχουν χαρακτηριστεί ως «υψηλά διατηρημένες» και είτε αποτελούν μέρος της πρωτοταγούς δομής του ενεργού κέντρου, είτε συμμετέχουν στη διαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής. Οι «λιγότερο διατηρημένες» περιοχές, έχει παρατηρηθεί ότι συντελούν στο σχηματισμό φουρκέτας οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα να φέρνουν κοντά τις «υψηλά διατηρημένες» περιοχές. Έτσι κατανοούμε την σημασία αυτών των περιοχών στη λειτουργία των ενζύμων και στη δομή (Hanks & Hunter, 1995).

### **1.2.2 Μηχανισμοί της ρύθμισης των πρωτεϊνικών κινασών:**

Πολλές από τις πρωτεϊνικές κινάσες έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τη ρύθμιση της δράσης τους από δευτερογενή μηνύματα. Με τον όρο δευτερογενή μηνύματα εννοούμε μια σειρά χημικών (αλλοστερικών) τροποποιητών που βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων και δημιουργούνται (π.χ cAMP) ή απελευθερώνονται (π.χ.  $Ca^{+2}$ ) , μόλις δεχθεί το εξωκυττάριο σήμα είτε από μια ορμόνη είτε από ένα ηλεκτρικό ερέθισμα. Τα δεύτερα μηνύματα δρώντας αλλοστερικά, ενεργοποιούν ή παρεμποδίζουν κινάσες ή φωσφατάσες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την φωσφορυλίωση – αποφωσφορυλίωση μιας σειράς πρωτεϊνών.

Μια άλλη υποκατηγορία κινασών, συμπεριλαμβανομένης και της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ρυθμίζεται από μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 17 kDA , ικανή να δεσμεύει ιόντα ασβεστίου, την καλμοδουλίνη. Όλα τα μέλη της κατηγορίας αυτής έχουν μια περιοχή δέσμευσης της καλμοδουλίνης που χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλογία σε βασικά αμινοξέα και από την τάση δημιουργίας α- έλικας που βρίσκεται κοντά στην καταλυτική περιοχή.

Άλλες πρωτεϊνικές κινάσες ρυθμίζονται μέσω πρόσθετων υπομονάδων των οποίων τα επίπεδα της έκφρασης μεταβάλλονται σε σχέση με τη λειτουργική κατάσταση του κυττάρου (π.χ. η ρύθμιση της κυκλίνης στις εξαρτώμενες από την κυκλίνη πρωτεϊνικές κινάσες, CDKs). Ακόμη, υπάρχουν πρωτεϊνικές κινάσες που υφίστανται αυτό – αναστολή μέσω πρόσθετων περιοχών (π.χ. MLCK ).

Ο πιο σημαντικός ίσως μηχανισμός της δράσης των πρωτεϊνικών κινασών είναι εκείνος της φωσφορυλίωσης. Η φωσφορυλίωση μπορεί να γίνεται μεταξύ ομόλογων και μη ομόλογων κινασών. Ένα παράδειγμα ρύθμισης μεταξύ ομόλογων κινασών είναι η ενεργοποίηση της

κινάσης της φωσφορυλάσης όταν αυτή φωσφορυλιωθεί από την κινάση που εξαρτάται από το κυκλικό cAMP. Η πολυπλοκότητα των συστημάτων που ρυθμίζονται με φωσφορυλίωση δεν εξαρτάται μόνο από τον αριθμό των παραγόντων που επηρεάζουν τις κινάσες αλλά και από τον αριθμό των υποστρωμάτων που οι κινάσες φωσφορυλιώνουν. Άλλες κινάσες πρωτεϊνών έχουν παραπάνω από ένα υποστρώματα όπως η κινάση C, άλλες όμως όπως κινάση της ροδοψίνης φωσφορυλιώνει μόνο ένα υπόστρωμα. Φωσφορυλίωση σε διαφορετικές θέσεις μιας πρωτεΐνης μπορεί να έχει συνεργειακές ή ανταγωνιστικές συνέπειες.

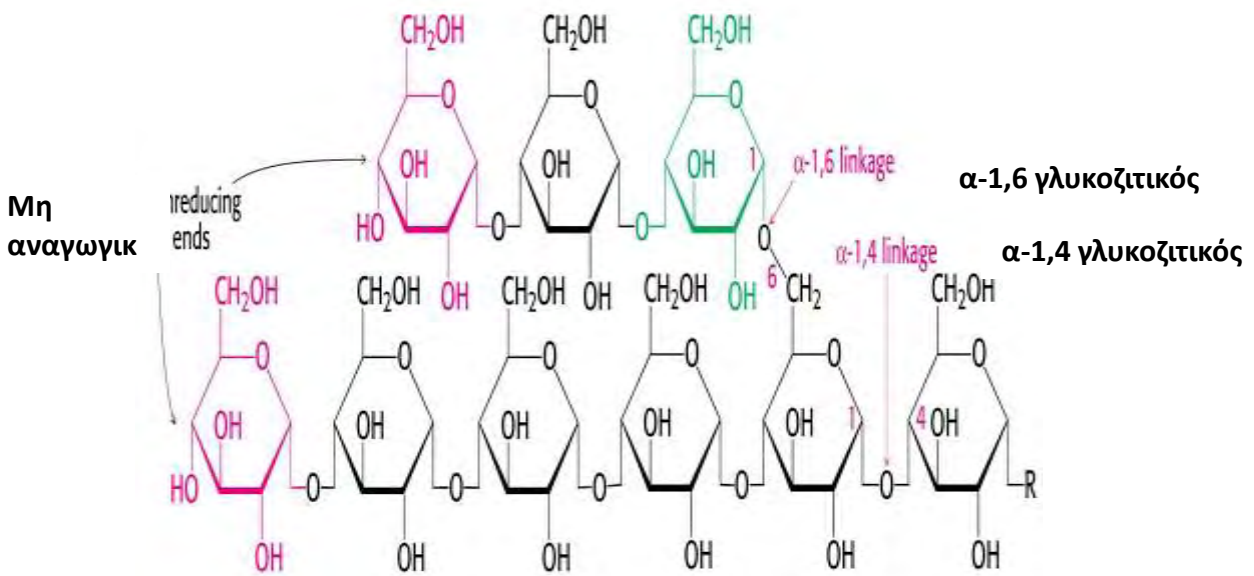
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη ρύθμιση μέσω φωσφορυλίωσης παρουσιάζει το γεγονός ότι τα νουκλεοτίδια φωσφορυλιώνονται σε μια περιοχή που ονομάζεται «τμήμα ενεργοποίησης» και εντοπίζεται στη C-τελική επικράτεια. Η C-τελική επικράτεια περιέχει, όπως προαναφέρθηκε, το «τμήμα ενεργοποίησης» που οριοθετείται μεταξύ των συντηρημένων μοτίβων DFG και APE (Johnson et al., 1996).

Οι κινάσες των πρωτεϊνών χαρακτηρίζονται ακόμη και από την ενδοκυττάρια εντόπισή τους. Άλλες κινάσες θεωρούνται αμιγώς κυτταροπλασματικές (π.χ. οι κινάσες που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου), ενώ άλλες διαπερνούν τη διπλοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι επικοινωνούν με το εσωτερικό ή το εξωτερικό του κυττάρου (π.χ. ο υποδοχέας της ινσουλίνης). Τέλος υπάρχουν και οι περιπτώσεις των αμφιτροπικών κινασών, όπως αυτή της κινάσης C που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και ανάλογα με τις ενδοκυττάρειες συνθήκες μεταφέρεται στις μεμβράνες.

## **1.3 Μεταβολισμός του γλυκογόνου**

### **1.3.1 Γλυκογόνο:**

Το γλυκογόνο είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης διακλαδισμένο και αποτελεί εναποθηκευμένη μορφή ενέργειας για τις απαιτήσεις των μυϊκών κυττάρων. Τα μόρια γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς στις κύριες αλυσίδες, ενώ ο διακλαδωσείς δημιουργούνται με  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, περίπου σε κάθε δέκατο μόριο κατά μήκος της γλυκογονικής αλυσίδας (Stryer, 1997). (Εικόνα 2)



**Εικόνα 2:** Δομή δυο εξωτερικών διακλαδώσεων του γλυκογόνου. Το υπόλοιπο του μορίου συμβολίζεται με R.

Στα θηλαστικά, τα δυο μεγαλύτερα κέντρα εναποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες. Το γλυκογόνο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων από ιστό ήπατος ή γραμμωτών μυών με μορφή κόκκων διαμέτρου 100 – 400 Å. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ’ ότι στους μύς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο ( Stryer 1997).

### 1.3.2 Βιοσύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου:

Η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου, στους σκελετικούς μύες, ελέγχονται με συντονισμένη ρύθμιση. Έχει διαπιστωθεί ότι ο μεταβολισμός του γλυκογόνου επηρεάζεται

από την επίδραση ειδικών ορμονών που συνδέονται στους κατάλληλους κυτταρικούς υποδοχείς καθώς και μέσω νευρικών ώσεων που ενεργοποιούν διαδικασίες παραγωγής ενέργειας για τη μυϊκή συστολή. Η ανδρεναλίνη, π.χ. προκαλεί αύξηση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου ενώ αντίθετα η ινσουλίνη προκαλεί αύξηση της σύνθεσης του γλυκογόνου (Cohen, 1976, 1983α).

Όταν οι ορμόνες αυτές συνδέονται με τους υποδοχείς που βρίσκονται στη μεμβράνη των μυϊκών κυττάρων, ενεργοποιείται το σύστημα της αδενυλικής κυκλάσης που καταλύει το σχηματισμό του κυκλικού AMP από ATP. Το κυκλικό AMP, που θεωρείται δευτερογενές μήνυμα, ενεργοποιεί αλλοστερικά την κινάση των πρωτεϊνών με τη σύνδεσή του στη ρυθμιστική υπομονάδα του ενζύμου (R). Με αυτό τον τρόπο απελευθερώνεται η καταλυτική υπομονάδα του ίδιου ενζύμου που είναι έτσι ενζυμικά ενεργή (C). Έτσι καταλύεται η φωσφορυλίωση του ενζύμου κινάση της φωσφορυλάσης, γεγονός που μετατρέπει το ένζυμο στην ενεργό του μορφή. Η ενεργός μορφή της κινάσης της φωσφορυλάσης καταλύει τη φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ευνοώντας έτσι τη διάσπαση του γλυκογόνου από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

Το πρώτο στάδιο αποικοδόμησης του γλυκογόνου καταλύεται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Το ένζυμο αυτό διασπά τους 1,4- γλυκοζιτικούς δεσμούς απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη σύμφωνα με την αντίδραση:



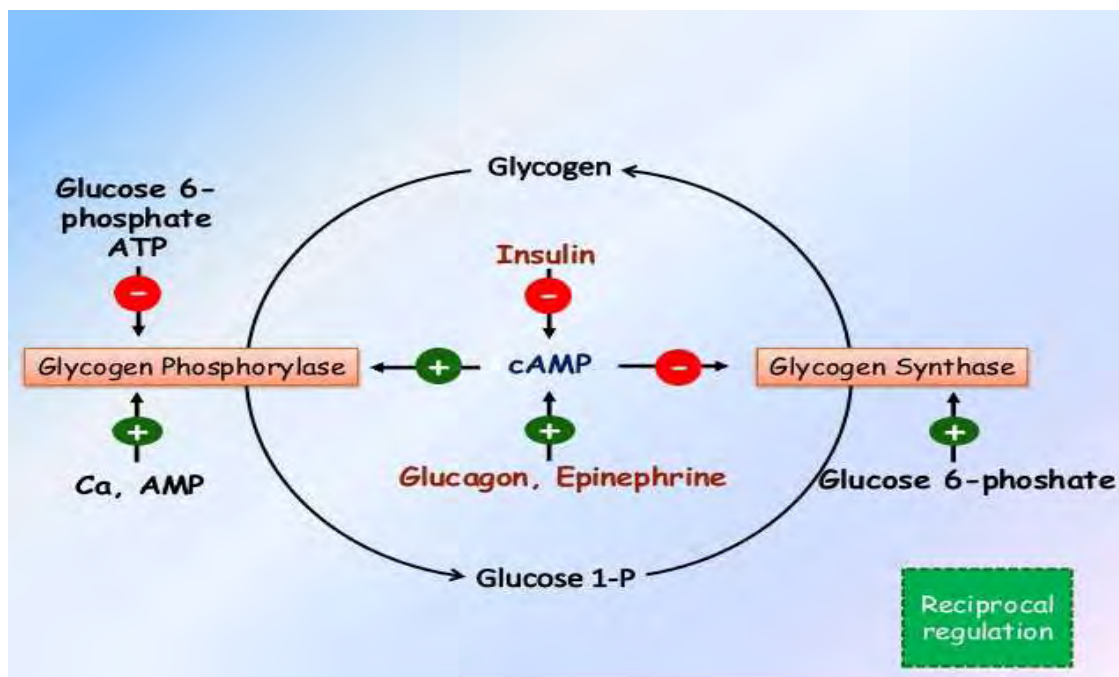
Υπάρχει σε δυο μορφές την α (φωσφορυλιωμένη, ενεργή) και την β (μη φωσφορυλιωμένη, ανενεργή). Η φωσφορυλάση από μυϊκό ιστό κουνελιού αποτελείται από δυο όμοιες υπομονάδες με  $M_w=97,4$  kDA η κάθε μία. Η μετατροπή της β σε α γίνεται με φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης από την κινάση της φωσφορυλάσης, δηλαδή με μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP στη σερίνη 14 στο αμινοτελικό άκρο (Shizuta et al., 1977).

Η ορμονική όμως ρύθμιση του γλυκογόνου δεν αποτελεί τον μοναδικό τρόπο ελέγχου της μεταβολικής οδού. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου υπόκειται και σε νευρική ρύθμιση. Η



ρύθμιση αυτή επιτυγχάνεται με την απελευθέρωση ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  από το σαρκοπλάσματικό δίκτυο μετά τον ηλεκτρικό ερεθισμό του μυός. (Cohen, 1983α). Τα ελεύθερα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  επιτρέπουν τη σύνδεση του μορίου κινάσης της φωσφορυλάσης με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη καλμοντουλίνη, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου. Έτσι ενεργοποιείται η φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία οδηγεί σε γλυκογονόλυση.

Η σύνθεση του γλυκογόνου από γλυκόζη πραγματοποιείται κάτω από τον έλεγχο της συνθάσης του γλυκογόνου, η οποία είναι υπόστρωμα της κινάσης της φωσφορυλάσης (Cohen, 1991). Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) φωσφορυλιώνει τη συνθάση του γλυκογόνου, γεγονός που οδηγεί στην αναστολή της. Κατανοούμε, λοιπόν ότι η PhK ενεργοποιεί τη διάσπαση του γλυκογόνου ενώ ταυτόχρονα μπορεί να αναστείλει τη σύνθεσή του. Στην παρακάτω εικόνα διαφαίνεται ο μεταβολισμός του γλυκογόνου από ορμονικά και νευρικά ερεθίσματα.



Εικόνα 3: Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου και ο ρόλος της κινάσης της φωσφορυλάσης.

Τα δεδομένα αυτά στηρίζουν την υπόθεση ότι, σημαντικές μεταβολικές οδοί ελέγχονται από κινάσες των πρωτεϊνών, φωσφατάσες και ρυθμιστικές πρωτεΐνες, δημιουργώντας έτσι ένα

ενιαίο δίκτυο που ρυθμίζει τις μεταβολικές οδούς, δια μέσω του οποίου ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες συντονίζονται από νευρικά και ορμονικά ερεθίσματα.

## 1.4 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

### 1.4.1 Γενικά:

Η κινάση της φωσφορυλάσης είναι το ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου β (ανενεργός μορφή) σε φωσφορυλάση α (ενεργός μορφή). Η μετατροπή αυτή γίνεται με φωσφορυλίωση παρουσία ATP και ιόντων  $Ca^{2+}$  μιας ειδικής σερίνης (σερίνη 14) σε κάθε υπομονάδα της φωσφορυλάσης.

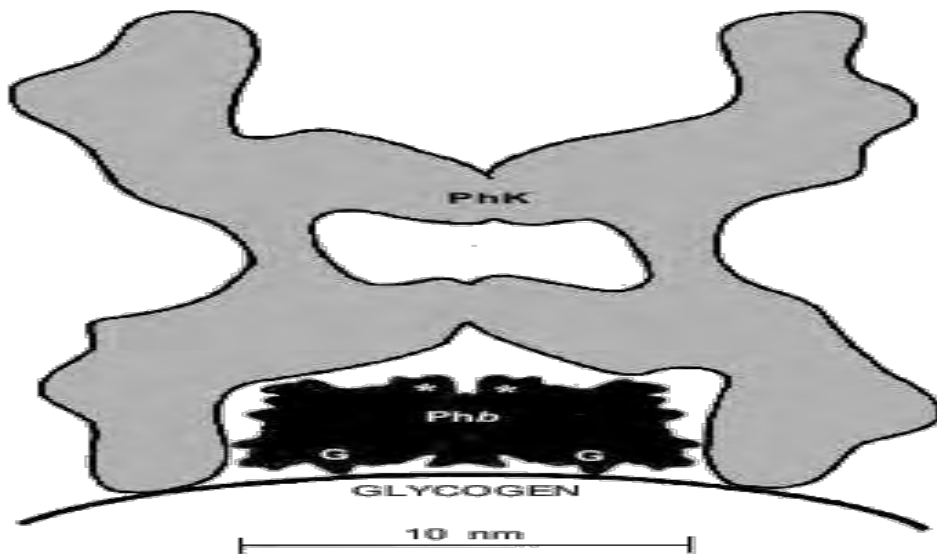
Η ύπαρξη δραστηριότητας κινάσης της φωσφορυλάσης έχει διαπιστωθεί σε ομογενοποιημένα κυττάρων διαφόρων ιστών. Από τους Taira et al. (1982) αναφέρεται η ύπαρξη δραστηριότητας σε σκελετικούς μύες, συκώτι, καρδιά, εγκέφαλο, σπλήνα, πνεύμονα και όρχεις ποντικών. Ακόμα οι Sacktor et al., αναφέρουν την ύπαρξη του ενζύμου στους μύες φτερών μύγας, ενώ ο Kuo (1976) στο λιπώδη ιστό κοτόπουλου. Όμως οι περισσότερες κινητικές και δομικές μελέτες έχουν γίνει στην κινάση της φωσφορυλάσης που απομονώνεται από σκελετικούς μύες κουνελιού.

Η κινάση της φωσφορυλάσης από σκελετικούς μύες κουνελιού εμφανίζει πολυπλοκότερη δομή συγκριτικά με τα περισσότερα ρυθμιστικά ένζυμα. Έχει μοριακό βάρος 1.3 MDa (Cohen, 1973) και αποτελείται από τέσσερις τύπους υπομονάδων α,β,γ,δ με στοιχειομετρία δεκαεξαμερούς  $(\alpha,\beta,\gamma,\delta)_4$ . Τα μοριακά βάρη των επιμέρους υπομονάδων υπολογίζονται κατά προσέγγιση και είναι τα εξής:  $\alpha=134,8$  kDa,  $\beta=125,2$  kDa,  $\gamma=44,7$  kDa,  $\delta=17,7$  kDa (Picket-Gies and Walsh, 1986). Η  $\gamma$  υπομονάδα είναι η καταλυτική η οποία αλληλεπιδρά με την  $\delta$  υπομονάδα που είναι παρόμοια με την καλμοδουλίνη και μπορεί να συνδέει μόρια ασβεστίου προσδίδοντας στο ένζυμο ευαισθησία στις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις ασβεστίου. Οι  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδες είναι ρυθμιστικές και υφίστανται πολλαπλές φωσφορυλιώσεις (Cohen 1973). Τέλος η  $\delta$  υπομονάδα, η οποία είναι θερμοσταθερή, απομονώνεται με θερμική αποδιάταξη

του ενζύμου, ενώ οι αποδιατεταγμένες μορφές των υπομονάδων α και β έχουν απομονωθεί με υψηλή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) (Crabb & Heilmeyer, 1984).

#### 1.4.2 Δομή της κινάσης της φωσφορυλάσης:

Όπως ήδη προαναφέρθηκε η κινάση της φωσφορυλάσης έχει μοριακό βάρος 1.3 MDa (Cohen, 1973) και αποτελείται από τέσσερις τύπους υπομονάδων α,β,γ,δ με στοιχειομετρία δεκαεξαμερούς (α,β,γ,δ)<sub>4</sub>. Σύμφωνα με αυτό, οι υπομονάδες α και β ανευρίσκονται στην περιφερειακή μοίρα του μορίου του ενζύμου, ενώ οι υπομονάδες γ και δ θεωρείται ότι βρίσκονται στην κεντρική μοίρα. Οι υπομονάδες α και β συνδέονται μεταξύ τους και με την γ υπομονάδα ενώ η δ υπομονάδα συνδέεται μόνο με τη γ υπομονάδα. Η υπομονάδα δ' είναι ταυτόσημη με την υπομονάδα δ και μπορεί να προστεθεί εξωγενώς στην πλήρη δομή (αβγδ)<sub>4</sub> του ενζύμου. Στο ισόενζυμο των κόκκινων σκελετικών μυών κουνελιού η α υπομονάδα αντικαθίσταται από μια συγγενή της υπομονάδα την α' (Jenissen et al. , 1980). Από τους Cohen 1974 και Yeaman et al. 1975 αναφέρθηκε αρχικά ότι το μόριο του ενζύμου έχει σχήμα που μοιάζει με πεταλούδα, δηλαδή το σχήμα δυο μεγάλων περιοχών που συνδέονται μεταξύ τους με μια στενή γέφυρα. Αργότερα, οι Jenissen et al.(1981)και Schramm et al.(1982) εξακρίβωσαν την ύπαρξη και μιας άλλης μορφής του μορίου του ενζύμου που έχει σχήμα κυπέλου.



**Εικόνα 4: Απεικόνιση του μορίου της κινάσης της φωσφορυλάσης.** Η PhB είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, G είναι οι περιοχές αποθήκευσης του γλυκογόνου στο μόριο της PhB και η περιοχή όπου τα κατάλοιπα της Ser-14 φωσφορυλιώνονται συμβολίζονται με αστερίσκο.

Αργότερα οι King et al.(1981 α,β, 1982) υποστήριζαν ότι στο μόριο του ενζύμου υπάρχουν δυο τύποι καταλυτικών κέντρων. Ο ένας είναι ο τύπος που είναι υπεύθυνος για τη φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης b και της συνθετάσης του γλυκογόνου και ο άλλος είναι υπεύθυνος για τη φωσφορυλίωση της τροπονίνης I και της τροπονίνης T.

Ακόμη οι Σωτηρούδης και Νικολαρόπουλος (1984), χρησιμοποιώντας έναν ιχνηθέτη που φθορίζει με δομή ανάλογη του νουκλεοτιδίου ATP, εξακρίβωσαν την εκλεκτική πρόσδεσή του στις υπομονάδες α και α' του ενζύμου. Από τους συγγραφείς προτάθηκε ότι η α και α' υπομονάδες του ενζύμου περιλαμβάνουν κάποια καταλυτική περιοχή.

Σχετικά πρόσφατες μελέτες (Owen et al., 1995) κατέληξαν στην κρυστάλλωση της υπομονάδας γ του σκελετικού ισοενζύμου αναλύοντας τη δομή της πρωτεΐνης σε ευκρίνεια 2.5 Å.

### **1.4.3 Ιδιότητες των υπομονάδων γ και δ της κινάσης της φωσφορυλάσης:**

Η υπομονάδα γ της κινάσης της φωσφορυλάσης έχει μοριακό βάρος  $M_w=44,7$  kDa (σύνολο 386 αμινοξέα) έχει καταλυτική δράση από μόνη της και αποτελείται από 386 αμινοξέα. Το καταλυτικό κέντρο τοποθετείται στην περιοχή του αμινοτελικού άκρου του μορίου (περιοχή που αποτελείται από τα αμινοξέα  $\gamma_{20-276}$ ) ( Huang et al., 1993), ενώ το τμήμα του

καρβοξυτελικού άκρου (περιοχή  $\gamma_{287-386}$ ), θεωρείται το ρυθμιστικό κέντρο της υπομονάδας καθώς έχουν βρεθεί 2 περιοχές σύνδεσης με την καλμοντουλίνη, που δρουν αυτοανασταλτικά στη δραστικότητα της υπομονάδας  $\gamma$  (Dasgupta & Blumenthal, 1995). Οι δυο θέσεις σύνδεσης της καταλυτικής υπομονάδας με καλμοντουλίνη εξηγούν την πιθανώς ισχυρή σύνδεση των υπομονάδων  $\gamma$  και  $\delta$ . Η περιοχή σύνδεσης με την καλμοντουλίνη αποτελείται από μια  $\alpha$  έλικα με βασικά υδρόφιλα αμινοξέα από την μια πλευρά και υδρόφοβα από την άλλη πλευρά.

Η υπομονάδα  $\delta$  της κινάσης της φωσφορυλάσης από μυϊκό ιστό κουνελιού έχει μοριακό βάρος  $M_w=17.7$  kDa, αποτελείται από 148 αμινοξέα και είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση των ιόντων  $Ca^{2+}$  στο μόριο της κινάσης της φωσφορυλάσης. Στο αμινοτελικό άκρο του μορίου υπάρχει μια ακετυλομάδα ενώ το αμινοξύ 115 είναι μια τριμεθυλολυσίνη (Grand et al., 1981). Στην καλμοντουλίνη (υπομονάδα  $\delta$ ) υπάρχει μια κεντρική περιοχή  $\alpha$  έλικας που συνδέει δυο σφαιρικές περιοχές σύνδεσης  $Ca^{2+}$  και η ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφορυλάσης γίνεται με τη δέσμευση των θέσεων με  $Ca^{2+}$  (Cohen et al., 1978, Kretsinger et al., 1986, Burger et al., 1982). Πιο συγκεκριμένα η σύνδεση ενός μορίου  $Ca^{2+}$  σε κάθε ένα από τα κέντρα σύνδεσης του  $Ca^{2+}$  εκθέτει τις υδρόφοβες περιοχές της καλμοντουλίνης οι οποίες είναι πλούσιες σε μεθειονίνη. Στην κινάση της φωσφορυλάσης η υπομονάδα  $\delta$  συνδέεται και αλληλεπιδρά με την υπομονάδα  $\gamma$  ακόμα και όταν απουσιάζει το  $Ca^{2+}$  (Yuan and Graves, 1989). Εκτός της ενδογενούς καλμοντουλίνης που έχει αποδειχθεί ότι είναι ρυθμιστική υπομονάδα του ενζύμου, η κινάση της φωσφορυλάσης ενεργοποιείται και με την προσθήκη της εξωγενούς καλμοντουλίνης ( $\delta'$ ), η οποία παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  προκαλεί αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου 2-7 φορές (Cohen, 1980).

#### **1.4.4 Οι ιδιότητες των υπομονάδων $\alpha$ και $\beta$ της κινάσης της φωσφορυλάσης:**

Ο ρόλος των υπομονάδων  $\alpha$  και  $\beta$  του ολοενζύμου είναι ρυθμιστικός. Οι  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδες παρουσιάζουν ομολογία και μάλλον προήλθαν εξελικτικά από ένα κοινό προγονικό γονίδιο (Kilimann et al., 1988). Η φωσφορυλίωση των  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδων (Hayakawa et al., 1976,

Carlson & Graves, 1976), η περιορισμένη θρυψινόλυση έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου. Επιπλέον όταν στην απομονωμένη υπομονάδα  $\gamma$ , ή στο σύμπλοκο  $\gamma\delta$  προστεθεί μίγμα υπομονάδων  $\alpha$  και  $\beta$ , η δραστηριότητα αναστέλλεται. Η αναστολή αυτή είναι μικρότερη όταν οι προστιθέμενες υπομονάδες  $\alpha$  και  $\beta$  έχουν προηγουμένως φωσφορυλιωθεί (Paudel & Carlson, 1987). Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι οι υπομονάδες  $\alpha$  και  $\beta$  ρυθμίζουν αρνητικά μέσω ενός μηχανισμού αναστολής (Paudel & Carlson, 1987).

Η υπομονάδα  $\alpha$  που απομονώθηκε από σκελετικό μυϊκό ιστό κουνελιού αποτελείται από 1237 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος  $M_w=134,8$  kDa (Zander et al., 1988). Η υπομονάδα  $\alpha$  είναι ένα υδρόφιλο μόριο με ουδέτερο συνολικό φορτίο. Η υπομονάδα  $\alpha$  περιλαμβάνει ένα τουλάχιστον κέντρο σύνδεσης του ATP λόγω της ομοιοπολικής σύνδεσης μιας περιοχής της υπομονάδας με το ανάλογο του ATP, την ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) (Sotiroudis & Nikoliaropoulos, 1984), ενώ έχει επίσης δυο κέντρα σύνδεσης εξωγενούς καλμοντουλίνης (Heilmeyer et al., 1993). Είναι φωσφοπρωτεΐνη (περιέχει τρία φωσφορυλιωμένα αμινοξέα σερίνης) και έχει τουλάχιστον 7 θέσεις φωσφορυλίωσης. Με την αυτοφωσφορυλίωση φωσφορυλιώνεται σε τρία επιπλέον αμινοξέα σερίνης. Τέλος η σερίνη 1018 φωσφορυλιώνεται από την cAMP-PrK (Zander et al., 1988).

Η υπομονάδα  $\beta$  που απομονώθηκε και αυτή από μυϊκό ιστό κουνελιού έχει μοριακό βάρος  $M_w=125$  kDa και αποτελείται από 1093 αμινοξέα. Η υπομονάδα  $\beta$  έχει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης κάποιες από τις οποίες αυτοφωσφορυλιώνονται από την κινάση της φωσφορυλάσης ενώ η Ser26 φωσφορυλιώνεται από την cAPK (Kiliman et al., 1988). Οι περιοχές φωσφορυλίωσης των υπομονάδων  $\alpha$  και  $\beta$  της κινάσης της φωσφορυλάσης δε παρουσιάζουν ομολογία ως προς την πρωτοταγή δομή τους (Brushia & Walsh, 1999).

### 1.4.5 Υποστρώματα- Ρύθμιση της δράσης της σκελετικής κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου:

**Υποστρώματα:** Η μόνη αντίδραση για την οποία έχει αποδεχθεί ότι καταλύεται *in vivo* από την κινάση της φωσφορυλάσης, είναι η φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης b. Ωστόσο, έχει δειχθεί, ότι τουλάχιστον *in vitro* η κινάση της φωσφορυλάσης μπορεί να φωσφορυλιώσει και άλλες πρωτεΐνες όπως: τη συνθετάση του γλυκογόνου, την κινάση της φωσφορυλάσης (αυτοφωσφορυλίωση), την τροπονίνη I, την τροπονίνη Τα, την Na<sup>+</sup>, την ATPάση μεταφοράς Ca<sup>2+</sup> στο σαρκοπλασματικό δίκτυο, την κ-καζεΐνη, την ελαφριά αλυσίδα της μυοσΐνης, τη βασική πρωτεΐνη της μυελΐνης, μια 93 kDa πρωτεΐνη που βρίσκεται στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων, τις πρωτεΐνες του εγκεφάλου B-50 (Pickett-Gies & Walsh, 1986, Carlson et al., 1979, Malencic & Fischer, 1982, Chan & Graves, 1984, Sclender et al., 1988, Sotiroudis et al., 1991, Paudel et al., 1993, Paudel et al., 1997). Σε όλες τις προαναφερόμενες περιπτώσεις η φωσφορυλίωση γίνεται σε μια σερίνη. Εξάιρεση αποτελεί η τροπονίνη που η φωσφορυλίωση της από την κινάση της φωσφορυλάσης γίνεται σε μια θρεονΐνη.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα από τα κύρια υποστρώματα της κινάσης της φωσφορυλάσης *in vivo*. Το ένζυμο αυτό διασπά τους 1,4- γλυκοζιτικούς δεσμούς απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη σύμφωνα με την αντίδραση:

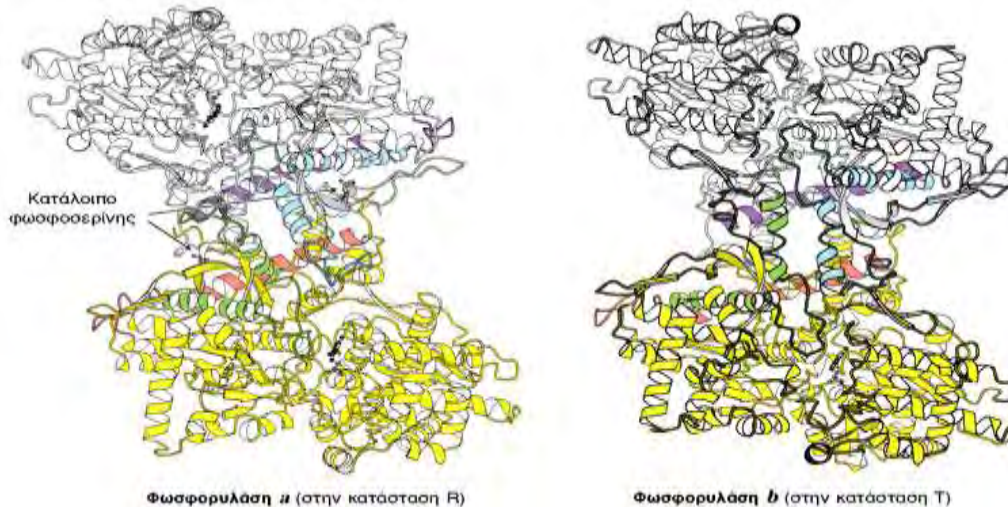


Η GP είναι μια ομοδιμερή πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξΐνης (βιταμΐνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσΐνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου. Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορύλωσης 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.

Υπάρχει σε δυο μορφές την a (φωσφορυλιωμένη, ενεργή) και την b (μη φωσφορυλιωμένη, ανενεργή). Η φωσφορυλάση από μυϊκό ιστό κουνελιού αποτελείται από δυο όμοιες υπομονάδες με  $M_w=97,4$  kDA η κάθε μία. Η μετατροπή της b σε a γίνεται με φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης από την κινάση της φωσφορυλάσης, δηλαδή με μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP στο 14<sup>ο</sup> αμινοξύ του αμινοτελικού άκρου που είναι σερίνη. Η αντιστρεπτή διαδικασία απενεργοποίησης του ενζύμου μέσω αποφωσφορυλίωσης καταλύεται από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (Gratecos et al., 1977). 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 5). 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.(Stryer, 1997).

Η κατάσταση T σταθεροποιείται από τη σύνδεσή του ATP, της γλυκόζης, της καφεΐνης και της 6 φωσφορικής γλυκόζης ενώ η διαμόρφωση R σταθεροποιείται από AMP και υποστρωμάτων. (Johnson et al., 1989, Johnson, 1992, Οικονομακος et al., 1992).





**Εικόνα 5: 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 ρύθμιση 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.

### Ρύθμιση της δράσης της PhK:

**Εξάρτηση από το PH:** Η ανενεργός κινάση της φωσφορυλάσης από σκελετικό μυϊκό ιστό έχει μικρή δραστηριότητα σε pH 7.0 λόγω της μικρής συγγένειάς της ως προς τη φωσφορυλάση b. Η καμπύλη της δραστηριότητας της ανενεργούς μορφής συναρτήσκει του pH παρουσιάζει αρχικά υστέρηση (pH 6.0 -6.8) και στη συνέχεια αυξάνεται γραμμικά μέχρι και pH 8.5 (King & Carlson, 1981). Η κατάσταση του ενζύμου χαρακτηρίζεται συνήθως από το λόγο των ειδικών δραστηριοτήτων σε pH 6.8/8.2 (Chan & Graves, 1984). Οι λόγοι των δραστηριοτήτων για την κινάση της φωσφορυλάσης από άλλους ιστούς, δε συμπίπτουν πάντα με αυτούς της κινάσης της φωσφορυλάσης από σκελετικό μυϊκό ιστό κουνελιού.

**Επίδραση των ιόντων δισθενών μετάλλων ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ):** Ο μηχανισμός με τον οποίο τα ιόντα  $Ca^{2+}$  ρυθμίζουν τη δράση της κινάσης της φωσφορυλάσης είναι αλλοστερικός. Με άλλα λόγια τα ιόντα  $Ca^{2+}$  δε συμμετέχουν άμεσα στην κατάλυση. Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η υπομονάδα γ, σε καθαρή κατάσταση, δεν εξαρτάται από  $Ca^{2+}$ . Η ενεργοποίηση του ενζύμου από ασβέστιο προϋποθέτει την κατάληψη τριών τουλάχιστον από τα τέσσερα κέντρα σύνδεσης  $Ca^{2+}$  της υπομονάδας δ (Burger et al., 1982, 1983). Πλήρης δραστηριότητα του ενζύμου εμφανίζεται σε συγκέντρωση  $Ca^{2+}$  της τάξης των  $10^{-6}$  M, ενώ σε μεγαλύτερες

συγκεντρώσεις ( $10^{-3}$  M) παρατηρείται αναστολή της δραστηριότητας (Ozawa, 1967). Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο σαν σύμπλοκο  $MgATP$ , όπως επίσης και στη δ υπομονάδα. Η καλμοντουλίνη, σε καθαρή κατάσταση δεσμεύει  $Mg^{2+}$  στα κέντρα σύνδεσης  $Ca^{2+}$ , αν και τα ιόντα  $Ca^{2+}$  παρουσιάζουν ισχυρότερη σύνδεση. Και τα δυο ιόντα αντιδρούν με την καλμοντουλίνη σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, που είναι οι ίδιες συγκεντρώσεις που επηρεάζουν και την κινάση.

**Ομοιοπολική τροποποίηση με φωσφορυλίωση:** Ο σημαντικότερος ίσως μηχανισμός ρύθμισης της δράσης της κινάσης της φωσφορυλάσης είναι αυτός της φωσφορυλίωσης. Η κινάση της φωσφορυλάσης είναι μια φωσφοπρωτεΐνη στην ανενεργό της μορφή, δηλαδή στο μόριο του ενζύμου υπάρχουν φωσφορικές ομάδες (συνδεδεμένες σε αμινοξέα σερίνης) (Meyer et al., 1990). Ως προς την ακριβή περιεκτικότητα σε φωσφορικές ομάδες οι απόψεις δίστανται με πιθανότερη εκδοχή την αναλογία 8 mol φωσφορικών ομάδων ανά 1 mol δεκαεξαμερούς  $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$  (από τις οποίες οι τρεις βρίσκονται στην υπομονάδα  $\alpha$ ). Η απόσπαση αυτών των ενδογενών φωσφορικών ομάδων είναι αδύνατη και πιστεύεται ότι ο ρόλος τους είναι ρυθμιστικός και δομικός (Kiliman et al., 1984). Η ομοιοπολική τροποποίηση οδηγεί σε ενεργοποίηση του ενζύμου της κινάσης της φωσφορυλάσης. Μέχρι σήμερα έχει αναφερθεί ένας μεγάλος αριθμός κινασών των πρωτεϊνών που καταλύουν τη φωσφορυλίωση της κινάσης της φωσφορυλάσης ο οποίος περιλαμβάνει: τη cAMP-PrK, τη κινάση των πρωτεϊνών που εξαρτάται από cGMP, μια πολυλειτουργική κινάση που εξαρτάται από ασβέστιο και καλμοντουλίνη, πιθανώς την κινάση C των πρωτεϊνών και την ίδια την κινάση της φωσφορυλάσης (αυτοφωσφορυλίωση) (Carlson et al., 1979, Malencik & Fischer, 1982, Chan & Graves, 1984, Pickett-Gies & Walsh, 1986). Η κινάση της φωσφορυλάσης (σε όλες τις περιπτώσεις) φωσφορυλιώνεται στις υπομονάδες  $\alpha$  και  $\beta$ .

Η φωσφορυλίωση από την καταλυτική υπομονάδα C της cAMP-PrK έχει μελετηθεί περισσότερο από τις άλλες περιπτώσεις κινασών και οδηγεί στη φωσφορυλίωση αρχικά της υπομονάδας  $\beta$  της κινάσης της φωσφορυλάσης και στη συνέχεια της υπομονάδας  $\alpha$  (Yeaman et al., 1977). Ο μηχανισμός λειτουργεί ανεξάρτητα από την παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  και δεν επηρεάζεται από το pH (Walsh et al., 1971).

Η αντίδραση της αυτοφωσφορυλίωσης γίνεται παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  (Krebs et al., 1959, 1964, Wang et al., 1976), σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων ιόντων  $Mg^{2+}$  (10 mM) και ATP (3 mM) σε pH 6.8 και έχει σαν αποτέλεσμα την προσθήκη δεκατεσσάρων επιπλέον φωσφορικών ομάδων ανά τετραμερές  $\alpha\beta\gamma\delta$  (Kiliman et al., 1984). Κατά την αντίδραση της αυτοφωσφορυλίωσης αρχικά φωσφορυλιώνεται η υπομονάδα  $\beta$  και μετά η υπομονάδα  $\alpha$  του ενζύμου (Singh et al., 1977). Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η φωσφορυλίωση της υπομονάδας  $\beta$  του ενζύμου μπορεί να σχετιστεί με την ενεργοποίησή του (Kings et al., 1983). Η

περιοχή της υπομονάδας β που φωσφορυλιώνεται με αυτό τον τρόπο (DeLang et al., 1968) είναι ίδια με την περιοχή που φωσφορυλιώνεται από την cAMP-PrK. Η ποσότητα του φωσφόρου που προστίθεται είναι υψηλότερη από την προαναφερόμενη περίπτωση (Kiliman et al., 1982).

**Ομοιοπολική τροποποίηση με πρωτεόλυση:** Η επίδραση των πρωτεολυτικών ενζύμων (θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, παπαΐνη) στην κινάση της φωσφορυλάσης έχει ως αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή μεταβολή του ενζύμου. Ειδικότερα η περιορισμένη επίδραση της θρυψίνης στο μόριο της κινάσης της φωσφορυλάσης οδηγεί στην καταστροφή αρχικά των υπομονάδων α και στην συνέχεια των β του ενζύμου, ενώ οι υπομονάδες γ και δ παραμένουν ανέπαφες (Cohen, 1973). Η μερικώς πρωτεολυμένη κινάση της φωσφορυλάσης εμφανίζει πολύ υψηλή δραστηριότητα σε pH 6.8, ενώ αντίθετα η πρωτεόλυση δεν επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα σε pH 8.2. Έτσι εξηγείται και ο αυξημένος λόγος δραστηριοτήτων pH 6.8/8.2 της πρωτεολυμένης κινάσης που αναφέρθηκε προηγουμένως. Η ενεργοποίηση αυτή ενισχύει την υπόθεση, ότι η υπομονάδα γ είναι καταλυτική και οι α και β είναι ρυθμιστικές. Η θρυψινόλυση του ενζύμου παύει την εξάρτησή του από την εξωγενή καλμοντουλίνη και την τροπονίνη C και ελαττώνει την εξάρτησή του από τα ιόντα  $Ca^{2+}$ .

**Επίδραση καλμοντουλίνης- τροπονίνης C:** Η εξωγενής καλμοντουλίνη που αναφέρεται σαν υπομονάδα δ' συνδέεται παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$ , στο μόριο της κινάσης και προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου 2-10 φορές (Cohen, 1980). Η ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφορυλάσης από την εξωγενή καλμοντουλίνη δε φαίνεται να έχει φυσιολογική σημασία. Οι συγκεντρώσεις της καλμοντουλίνης στους σκελετικούς μύες δε φαίνεται να επαρκούν για να ενεργοποιήσουν την κινάση της φωσφορυλάσης (Picton et al., 1981).

Η τροπονίνη C όταν προστίθεται στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της κινάσης της φωσφορυλάσης, παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  αυξάνει σημαντικά τη δραστηριότητα του ενζύμου σε pH 6.8 ή 8.2. Όπως και η καλμοντουλίνη έτσι και η τροπονίνη C δεν επηρεάζει τις ενεργοποιημένες (με φωσφορυλίωση ή με πρωτεόλυση) μορφές του ενζύμου. Η απαιτούμενη συγκέντρωση τροπονίνης C είναι αρκετά υψηλότερη από την απαιτούμενη συγκέντρωση της καλμοντουλίνης, ωστόσο η μέγιστη ενεργοποίηση που επιτυγχάνεται παρουσία τροπονίνης C είναι μεγαλύτερη (ενεργοποίηση κατά 20-30 φορές περίπου) (Cohen, 1980). Η τροπονίνη C μάλλον ρυθμίζει τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή, ενώ η καλμοντουλίνη τη φωσφορυλιωμένη μορφή της κινάσης (Cohen, 1980). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$  που απαιτούνται για την ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφορυλάσης από την τροπονίνη C, βρίσκονται πιο κοντά στα φυσιολογικά όρια από τις συγκεντρώσεις  $Ca^{2+}$  που απαιτεί η

εξωγενής καλμοντουλίνη. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν τους Picton et al.(1981) να υποστηρίζουν ότι η επίδραση της τροπονίνης C στην κινάση της φωσφορυλάσης έχει φυσιολογική σημασία.

**Αλληλεπίδραση με γλυκογόνο:** Ένα σημαντικό ποσοστό της κινάσης της φωσφορυλάσης αλλά και άλλων ενζύμων του μεταβολισμού του γλυκογόνου βρίσκονται συνδεδεμένα με σωματίδια γλυκογόνου. Οι μελέτες που έχουν γίνει με τη χρησιμοποίηση είτε κινάσης της φωσφορυλάσης σε καθαρή κατάσταση (DeLange et al., 1968, Heilmeyer et al., 1970, Meyer et al., 1970) δείχνουν ότι η κινάση της φωσφορυλάσης μπορεί να συνδεθεί *in vitro* με το γλυκογόνο και ότι η σύνδεση αυτή εξαρτάται από ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$ . Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι παρουσία γλυκογόνου αυξάνεται η δραστηριότητα της κινάσης της φωσφορυλάσης. Η αύξηση αυτή αποδίδεται είτε στην αλληλεπίδρασή του με τη φωσφορυλάση (Tabatai & Graves, 1978) είτε στην αλλαγή του βαθμού εξάρτησης της κινάσης από τα ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  παρουσία γλυκογόνου (Heilmeyer et al., 1970).

## 2.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ:

### 2.1 Καθαρισμός της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από μυϊκό ιστό κουνελιού:

#### Υλικά:

- Κουνέλια (2 μετρίου μέγεθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου 50:50:1 pH 6.8 ( 50 mM β- φωσφογλυκερόλης, 50 mM β- μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT- διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου αναθρακικού καλίου ( $\text{KHCO}_3$ )
- Διάλυμα οξικού οξέος 1 N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris ( τρις- (υδροξυμέθυλο)- αμινομεθανίου) /HCl 0.001 M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0 M
- Διάλυμα β- μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M (pH 7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο – διαμινο -τετραοξικού οξέος) 0.1 M ( pH 7.0)
- Διάλυμα AMP (5' – φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1 M , pH 7.0
- Διάλυμα  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$  1.0 M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης ( οι οποίες έχουν κατεργαστεί επεξεργασία με 1 %  $\text{NaCO}_3$  και 10 mM EDTA στους 100 °C και συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο νερό πριν από τη χρήση τους)

#### Όργανα:

- pHμετρο
- Φυγόκεντρος
- Αναλυτικός ζυγός
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο

### **Πειραματική πορεία:**

Ο καθαρισμός της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από μυϊκό ιστό κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο Fischer & Krebs (1962) με μικρές μόνο τροποποιήσεις (χρησιμοποίηση 2 –μερκαπτοαιθανόλης και όχι L- κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) (Melridou & Oikonomakos, 1983).

### **A. Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος:**

Ο μυϊκός ιστός ελήφθη από τα πίσω πόδια και από τους ραχιαίους μυς κοντά στη σπονδυλική στήλη από 3-4 κουνέλια και τοποθετήθηκε αμέσως σε πάγο. Ο μυϊκός ιστός ομογενοποιήθηκε σε κρεατομηχανή, ζυγίστηκε και επανατοποθετήθηκε σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η ολική άλεση του ιστού. Ακολούθησε εκχύλιση με απιονισμένο ύδωρ ίσου όγκου επί 10 min και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το ομογενοποιημένο μίγμα διηθήθηκε μέσω διπλής γάζας και συλλέχθηκε εν ψυχρώ. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε άλλες δυο φορές με ίσο όγκο απιονισμένου ύδατος στην πρώτη και μισό όγκο απιονισμένου ύδατος τη δεύτερη. Η διήθηση πραγματοποιήθηκε μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών. Ο συνολικός χρόνος της εκχύλισης δε ξεπέρασε τα 30 min.

### **B. Καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον:**

Το pH του ψυχρού εκχυλίσματος ρυθμίστηκε σε 5.1-5.2 με προσθήκη 1 N CH<sub>3</sub>COOH υπό ελαφριά ανάδευση. Η θολρότητα του εκχυλίσματος αυξήθηκε κατά τη ρύθμιση του pH λόγω της κατακρήμνισης διαφόρων πρωτεϊνών. Στην συνέχεια, αφήσαμε το εκχύλισμα στον πάγο για 5 min και ακλούθησε φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0-4 °C σε 5.000 rpm επί 30 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απομακρύναμε τις πρωτεΐνες που καταβυθίστηκαν. Το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί Buchner εν ψυχρώ προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα αιωρούμενου υλικού. Το pH του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος ρυθμίστηκε σε 6.8 με τη χρήση κεκορεσμένου διαλύματος KHCO<sub>3</sub>.

### **Γ. Καταβύθιση του ενζύμου με θειϊκό αμμώνιο (90 % w/v):**

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειϊκό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παρέμεινε στους 4°C για 24 hrs. Ο μεγαλύτερος όγκος του εκχυλίσματος αποχύθηκε με τη χρήση αντλίας και συλλέχθηκε το ίζημα για φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0-4 °C σε

5.000 grm επί 40 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος. Το διαλυμένο ένζυμο τοποθετήθηκε σε σακουλάκια διαπίδυσης τα οποία εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001 M , pH 7.5 στους 4° C για μια νύκτα.

#### **Δ. Θερμική κατεργασία του ενζυμικού διαλύματος σε υψηλό pH:**

Το διάλυμα συλλέχθηκε και διαυγάστηκε με φυγοκέντρωση σε 5.500 grm για 30 min στους 0-4 °C. Προστέθηκε διάλυμα 2-μερκαπτο-αιθανόλης, 0,3 M, pH 7.0, όγκου ίσου με το 1/9 του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0,1 M , pH 7.0 όγκου ίσου με το  $5 \times 10^{-3}$  του πρωτεϊνικού διαλύματος και της πρόσφατα προστιθέμενης 2-μερκαπτο-αιθανόλης και διαλύματος Tris 2 M με σκοπό τη ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά από επώαση στους 37 °C επί 1 hr και παραμονή για ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε CH<sub>3</sub>COOH 1 N για τη ρύθμιση του pH σε τιμή 7.0. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε σε 15.000 grm επί 10 min.

#### **Ε. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάση b:**

Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετρήθηκε και προστέθηκε AMP 0.1 M και οξικό μαγνήσιο 1 M με pH 7.0 ίσου όγκου με  $1 \times 10^{-2}$  με το πρωτεϊνικό διάλυμα. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε μικρά tubes φυγοκέντρωσης , ισοζυγίστηκε και ψύχθηκε για τουλάχιστον 6 hrs στους 0 °C για να κρυσταλλωθεί η φωσφορυλάση b. Οι κρύσταλλοι συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση σε 15.500 grm για 10 min. Το κρυσταλλικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM β-GP/HCl ,pH 6.8, 50 mM 2-μερκαπτο-αιθανόλης, 1 mM EDTA) σε θερμοκρασία 30 °C μέσα στο υδατόλουτρο. Ακολούθησε διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρωση σε 17.500 grm σε θερμοκρασία 25-30 °C. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP.

#### **Ζ. Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου:**

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης b μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιήθηκε με επώαση στους 30 °C. Η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης b

προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 280 nm και προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης. Τέλος, το ενζυμικό διάλυμα φυλάχθηκε στους -20 °C.

## 2.2 Απομόνωση της κινάσης της φωσφορυλάσης από μετασηματισμένα κύτταρα *E.coli*:

- **Μετασηματισμός δεκτικών βακτηρίων (competent cells) με πλασμιδιακό φορέα**

Πραγματοποιήθηκε μετασηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελέχους B834(DE3) με πλασμιδιακό φορέα στον οποίο έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο της καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ( $\gamma$ -PhK), με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Το γονίδιο του ενζύμου είναι κλωνοποιημένο στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pGEX-6P-1 (Amersham GE) ο οποίος είναι εφοδιασμένος εκτός από το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη και με τον κατάλληλο επίτοπο ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να εκφράζεται συγχωνευμένη με την τρανσφεράση της S-γλουταθειόνης (GST) μέσω του πρωτεολυτικού κέντρου (LEVLFQGP) που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση Rhinovirus 3C (PreScission Protease). Στο σωληνάριο τύπου erpendorf όπου ήταν αποθηκευμένα τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα προστίθενται 50μg ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και αναδεύονται πολύ ήπια και αφήνονται για επώαση στους 4°C για 30min. Ακολούθως, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, το οποίο είναι ρυθμισμένο στους 42°C για 45sec ακριβώς. Στη συνέχεια, μεταφέρονται για επώαση στους 4°C για 2min. Μετά το πέρας των 2 λεπτών τοποθετείται 1ml αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB Broth, άνευ αντιβιοτικού. Τα μετασηματισμένα, πλέον, βακτηριακά κύτταρα επώάζονται στους 37°C υπό ανάδευση (180-210 rpm) για 1h. Μετά το πέρας της επώασης το 1/500 του αρχικού όγκου της υγρής καλλιέργειας των μετασηματισμένων κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία petri με θρεπτικό μέσο LB Agar, στα οποία έχει προστεθεί το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (αντιβιοτικό διαλογής των μετασηματισμένων μόνο κυττάρων με το γονίδιο της σε τελική συγκέντρωσης 50μg/ml με



γυάλινο διανομέα (πιπέττα pasteur) Τα τρυβλία επωάζονται για 16h σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 37°C. Σημειώνεται ότι όλες οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν μεταχείριση βακτηρίων και αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων, γίνονται υπό στείρες συνθήκες

- **Υπερέκφραση καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης ( $\gamma$ -Phk) σε βακτήρια *E.coli* B834(DE3)**

Κατά την πορεία έκφρασης και απομόνωσης μιας πρωτεΐνης, τα βασικά σημεία που πρέπει να καθοριστούν πριν από την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα είναι:

1. Οι συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας (θερμοκρασία, αερισμός, θρεπτικό υλικό, διάρκεια επώασης )
2. Η συγκέντρωση IPTG που απαιτείται κατά την επαγωγή καθώς επίσης και θερμοκρασία στην οποία θα γίνει η επαγωγή.

Επίσης πριν από την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα, γίνεται διερεύνηση ως προς τον εντοπισμό της παραγόμενης πρωτεΐνης στο διαλυτό ή στο αδιάλυτο κλάσμα, καθώς επίσης και αν αλληλεπιδρά με άλλα κυτταρικά συστατικά.

Για την επαγωγή της έκφρασης της  $\gamma$ -Phk χρησιμοποιήθηκε σαν επαγωγέας η ένωση IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης) διότι εμφανίζει δομικές ομοιότητες με την αλλολακτόζη και επιπλέον μιας και δεν αποτελεί υπόστρωμα του ενζύμου, δεν καταβολίζεται εξασφαλίζοντας έτσι συνεχή επαγωγή.

#### **Πειραματική διαδικασία:**

1. Λαμβάνεται μια μονή αποικία των επιθυμητών κυττάρων από φρέσκο τρυβλίο που αποθηκεύεται στους 4 °C και εμβολιάζεται κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού LB στο οποίο έχει προστεθεί αντιβιοτικό αμικικιλίνη (c=50μg/ml) σε στείρες συνθήκες.
2. Η μικρή καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C ολονύκτια, υπό ανάδευση στις 210 rpm.

3. Η μικρή καλλιέργεια αραιώνεται 1:100 σε κατάλληλη ποσότητα LB/ αντιβιοτικού Amp (c=50μg/ml), σε 1L και επώζεται στους 37 °C υπό ανάδευση στις 210 rpm, ). Η καλλιέργεια παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά λαμβάνοντας 1ml καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι οπτικής απορρόφησης  $OD_{600nm} = 0.5-0,6$  A, όπου και θεωρείται, για το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, πως η καλλιέργεια θα βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Είναι επιθυμητό, η καλλιέργεια να φτάσει στο μέγιστο σημείο της εκθετικής φάσης όπου και θα ξεκινήσει η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης.

4. Προστίθεται ο επαγωγέας IPTG (C=0.1mM) και η καλλιέργεια επώζεται ολονύκτια στους 18° C υπό ανάδευση στις 210 rpm.

### **Συλλογή των κυττάρων:**

Οι παραγόμενες πρωτεΐνες μπορούν να εντοπιστούν είτε στο κυτταρικό ίζημα είτε στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση της καλλιέργειας σε μεγάλες ταχύτητες. Οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες εντοπίζονται στο υπερκείμενο της φυγοκέντρησης μαζί με το θρεπτικό υλικό, ενώ οι σχετιζόμενες με την κυτταρική μεμβράνη και οι ενδοκυτταρικές εντοπίζονται στο κυτταρικό ίζημα.

Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε δοχεία φυγοκέντρησης και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται σε 5000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υπερκείμενο το οποίο θα πρέπει να είναι διαυγές (αν δεν είναι διαυγές επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση διότι αυτό σημαίνει ότι δεν έχουν καταβυθιστεί όλα τα κύτταρα), και το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται μπορεί να υποστεί αμέσως περαιτέρω επεξεργασία ή εναλλακτικά να αποθηκευτεί στους -20 °C .

### **Λύση των κυττάρων:**

Η λύση των κυττάρων είναι ένα κρίσιμο βήμα στη πορεία απομόνωσης της πρωτεΐνης καθώς μπορεί να επηρεάσει τη βιολογική της ενεργότητα και τη συνολική της ποσότητα. Η λύση των κυττάρων μπορεί να γίνει ενζυμικά, μηχανικά ή με την εφαρμογή οσμωτικής πίεσης. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε ο μηχανικός τρόπος λύσης των κυττάρων με χρήση

υπερήχων και η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται πρώτα σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) και στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων.

Το διάλυμα λύσης αποτελείται απο

- 50mM Tris (pH 7.5)
- 200 mM NaCl
- 0.1% MTG (1-thioglycerol)
- Αναστολείς πρωτεασών (Complete tablets, EDTA – free)
- 50U βενζονάση

2. Διαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων (pellet) στο διάλυμα λύσης σε θερμοκρασία 0°C.

3. Το διάλυμα στη συνέχεια υφίσταται την επίδραση υπερήχων ανά 30 δευτερόλεπτα με ενδιάμεσες παύσεις των 30 δευτερολέπτων μέχρι να προκύψει ομοιογενές διάλυμα. Η λύση των κυττάρων γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (διατήρηση σε πάγο) για την αποφυγή υπερθέρμανσης που θα οδηγήσει σε καταστροφή των πρωτεϊνών.

4. Το διάλυμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4 C, για 1h στις 15000g

## 2.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός της $\gamma$ καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης:

### A. Χρωματογραφία συγγένειας:

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί μι αποτελεσματική χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού και καθαρισμού ενζύμων. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής βασίζεται στη βιολογική συγγένεια, η οποία στα ένζυμα εκφράζεται με την ικανότητα τους να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν με εκλεκτικό και αντιστρέψιμο τρόπο συγκεκριμένα μόρια-δεσμευτές (ligand). Αν κάποιος δεσμευτής, π.χ. ενζυμικό υπόστρωμα, αναστολέας, συνένζυμο, αντίσωμα, μέταλλο κ.α., δεσμευθεί χημικά (ακίνητοποιηθεί) σε κατάλληλο πολυμερές στερεό υλικό, το οποίο αποκαλείται φορέας, τότε λαμβάνεται ο λεγόμενος προσροφητής συγγένειας (affinity adsorbent).

Όταν ένα βιολογικό δείγμα που περιέχει μίγμα μακρομορίων περάσει από τη χρωματογραφική στήλη που φέρει τον προσροφητή τότε, τυπικά, μόνο το μακρομόριο που παρουσιάζει συγγένεια με τον δεσμευτή θα συγκρατηθεί (προσροφηθεί) στη στήλη, ενώ όλα τα άλλα μόρια θα απομακρυνθούν κατά το επόμενο στάδιο, της έκπλυσης. Ακολούθως, το προσροφημένο μακρομόριο εκλούεται υπό συνθήκες που εξασθενούν τις δυνάμεις μοριακής αναγνώρισης με το δεσμευτή, με αποτέλεσμα τη διάσταση του συμπλόκου στη στήλη και την παραλαβή του μακρομορίου.

Η πρώτη στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της  $\gamma$ -PhK ήταν η Protino GST/4B (Macherey-Magel) που φέρει ως δεσμευτή (ligand) ακίνητοποιημένη γλουταθειόνη.

Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη GST περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της πρωτεΐνης.

Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:

- 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.2)
- 10% γλυκερόλη
- 0,1 % MTG
- 200mM NaCl

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection). Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον δεσμευτή διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται).

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη.

4. Έκλουση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει:

- 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.2)
- 10% γλυκερόλη
- 0,1 % MTG
- 200mM NaCl
- 20mM ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα.

Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά κλάσματα ενώνονται και ακολουθεί πρωτεολυτική διάσπαση του επίτοπου της GST με την έγχυση διαλύματος GST-3C πρωτεάσης σε αναλογία 1/20 w/w με επώαση για 24 h στους 4°C.

## **B. Χρωματογραφία συγγένειας:**

- Η δεύτερη στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της γ-PbK ήταν η HiTrapBlueHP (GEHealthcare) που φέρει. Πριν την εισαγωγή του δείγματος το πρωτεϊνικό μίγμα αραιώθηκε 4 φορές με διάλυμα 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.2), 10% γλυκερόλη έτσι ώστε να μειωθεί η συγκέντρωση του NaCl ώστε να προσθεθεί η πρωτεΐνης στη στήλη.

Η διαδικασία του καθαρισμού περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της . πρωτεΐνης

Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:

- 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.2)
- 10% γλυκερόλη
- 0,1 % MTG
- 50mMNaCl

2. Εισαγωγή του δείγματος (injection). Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον δεσμευτή διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.

3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm να μηδενιστεί. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη.

4. Έκλουση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει:

- 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.2)
- 10% γλυκερόλη
- 0,1 % MTG

- 1M NaCl

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm. Η οπτική απορρόφηση καταγράφεται και συλλέγονται κλάσματα με βάση το διάγραμμα του καταγραφέα.

### **Γ. Χρωματογραφία συγγένειας:**

Τα πρωτεϊνικά κλάσματα καθαρίστηκαν περαιτέρω με χρωματογραφία σε στήλη ακινητοποιημένης γλουταθειόνης ProtinoGST/4B (Macherey-Magel). Η διαδικασία καθαρισμού διαφέρει από το πρώτο βήμα καθαρισμού καθώς η  $\gamma$ -Phk δεν θα δεσμευθεί στη στήλη καθώς έχει γίνει η πρωτολυτική διάσπαση του επίτοπου της GST. Η διαδικασία του καθαρισμού με τη στήλη GST περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Εξισορρόπηση με το διάλυμα A (equilibration buffer), Το διάλυμα εξισορρόπησης αποτελείται από:
  - 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.2)
  - 10% γλυκερόλη
  - 0,1 % MTG
  - 200mM NaCl
2. Εισαγωγή του δείγματος (injection). Στο στάδιο αυτό οι πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια με τον δεσμευτή διέρχονται από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν και συλλέγονται.. Στην στήλη θα δεσμευτεί η GST-3C καθώς και η GST
3. Έκπλυση (wash) της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης. Αυτό μας εξασφαλίζει την απομάκρυνση όλων των πρωτεϊνών που δεν έχουν προσδεθεί στη στήλη συνεπώς και της πρωτεΐνης μας.
4. Έκλουση (elution) της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλουσης το οποίο περιέχει:

- 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.2)
- 10% γλυκερόλη
- 0,1 % MTG
- 200mM NaCl
- 20Mm ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

5. Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη, διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει συνεχώς την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm.

6. Η πρωτεΐνη που συλλέξαμε αποθηκεύεται στους  $-20^\circ\text{C}$  αφού προστεθεί 50% γλυκερόλη.

## **2.4 Κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS –πολυακρυλαμιδίου:**

Το πήκτωμα SDS – πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δυο μέρη: το πήκτωμα διαχωρισμού και το πήκτωμα επιστοιβάσης. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρασκευάστηκε με πολυμερισμό διαλύματος ακρυλαμιδίου μέσα σε συσκευή ηλεκτροφόρησης αποτελούμενη από δυο παράλληλες γυάλινες πλάκες με απόσταση μεταξύ τους 1 mm. Η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

### **A. Παρασκευή πηκτώματος διαχωρισμού 12 % w/v:**

Για την παρασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού χρησιμοποιήσαμε 0.1% (w/v) SDS, 2.5 ml Tris/HCl 1.5 M, pH 8.8 , 0.005 ml τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) , 4 ml διαλύματος (29.2 ml (w/v) ακρυλαμίδιο και 0.8% (w/v) μεθυλοδισακρυλαμίδιο) και 3.35 ml νερό. Ο πολυμερισμός του πολυακρυλαμιδίου ξεκίνησε με την προσθήκη 0.05 ml διαλύματος υπερθειϊκού αμμωνίου 10% (w/v) που είχε παραχθεί πρόσφατα και ολοκληρώθηκε μέσα σε



30-60 min. Στην συνέχεια στην επιφάνεια του πηκτώματος διαχωρισμού προστέθηκε το διάλυμα επιστοιίβασης.

#### **B. Παρασκευή πηκτώματος επιστοιίβασης:**

Το πήκτωμα επιστοιίβασης παρασκευάστηκε με ανάμειξη 1.25 ml Tris/HCl, pH 6.8 , 0.05 ml SDS , 0.005 ml TEMED , 0.65 ml διαλύματος (29.2 ml (w/v) ακρυλαμίδιο και 0.8% (w/v) μεθυλοδιασακρυλαμίδιο) και 3 ml νερό. Ο πολυμερισμός του πολυακρυλαμιδίου ξεκίνησε με την προσθήκη 0.025 ml υπερθειϊκού αμμωνίου 10 % (w/v) και ολοκληρώθηκε μέσα σε 30 -60 min. Στο πήκτωμα σχηματίστηκαν και υποδοχές για την τοποθέτηση του πρωτεϊνικού δείγματος.

#### **Δ. Ηλεκτροφόρηση:**

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συσκευή αποτελούμενη από δυο δεξαμενές που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα. Η τάση του ρεύματος ρυθμίστηκε στα 120 Volt. Η ηλεκτροφόρηση διήρκησε περίπου μιάμιση ώρα και ακολούθησε χρώση του πηκτώματος.

#### **E. Χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου:**

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίστηκε για 5 min σε 200 ml φρέσκου διαλύματος (0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 , 40 % (v/v) μεθανόλη και 10% (v/v) οξικό οξύ. Ο αποχρωματισμός έγινε με συνεχείς εκπλύσεις (3-4 φορές) σε διάλυμα (10% (v/v) οξικό οξύ) .

## 2.5 Κινητική μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου:

### 2.5.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας της κινάσης της φωσφορυλάσης:

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

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της  $\gamma$ -PhK δε μπορεί να επιτευχθεί άμεσα καθώς καταλύει τη φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης b με αποτέλεσμα της τη μετατροπή του ενζύμου φωσφορυλάση b (ανενεργός μορφή) σε φωσφορυλάση a (ενεργός μορφή). Η μετατροπή αυτή γίνεται με φωσφορυλίωση παρουσία ATP και ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  μιας ειδικής σερίνης (σερίνη 14) σε κάθε υπομονάδα της φωσφορυλάσης b. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen**  $(n)$  προς **Glycogen**  $(n-1)$  και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**.



Ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας της  $\gamma$ -PhK μπορεί να υπολογιστεί απο δυο επιμέρους αντιδράσεις όπου: στο πρώτο μέρος της αντίδρασης έχουμε μετατροπή της ανενεργού φωσφορυλάσης b σε ενεργό φωσφορυλάση a. Στο δεύτερο μέρος της αντίδρασης έχουμε τον προσδιορισμό της ενεργού φωσφορυλάσης a.

### 2.5.2 Προσδιορισμός της 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 ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης ( $V_{max}$ ). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ATP και τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της Gra.

#### Παρασκευή διαλυμάτων για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten:

- Stop Buffer (pH 6.8):
  - 0,1M TEA
  - 1mM EDTA
  - 2mM DTT
- Buffer αραίωσης κινάσης:
  - 50mM Tris pH 8.2
  - 50mM Hepes
  - 0,5mM  $\text{CaCl}_2$
  - 10mM  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$
  - 5mg/ml BSA
- Buffer Hepes:
  - 50mM Tris pH 8.2
  - 50mM Hepes
  - 0,5mM  $\text{CaCl}_2$
  - 2mM DTT
  - 10mM  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$
- Γλυκογόνο 1 % (w/v)
- Διάλυμα SDS 1%
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50mM β-φωσφογλυκερόλης (β-GP), 50mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA)
- Απιονισμένο ύδωρ

## Όργανα:

- Υδατόλουτρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Δοκιμαστικούς σωλήνες
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Συσκευή vortex
- ρΗμετρο
- Χρονόμετρο

## Εκτέλεση πειράματος

### Προσδιορισμός της δραστηριότητας της γ-PhK ως προς ATP

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C. Ο συνολικός όγκος των υποστρωμάτων ήταν 90μL και περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Hepes buffer), φωσφορυλάση του γλυκογόνου, και διάφορες συγκεντρώσεις ATP. Τοποθετούνται τα υποστρώματα για επώαση στους 30°C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 10μL διαλύματος γ-Phk. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε: 50mM Tris/HCl pH 8.2, 50 mM Hepes, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 10mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg, 0.5mg/ml BSA, 1mg/ml Gpb, ATP ( 0.08mM- 0.2 mM- 0.4mM- 0.5 mM-0.8 mM) και γ-PhK 5ng/ml.

Σε χρονικά διαστήματα 4min- 8min- 12min-14min, λαμβάνονται δείγματα 20μL από την ενζυμική αντίδραση και αραιώνονται 50 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα (Stop buffer) το οποίο περιέχει 100mM TEA/HCl pH 6.8, 1mM EDTA, 2mM DTT, σε θερμοκρασία 0°C ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η ενζυμική δραστηριότητα της GPa που είναι το προϊόν της αντίδρασης της γ-PhK.

### Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της Gra

Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της δραστηριότητας της Gra. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen<sub>(n)</sub>**, προς **Glycogen<sub>(n-1)</sub>** και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**.

Γλυκογόνο (n κατάλοιπα) + Pi → 1-φωσφορική-γλυκόζη + γλυκογόνο (n -1 κατάλοιπα)

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

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C. Αρχικά ετοιμάζονται τα υποστρώματα της αντίδρασης που περιέχουν 152mM GIP, 2% γλυκογόνο, 20μM AMP, και 1mM καφεΐνη και τελικό όγκο 0.15mL. Τοποθετούνται τα υποστρώματα για επώαση στους 30°C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 0.15mL Gra 0.02mg/ml (προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης), στα υποστρώματα. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση (σε τελικό όγκο 0.3mL) έχουμε: 76mM GIP, γλυκογόνο 1%, 10μM AMP, 0.5mM καφεΐνη .

Μετά από χρόνο αντίδρασης 4min λαμβάνονται δείγματα των 200μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 300μL SDS 1% (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται). Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω προσθέτοντας 5mL διαλύματος ασκορβικού οξέος σε κάθε δείγμα. Μετά από 15min επώαση μετρήθηκε η απορρόφηση στα 850nm. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της παρουσίας φωσφορικών).

### **Μέθοδος ασκορβικού οξέος [Saheki et al, 1985]**

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής 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 ορθοφωσφορικά ιόντα πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.4  $\mu\text{M}$  προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

#### **Υλικά:**

- Διάλυμα μολυβδαινίου, 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 ατμίζων HCl 10M.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10M.  
Ανάμιξη 4:1 όγκους αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος.

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).

### **2.5.3 Προσδιορισμός του $\text{IC}_{50}$ αναστολέα:**

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας της σύνθεσης του γλυκογόνου και της παραγωγής φωσφορικών ιόντων (Pi). Η έκφραση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με τα πρότυπα της ενζυμικής αναστολής (Segel, 1975).

Η σταθερά  $\text{IC}_{50}$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50 % αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την κινητική μελέτη του

ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του  $IC_{50}$  και για συγκεκριμένη συγκέντρωση υποστρώματος ATP.

Στην παρούσα διπλωματική εξετάστηκε η ένωση με κωδική ονομασία CD1134 η οποία είναι μια κουρκουμίνη (τριτερπενοειδής ένωση προερχόμενη από τον κουρκουμά. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις της ένωσης που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της  $IC_{50}$  ήταν 300  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 700  $\mu$ M, 800  $\mu$ M, 1 mM.

Παρασκευάζονται διαλύματα υποστρωμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η  $IC_{50}$ , και σταθερή συγκέντρωση ATP 0.1 $\mu$ M. Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα. Οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις είναι ίδιες με αυτές που περιγράφηκαν στην ενότητα 2.6.2

	Control	Σωλήνας - 1	Σωλήνας - 2	Σωλήνας - 3	Σωλήνας -4	Σωλήνας - 5
ATP	0,1mM	0,1mM	0,1mM	0,1mM	0,1mM	0,1mM
Hepes	12,5mM	12,5mM	12,5mM	12,5mM	12,5mM	12,5mM
H <sub>2</sub> O	33,9 $\mu$ L	33,9 $\mu$ L(- Χ $\mu$ L)	33,9 $\mu$ L(- Υ $\mu$ L)	33,9 $\mu$ L(- Ζ $\mu$ L)	33,9 $\mu$ L(- Ω $\mu$ L)	33,9 $\mu$ L(- Ν $\mu$ L)
GPb	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	1mg/ml
Αναστολέας	-	0,3mM (Χ $\mu$ L)	0,5mM (Υ $\mu$ L)	0,7 mM (Ζ $\mu$ L)	0,8mM (Ω $\mu$ L)	1mM (Ν $\mu$ L)
Τελικός όγκος αντίδρασης	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

**Πίνακας 2.1** : Συγκεντρώσεις υποστρωμάτων κατά τον προσδιορισμό της  $IC_{50}$  του αναστολέα

#### 2.5.4 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Graftit:

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου σύμφωνα με τις εξισώσεις

A) Υπολογισμός ειδικής δραστηριότητας (specific activity) της GP

$$\text{specific activity GP} = \frac{\text{limit}}{\text{time} \times [\text{GP}] \times \text{assay volume}} \times \frac{\ln \text{limit}}{\text{limit} - \frac{\text{OD} - \text{τυφλό G1P}}{\text{τυφλό Pi}}}$$

B) Υπολογισμός του προϊόντος της αντίδρασης (GPa) ανά nmol γ-PhK που καταλύεται από την γ-PhK

$$\text{GPa} (\mu\text{mol}) / \text{nmol PhK} = \text{specific activity GPa} \times \frac{\text{MB } \gamma\text{-trunk} \times [\text{GP}] \times \text{assay volume} \times 1000}{\text{MB Gp} \times \text{Vmax} \times [\text{phK}] \times \text{assay volume}}$$

$$\text{limit} = 0,78 \times [\text{G1P}] \times \text{assay volume}$$

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  $V_{\max}$ .

Στον προσδιορισμό της σταθεράς  $IC_{50}$ , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα.



## 2.6 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας:

Τα ολοένα αυξανόμενα άτομα που πάσχουν από διαβήτη τύπου II καθιστούν επιτακτική την ανάγκη για την ανακάλυψη και τον σχεδιασμό εν δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων. Στόχος των συγκεκριμένων φαρμάκων αποτελούν διάφορα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα.

Η κινάση της φωσφορυλάσης αποτελεί ένζυμο – κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και λόγω της σημασίας της φωσφορυλίωσης στα βιολογικά συστήματα, η κινάση της φωσφορυλάσης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για τη μελέτη των μηχανισμών που την διέπουν. Η κινάση της φωσφορυλάσης είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης b ανενεργός μορφή) με αποτέλεσμα τη μετατροπή της) σε φωσφορυλάση a (ενεργός μορφή). Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου με τη σειρά της συμμετέχει στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και γι' αυτό η κινάση της φωσφορυλάσης αποτελεί μοριακό στόχο για το σχεδιασμό αντιδιαβητικών φαρμάκων. Η αναστολή της κινάσης της φωσφορυλάσης μπορεί να ελέγξει σ' ένα βαθμό την δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και άρα να μειωθούν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα των ασθενών.

Η πτυχιακή εργασία αποτελεί μέρος της έρευνας που διεξάγεται στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με σκοπό τη μελέτη της καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης για την κατανόηση της μοριακής βάσης και της αναγνώρισης μικρομοριακών αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό εν δυνάμει αντιδιαβητικών φαρμάκων.

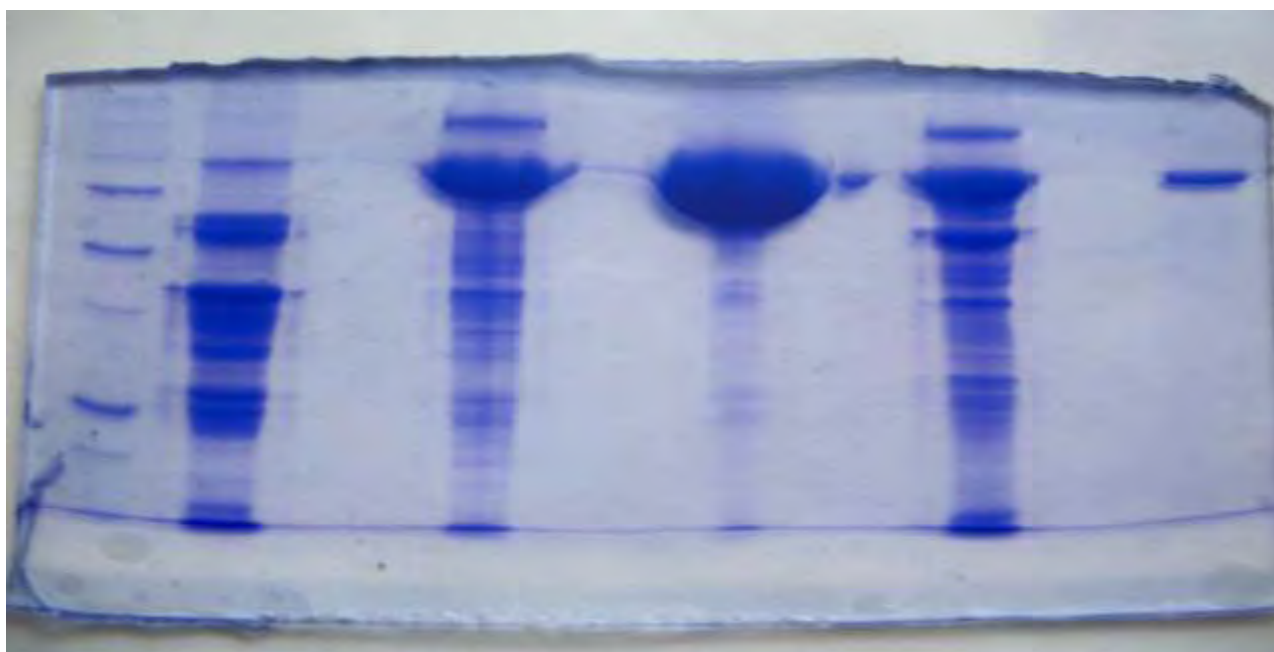
Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε απομόνωση  $\gamma$ - υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης και απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από μυϊκό ιστό κουνελιού. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες της  $\gamma$ -PhK για τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis – Menten ( $K_m$ ) και μιας σειράς αναστολέων (κουρκουμίνες) έναντι της κινάσης της φωσφορυλάσης για τον προσδιορισμό της  $IC_{50}$ .

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

#### 3.1 Απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου:

Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μύς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος.

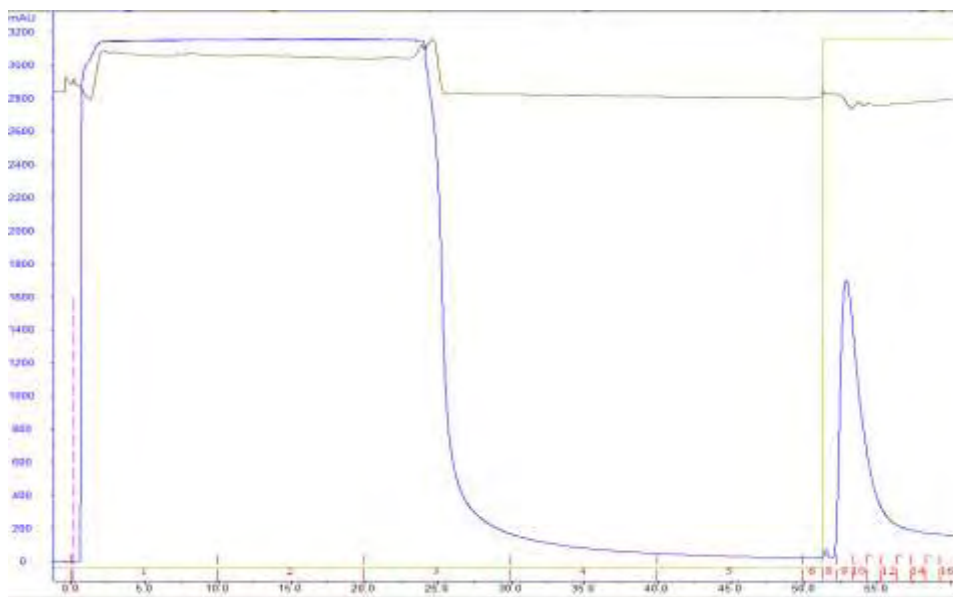
Μάρτυρας      Διαδρομή 1      Διαδρομή 2      Διαδρομή 3      Διαδρομή 4      Διαδρομή 5



**Εικόνα 6:** 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 πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

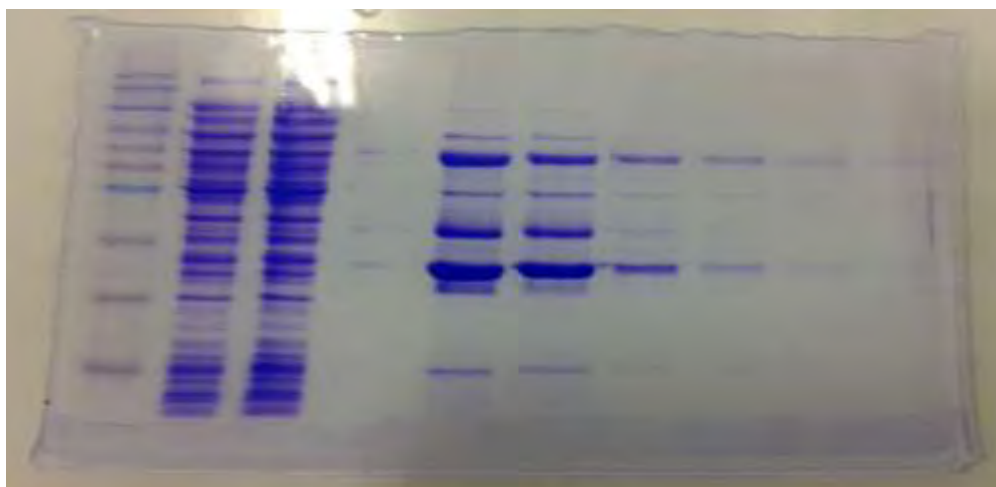
### 3.2 Απομόνωση της υπομονάδας γ της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου:

#### A. Χρωματογραφία συγγένειας GST



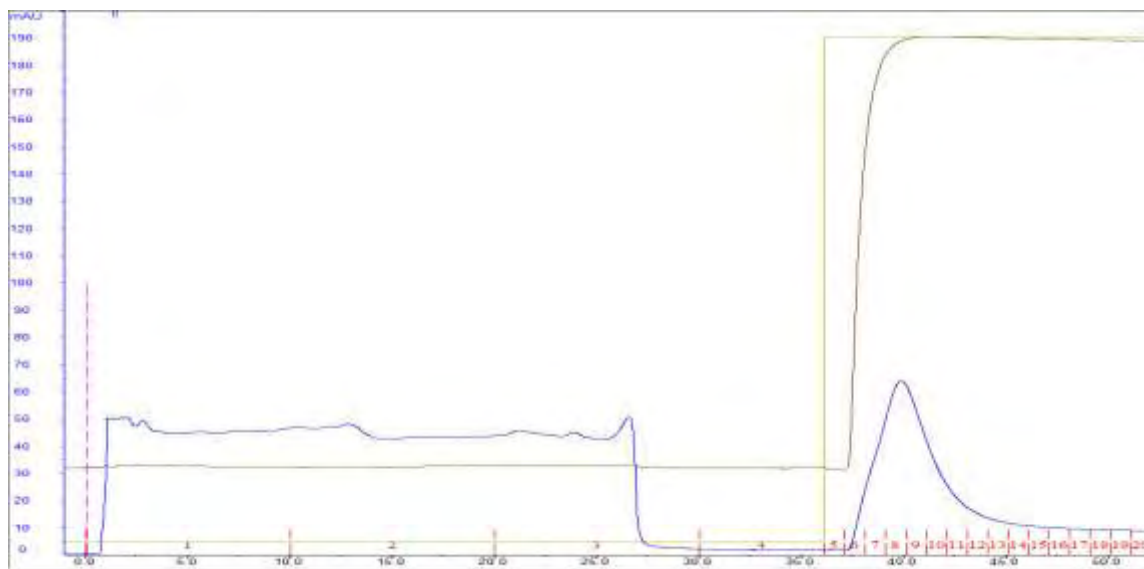
**Εικόνα 7** :Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα από την στήλη ProtinoGST/4B. Η έκλουση έγινε με 20mM γλουταθειόνη

Μάρτυρας Δ/μή 1 Δ/μή 2 Δ/μή3 Δ/μή 4 Δ/μή 5 Δ/μή 6 Δ/μή 7 Δ/μή 8



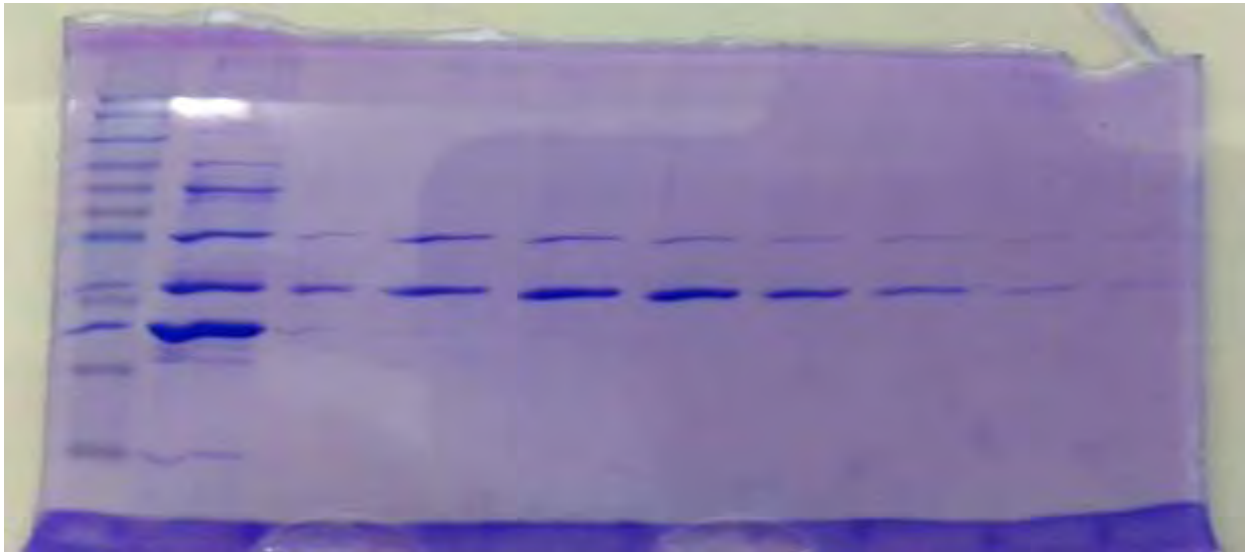
**Εικόνα 8 :** Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, στο πρώτο βήμα της απομόνωσης της  $\gamma$ -PhK με την Protino GST/4B. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το σύνολο των πρωτεϊνών μετά την λύση των βακτηριακών κυττάρων. Στη δεύτερη, το σύνολο του πρωτεϊνικού διαλύματος που δεν δεσμεύθηκε στη στήλη, ενώ στην τρίτη το διάλυμα μετά την έκλυση της στήλης GSTTrap 4B. Στις υπόλοιπες διαδρομές το έκλουσμα της στήλης Protino GST/4B.

## B. Χρωματογραφία συγγένειας HiTrap Blue



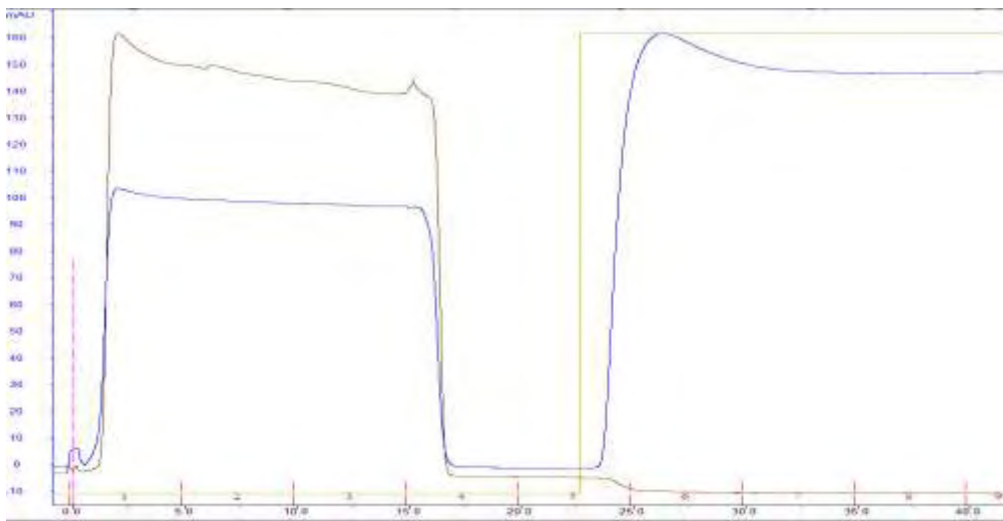
**Εικόνα 9:** Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα από την στήλη HiTrap Blue. Η έκλυση έγινε με 1M NaCl.

Μάρτυρας Δ/μή 1 Δ/μή 2 Δ/μή 3 Δ/μή 4 Δ/μή 5 Δ/μή 6 Δ/μή 7 Δ/μή 8 Δ/μή 9



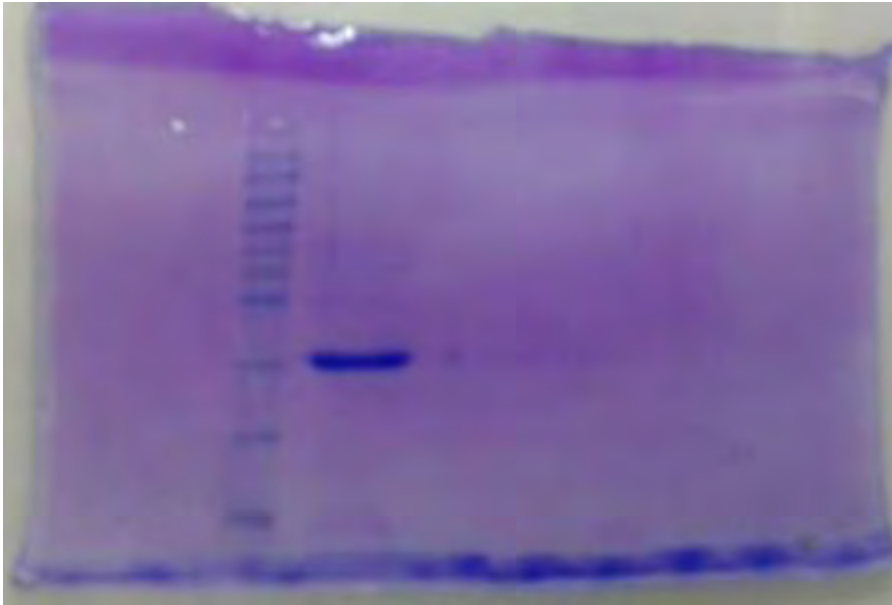
**Εικόνα 10** : Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μετά την στήλη HiTrap Blue. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή έχουμε το δείγμα μετά την επώαση με την πρωτεάση 3C. Στις διαδρομές 3-9 παρουσιάζονται τα κλάσματα της έκλουσης της στήλης

### Γ. Χρωματογραφία συγγένειας GST



**Εικόνα 11**: Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα από την στήλη ProtinoGST/4B όπου η  $\gamma$ -Phk διέρχεται από την στήλη και δεσμεύονται η GST και η 3C. Η έκλουση έγινε με 20mM γλουταθειόνη.

## Μάρτυρας Διαδρομή 1



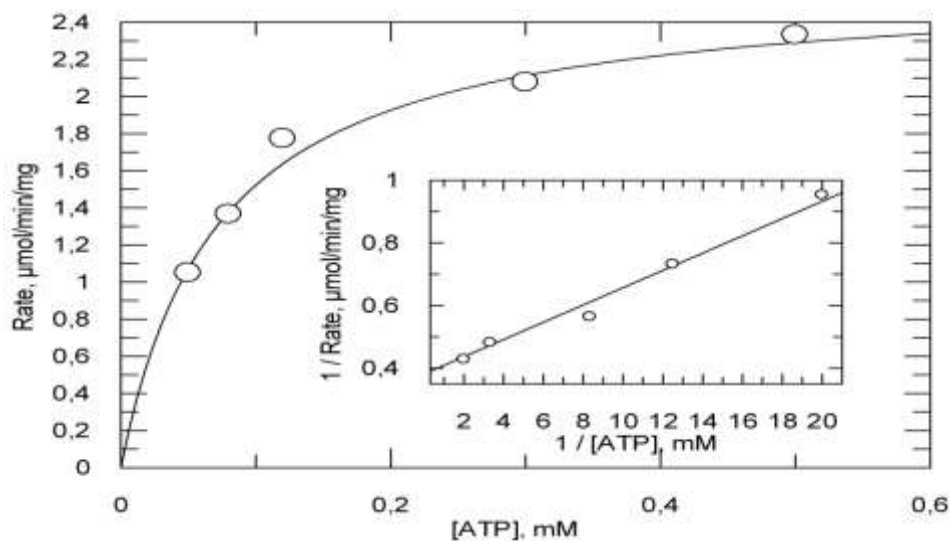
**Εικόνα 12** : Ηλεκτροφόρηση πηκτής της τελικού δείγματος της καθαρής  $\gamma$ -Phk μετά την δεύτερη στήλη GSTTrap 4B. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας

### 3.3 Κινητική μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου:

#### Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ )

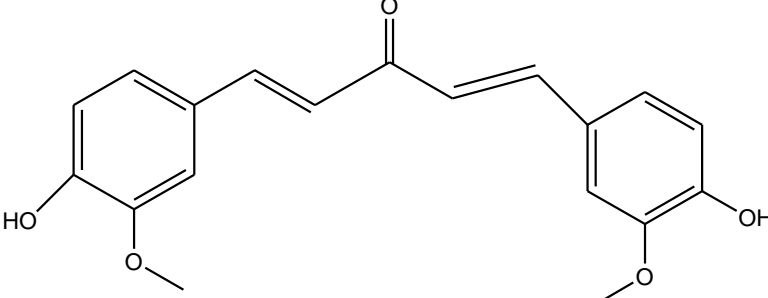
Πριν από περίπου 100 χρόνια οι Michaelis και Menten δημοσίευσαν την πλέον κλασσική δημοσίευση (Michaelis L., Menten M. L. , 1913), μέσα από την οποία έδειξαν ότι ο ρυθμός μιας ενζυματικά καταλυόμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten, είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Οι μελέτες των Michaelis και Menten έγιναν χρησιμοποιώντας το ένζυμο ιμπερτάση (Johnson K. A., et al., 2011). Η σταθερά  $K_m$  αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (ATP για το ένζυμο PhK) 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 ( $V_{max}$ ). Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της  $K_m$ . (βλ. Πειραματικό μέρος, §2.6.2) Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι:  $K_m=0.0724 \pm 0,0056$  mM και  $V_{max}=3.0536 \pm 0.0622$   $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ . Στην εικόνα 13 παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity,  $\mu\text{mol}$  φωσφορικών/ $\text{min}\cdot\text{mg}$  ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (ATP).



**Εικόνα 13:** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της  $\gamma$ -PhK σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος ATP. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο ένθετο παρουσιάζεται το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk από το οποίο υπολογίζονται οι σταθερές  $K_m$  και  $V_{max}$ .

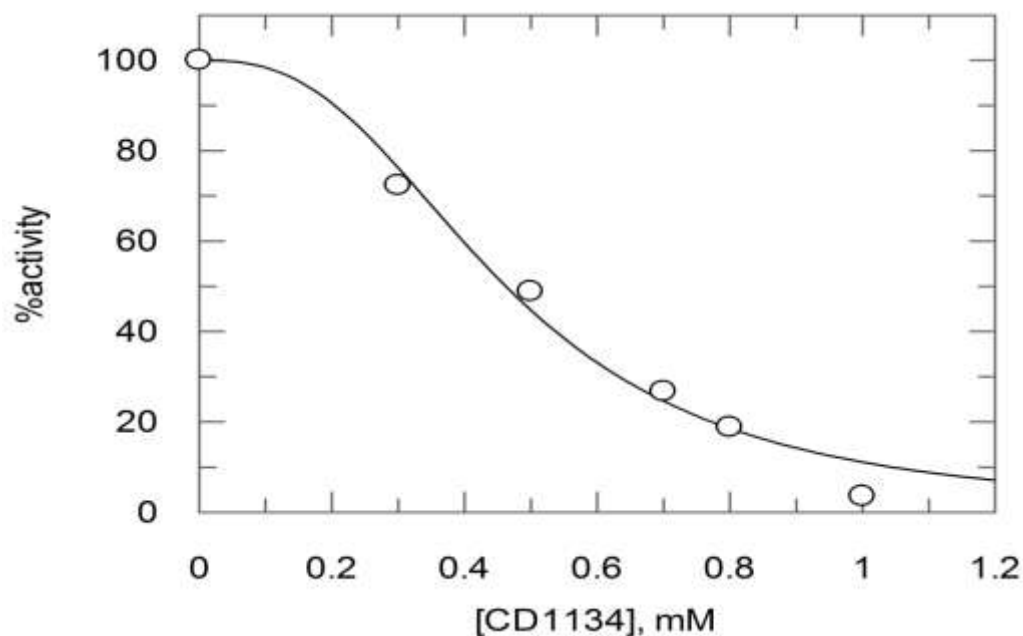
### 3.4 Κινητική μελέτη των κουρκουμινών:

Όνομα	Ένωση
CD1134	

#### Προσδιορισμός IC<sub>50</sub>

Πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.5.3 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων του αναστολέα (CD1134). Η σταθερά IC<sub>50</sub> ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50 % αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Η τιμή της IC<sub>50</sub> που προέκυψε για τον αναστολέα CD1134 είναι  $462.3 \pm 220.023$   $\mu$ M και ακολουθεί και η γραφική παράσταση που προέκυψε σύμφωνα με το πρόγραμμα Grafit (Leatherberrow , 1997).





Parameter	Value	Std.Error
IC <sub>50</sub>	0.4623	0.0223
Slope Factor	2.6958	0.3309

**Εικόνα 14:** Καμπύλη της δραστικότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της ένωσης CD1134 και υπολογισμός της IC<sub>50</sub>.

Συμπερασματικά στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε ο χρωματογραφικός καθαρισμός της γ υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης. Στη συνέχεια ακολούθησε ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών του ενζύμου Km και Vmax. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η κινητική μελέτη της ένωσης CD1134 για τον προσδιορισμό της IC<sub>50</sub>. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η ένωση αυτή έχει μέτρια ανασταλτική δράση έναντι της γ-PhK με σταθερά IC<sub>50</sub> 462.3 μM ωστόσο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί μια ένωση φυτικής προέλευσης καθώς η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που πραγματοποιείται στο εργαστήριο Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας, που έχει ως στόχο την εύρεση και τον χαρακτηρισμό υπογλυκαιμικών ενώσεων που προέρχονται από φυτικά εκχυλίσματα. Κρυσταλλογραφικές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη έτσι ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής που προκαλεί η ένωση αλλά και ο τρόπος σύνδεσης της ένωσης και το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει με την πρωτεΐνη.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Στη χώρα μας, το 6 % του πληθυσμού πάσχει από Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου II και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας μέχρι το 2030 περισσότεροι από 300 εκατομμύρια άνθρωποι θα έχουν εκδηλώσει Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου II. Γι' αυτό το λόγο, είναι πολύ σημαντική η ανακάλυψη και ο σχεδιασμός νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων που έχουν ως στόχο ειδικά ένζυμα που παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Πιο συγκεκριμένα, η κινάση της φωσφορυλάσης αποτελεί ένα τέτοιο μοριακό στόχο για το σχεδιασμό υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και της κινάσης της φωσφορυλάσης καθώς η κινητική μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης για τον προσδιορισμό της σταθεράς  $K_m$ . Στην συνέχεια η κινάση της φωσφορυλάσης χρησιμοποιήθηκε για την κινητική μελέτη των ενώσεων των κουρκουμινών που είχαν στόχο το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.

Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών που πραγματοποιήσαμε έδειξαν ότι η  $K_m$  είναι . Από την κινητική μελέτη της κουρκουμίνης CD1134 προέκυψε ότι παρουσίασε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50 % ( $IC_{50}$ ) σε συγκέντρωση 462.3  $\mu M$ .

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος της έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας σε συνδυασμό με κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα της κινάσης της φωσφορυλάσης για τη συσχέτιση της βιολογικής λειτουργίας του ενζύμου με τη δομή.

## **ABSTRACT:**

In our country, the 6 % of our population suffers from Diabetes Mellitus type II and according to the World Health Organization until 2030 more than 300 million people will have developed Diabetes Mellitus Type II. For this reason, it is very important the discovery and the design of new antidiabetic drugs which have as target special enzymes. These enzymes play an important role in the metabolism of glycogen and in the regulation of the levels of glucose in the blood. Specifically, phosphorylase kinase constitutes such a molecular target for the design of hypoglycaemic drugs.

In the present study, the isolation of phosphorylase glycogen and of phosphorylase kinase was held as well the kinetic study of phosphorylase kinase for the determination of the Michaelis constant  $K_m$ . Moreover, phosphorylase kinase has been employed as a molecular target for the kinetic study of curcumins targeting the catalytic site of the enzyme.

In specific, the results of kinetic studies show that the constant  $K_m$  is . The kinetic study of curcumin CD1134 showed that curcumin reduced enzyme activity to 50% ( $IC_{50}$  values) at concentration 462.3  $\mu$ M.

The present study is a part of the research which is carried out in the laboratory of Structural and Functional Biochemistry in a combination with the crystallographic results of phosphorylase kinase for the correlation of the enzyme function with the structure.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

### ΕΛΛΗΝΙΚΗ:

- Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός υπογλυκαιμικών φαρμάκων, Χημικά Χρονικά, 63, 258 – 261
- Σμοκοβίτης Α., 2004, Φυσιολογία, Έκδοση 4<sup>η</sup>, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη
- Stryer L., 1997, Βιοχημεία Τόμος Ι, Έκδοση 2<sup>η</sup>, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
- Stephen McPhee, 2006, Παθολογική Φυσιολογία, Χαράλαμπος Μουτσόπουλος, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας
- Steven Levene, Richard Donnelly, 2008, Έκδοση 2<sup>η</sup>, Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2, Εκδόσεις Βήτα

## ΑΓΓΛΙΚΗ:

- Burchell, A., Cohen, P.T.W. & Cohen, P. (1976) FEBS Lett. **67**, 17 – 22
- Burger D., Cox, J.A. Fischer, E.H. & Stein, E.A. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. **105**, 632 – 635
- Burger, P., Stein, E.A and Cox, J.A. (1983) Free energy coupling in the interactions between  $Ca^{2+}$ , calmodulin, and phosphorylase kinase. J. Biol. Chem., **258**, 14733 - 14739
- Brushia, R.J. & Walsh, D.A. (1999) Frontiers in Bioscience . **4**, 618 - 641
- Carlson, G. M., Bechtel, P. J. and Graves, D. J. (1979) Chemical and regulatory properties of phosphorylase – kinase and Cyclic AMP – dependent protein – kinase. Adv. Enzymol. **50**, 41 – 115
- Chan, K. – F. J. and Graves, D. J. (1984) Molecular properties of phosphorylase kinase In: Calcium and Cell Function, eds Cheung, W. Y., New York, Academic Press, Vol 5, pp. 1 – 31
- Cohen, P. (1973) The subunit structure of rabbit skeletal – muscle phosphorylase kinase and molecular basis of its activation reaction. Eur. J. Biochem. **34**, 1 – 14
- Cohen, P. (1974) Biochem. Soc. Symp. **39**, 51 – 73
- Cohen, P. (1976) Control of Enzyme Activity, Published by Chapman and Hall LTD, 4, 32 - 50
- Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J. G., Cohen, P. T.W., Vanaman, T. C. and Nairn, A. C. (1978) Identification of  $Ca^{2+}$  - dependent modulator protein as 4<sup>th</sup> subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. FEBBS Lett. **92**, 287 – 293
- Cohen, P. (1980) The role of calcium ions, calmodulin and troponin in the regulation of phosphorylase kinase from the rabbit skeletal muscle. Eur. J. Biochem. **111**, 564 – 574
- Cohen, P. (1983a) Phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle. Meth. Enzymol. **99**, 243 – 251
- Cohen, P. (1991) Biochem. Biophys. Acta. **1094**, 292 – 299
- Cooper, R. H., Sul, H. S., McCullough, T. E. and Walsh, D. A. (1980) Purification and properties of the cardiac isoenzyme phosphorylase kinase. J. Biol. Chem. **255**, 11794 – 11801
- Crabb, J. W. and Heilmeyer, L. M. G. (1984) High performance liquid chromatography purification and structural characterization of the subunits of rabbit muscle phosphorylase kinase. J. Biol. Chem. **259**, 6346 – 6350
- Dasgupta, M. and Blumenthal, D. K (1995) Characterization of the regulatory domain of the gamma subunit of the phosphorylase kinase the 2 noncontiguous calmodulin binding subdomains are also autoinhibitory. J. Biol. Chem. **270**, 22283 – 22289

- DeLang , R. J., Kemp, R. G., Riley, W. D., Cooper, R. A. and Krebs, E. G. (1968) Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by adenosine triphosphate and adenosine 3', 5' – monophosphate. *J. Biol. Chem.* **243**, 2200 – 2208
- Edstrom, R. D., Meinke, M. H., Yang, X., Yang, R. & Evans, D. F. (1989) *Biochemistry* **28**, 4939 – 4942
- Edstrom, R. D., Meinke, M. H., Yang, X., Yang, R. Elings, V. & Evans, D. F. (1990a) *Biophys. J.* **58**, 1437 – 1448
- Edstrom, R. D., Meinke, M. H., Yang, X., Yang, R. & Evans, D. F. (1990b) *Ultramicroscopy* **33**, 99 – 106
- Fischer, E. H. and Krebs, E. G. (1962) Muscle phosphorylase b. *Meth. Enzymol.* **5**, 369 – 373
- Grand, R. J., Shenolikar, S. & Cohen, P. (1981) *Eur. J. Biochem.* **113**, 563 – 574
- Gratecos, D., Detwiler, T. C., Hurd, S. & Fischer, E. H. (1977) *Biochemistry*, **16**, 4812 – 4817
- Gross, S. R. and Mayer (1974) Characterization of phosphorylase b to a converting activity in skeletal muscle extracts of mice with the phosphorylase b kinase deficiency mutation. *J. Biol. Chem.* **249**, 6710 – 6718
- Hanks, S. K. & Hunter, T., (1995) *FASEB J.* **9**, 576 – 596
- Hayakawa, T., Perkins, J. P., Walsh, D. A. and Krebs, E. G. (1973) Physicochemical properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *Biochemistry* **12**, 567 – 573
- Heilmeyer, L. M. G., Meyer, F., Haschke, R. H. and Fischer, E. H. (1970) Control of phosphorylase kinase activity in a muscle glycogen particle. Activation by calcium. *J. Biol. Chem.*, **245**, 6649 – 6656
- Heilmeyer, L. M. G., Gerschinski, A. M., Meyer, H. E. and Jennissen, H. P. (1993) Interaction sites of phosphorylase kinase for calmodulin. *Mol. Cell. Biochem.* **127/128**, 19 – 30
- Huang, C. – Y., F, Yuan, C – J, Livanova, B. and Graves D. J. (1993) Expression, purification, characterization, and deletion mutations of phosphorylase kinase  $\gamma$  subunit: identification of an inhibitory domain in the  $\gamma$  subunit. *Mol. Cell. Biochem.* **127 – 128**, 7 - 18
- Jennissen, H. P. and Lahr, P. (1980) Calcium – dependent adsorption and desorption of phosphorylase kinase of membrane fractions of sarcoplasmic reticulum. *FEBS. Lett.* **121**, 143 – 148
- Johnson, L. N., Hadju, J., Acharya, K. R., Stuart, D. I., McLauhlin, P. J., Oikonomakos, N. G. & Barford, D. (1989) Glycogen phosphorylase b. In *Allosteric Enzymes* (Herve, G., ed.), pp 81 – 127, Crc Press, Boca Raton, Florida
- Johnson, L. N. (1992) *FASEB J.* **6**, 2274 – 2282

- Johnson, L. N., Noble, M. E. M. & Owen, D. J. (1996) *Cell*. **85**, 149 – 158
- Khoo, J. C. (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, 422, 87
- Killiman, M. W. & Heilmeyer, L. M. G. (1982) *Biochemistry* **21**, 1727 – 1739
- Killiman, M. W., Zander, N. F., Kuhn, C. C., Crabb, J. W., Meyer, H. E. and Heilmeyer, L. M. G. (1988) The  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of phosphorylase kinase are homologous cDNA cloning and primary structure of the  $\beta$  subunit. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **85**, 9381 – 9385
- King, M. M. and Carlson, G. M. (1981) Affinity labeling of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase by 5' (fluorosulfonylbenzoyl)adenosine. *Biochemistry* **20**, 4282 – 4387
- King, M. M., Carlson, G.M. and Haley (1982 $\alpha$ ) *J. Biol. Chem.* **257**, **23**, 14058 – 14065
- King, M. M. and Carlson, G.M. (1982 $\beta$ ) *FEBS Lett.* **140**, **1**, 131 - 134
- King, M. M., Fitzgerald, T. and Carlson, G. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 9925 – 9930
- Krebs, E. G., Graves, D. J. & Fischer, E. H. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 2867 – 2873
- Krebs, E. G., Love, D. S., Bratvold, G. E., Trayser, K. A., Meyer, W. L. and Fischer, E. H. (1964) Purification and properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *Biochemistry* **3**, 1022 – 1033
- Krebs, E.G., (1985) *Biochemical Society Transactions*. **13**
- Kretsinger, R. H., Rudnick, S. E. and Weissman, L. J. (1986) Crystal structure of calmodulin *J. Inorgan. Biochem.* **28**, 289 – 302
- Lowe, E. D., Noble, M. E. M., Skamnaki, V. T., Owen, D. J., Oikonomakos, N. G. Johnson, L. N. (1997) *EMBO J.* **16**, 6646 – 6658
- Malencic, D. A. and Fischer, E. H. (1982) Structure, function and regulation of phosphorylase kinase In: *Calcium and Cell function*, ed Cheung W. Y., Vol. 3., Academic Press, New York, pp. 161 – 181
- Melpidou, A. E. & Oikonomakos, N. G. (1983) *FEBS Lett.* **154**, 105 – 110
- Meyer, F., Heilmeyer, L. M. G., Haschke, R. H. and Fischer, E. H. (1970) Control of phosphorylase kinase activity in a muscle glycogen particle. Isolation and characterization of protein glycogen complex *J. Biol. Chem.* **245**, 6642 – 6648
- Stevens SJ, Morral AR, editors. *Adolescent Substance Abuse Treatment in the United States: Exemplary Models from a National Evaluation Study*. New York: Haworth Press; 2003.
- Oikonomakos N. G., Acharya K. R. & Johnson L. N. (1992) *Post-Translational Modifications of Proteins*, Harding J. J. & Crabbe M. J. C. eds, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-127.

- Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V. T., Tsitsanou, K. E., Gavalas, N. G. & Johnson, L. N. (2000) A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* **8**, 575 – 584
- Owen, D. J., Papageorgiou, A. C., Garman, E. F., Noble, M. E. M. and Jonson L. N. (1995) Expression, purification and crystallization oh phosphorylase kinase catalytic domain. *J. Mol. Biol.* **246**, 374 – 381
- Ozawa, E., Hosoi, K. and Ebashi, S. (1967) Reversible stimulation of muscle phosphorylase b kinase by low concentrations of calcium ions. *J. Biochem.* **61**, 531 – 533
- Paudel, H. K. and Carlson, G. M. (1987) Inhibiton of the catalytic subunit of phosphorylase kinase by its  $\alpha/\beta$  subunits. *J. Biol. Chem.* **262**, 11912 – 11915
- Paudel, H. K., Zwiers, H. and Wang, J. H. (1993) Phosphorylase kinase phosphorylates the calmodulin – binding regulatory regions of neuronal tissue – specific proteins B -50 (GAP – 43) and neurogranin. *J. Biol. Chem.* **268**, 6207 – 6213
- Paudel, H. K. (1997) The regulatory Ser<sup>262</sup> of microtubule – associated protein Tau is phosphorylated by phosphorylase kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 1777 – 1785
- Pickett – Gies, C. R. and Walsh, D. A. (1986) Phosphorylase kinase in the *Enzymes* (Edited by Boyer, P. and Krebs, E. G.), **Vol.17**, pp. 395 – 459. Academic Press, Orlando
- Picton, C., Klee, C. B. and Cohen, P. (1981) The regulation of muscle phosphorylase kinase by calcium ions, calmodulin and troponin C. *Cell Calcium* **2**, 281 – 294
- Reaven GM (1988) Role of insulin resistance in human disease, *Diabetes*
- Reddy, S. and Aggarwal B. A. (1993) Curmumin is a non – competitive inhibitor of phoshorylase kinase. *FEBS Lett.* **341**, 19 – 22
- Saktor, B., Wu, N., Lescure, O. and Reed, W. D. (1974), *Biochem. J.* **137**, 535
- Sanchez, V. E. and Carlson, G. M. (1993) Isolation of autoinhibitory region from the regulatory  $\beta$  – subunit of phosphorylase kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 17889 – 17895
- Schramm, H. J. and Jennissen, H. P. (1982) *Abstr. Commun. 12<sup>th</sup> Int. Congr. Biochem.* Perth, p. 126
- Sclander, K. K., Thysseril, T. J. and Hegazy, M. G. (1988) Calcium – dependent phosphorylation of bovine Cardiac C – protein by phosphorylase kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 45 – 51
- Sotiroudis, T. G. , and Nikolaropoulos, S. (1984) Selective labelling of phosphorylase kinase with fluorescein isothiocyanate *FEBS Lett.* **176**, 421 -425
- Sotiroudis, T. G., Zevgolis, V. G. and Evangelopoulos, A. E. (1991) Control of cellular activity by protein phosphorylation – dephosphorylation: phosphorylase kinase from bovine stomach smooth muscle. In *Biological Signal Transduction* eds Ross, E. M. M. and Wirtz, K. W. A., Vol. H52, pp. 309 – 320 NATO ASI Series, Springer – Verlag, Berlin



- Tabatai, L. B. and Graves , D. J. (1978) Kinetic mechanism and specificity of the phosphorylase kinase reaction. *J. Biol. Chem.* **257**, 14907 – 14913
- Taira, T., Kii, R., Sakai, K., Tabuchi, H., Takimoto, S., Nakamura, S., Takahashi, J., Hashimoto, E., Yamamura, H. and Nishizuka (1982) Comparison of glycogen phosphorylase kinase isoenzyme. *J. Biochem.* **91**, 883 – 888
- Walsh, D. A., Perkins, J. P., Brostrom, C. O., Ho, E. S. and Krebs, E. G. (1971) Catalysis of phosphorylase kinase activation reaction. *J. Biol. Chem.* **246**, 1968 – 1976
- Wang, J. H., Stull, J. T., Huang, T – S., and Krebs, E. G. (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 15, 4521 – 4527
- Yeaman, S. J. and Cohen , P. (1975), *Eur. J. Biochem.* **51**, 93
- Yeaman, S. J., Cohen, P. Watson, D. C. and Dixon, G. H. (1977) *Biochem. J.* **162**, 411
- Yuan, C. J. & Graves, D.J. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **274**, 317 – 326
- Zander, N. F., Meyer, H. E., Hoffmann – Pororshe, E., Crabb. J. R., Heilmeyer, L. M. G. & Kilimann, M. W. (1998) *P. N. A. S. USA* **85**, 2929 – 2933