



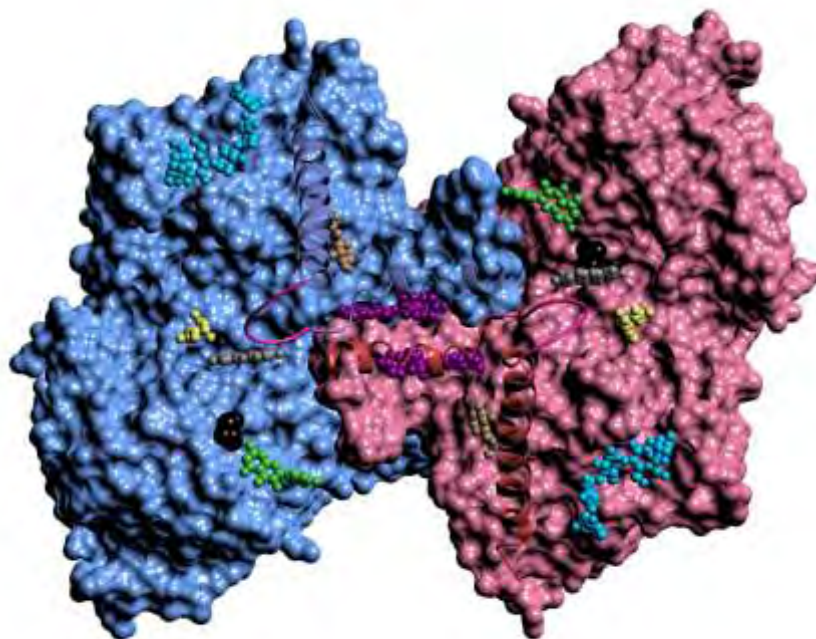
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΔΕΣΗ ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΦΩΣΦΟΥΛΑΣΗ
ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**



ΚΕΥΣΕΝΙΔΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΛΑΡΙΣΑ, 2018

**ΣΥΝΔΕΣΗ ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ
ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**

**THE BINDING OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS ON GLYCOGEN
PHOSPHORYLASE THROUGH KINETIC STUDIES**

**ΣΥΝΔΕΣΗ ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ
ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**

ΟΝΟΜΑ: ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΕΥΣΕΝΙΔΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ**

**ΜΑΡΙΑ ΚΟΝΤΟΥ: ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ ΕΛΛΑΔΑ**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ: ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ ΕΛΛΑΔΑ**

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	6
I. Περίληψη.....	7
II. Abstract	7
1. Εισαγωγή	9
1.1 Ομοιόσταση γλυκόζης	9
1.1.1 Ινσουλίνη	9
1.1.2 Γλυκαγόνη.....	11
1.2 Σακχαρώδης διαβήτης.....	11
1.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1	12
1.2.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2	12
1.2.3 Γλυκογόνο – Μεταβολισμός του γλυκογόνου	13
1.2.3.1 Σύνθεση του γλυκογόνου	13
1.2.3.2 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου	14
1.3 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	16
1.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	16
1.4.1 Δομή και δραστικότητα ισομορφών της <i>GP</i>	18
1.4.2 Η φωσφορική πυριδοξάλη.....	20
1.4.3 Ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	22
1.4.3.1 Καταλυτικό κέντρο	23
1.4.3.2 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου.....	23
1.4.3.3 Κέντρο αναστολής	24
1.4.3.4 Αλλοστερικό κέντρο.....	24
1.4.3.5 Νέο αλλοστερικό κέντρο.....	25
1.4.3.6 Κέντρο πρόσδεσης κερσετίνης.....	25
1.5 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων	26
1.5.1 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων.....	28
1.6 Αλλοστερισμός	33
1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα και κινητικές μελέτες	34
1.6.1.1 Το πρότυπο του <i>Hill</i>	35
1.7 Ετεροκυκλικές ενώσεις ως αναστολείς της <i>GP</i>	36
1.8 Σκοπός	38

2. Υλικά και Μέθοδοι	39
2.1 Αντιδραστήρια	39
2.2 Οργανολογία.....	40
2.3 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών - Πηκτώματα.....	40
2.3.1 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών	40
2.3.2 Χρώση πηκτώματος.....	43
2.4 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford	43
2.5 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων (<i>rmGPb</i>)	44
2.6 Κινητικές μελέτες έναντι της <i>GP</i>	47
2.6.1 Καθαρισμός γλυκογόνου από νουκλεοτίδια	48
2.6.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φωσφορικών ιόντων.....	48
2.6.3 Ενζυμικό διάλυμα.....	49
2.6.4 Διαλύματα υποστρωμάτων και πειραματική διαδικασία.....	49
2.6.5 Πειραματική πορεία κινητικών μελετών	50
2.6.6 Προσδιορισμός της IC_{50}	51
2.6.7 Προσδιορισμός της K_i	52
2.6.8 Έλεγχος ύπαρξης συναγωνισμού για κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου	53
2.6.8.1 Έλεγχος συναγωνισμού μεταξύ αναστολέα GB-P2-4i και καφεΐνης.....	53
2.6.8.2 Έλεγχος συναγωνισμού μεταξύ αναστολέα <i>GB-P2-4i</i> και <i>AMP</i>	55
2.6.9 Ανάλυση κινητικών δεδομένων	57
3. Αποτελέσματα.....	60
3.1 Απομόνωση και καθαρισμός της <i>rmGPb</i>	60
3.2 Κινητικές μελέτες	60
3.2.1 Προσδιορισμός της K_M της <i>rmGPb</i>	60
3.2.2 Προσδιορισμός της K_i του GB-P2-4i	61
3.2.3 Έλεγχος συναγωνισμού	62
3.2.3.1 Έλεγχος συναγωνισμού GB-P2-4i/caffeine	62
3.2.3.2 Έλεγχος συναγωνισμού GB-P2-4i/ AMP	63
4. Συζήτηση.....	64
5. Βιβλιογραφία	66

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Ιούλιο έως το Μάρτιο του 2018. Στην ομαλή εκπόνηση και συγγραφή αυτής της εργασίας συνέβαλαν αρκετά άτομα, τα οποία και θεωρώ απαραίτητο να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Βιοχημείας Δρ Δημήτριο Λεωνίδα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποίησα την διπλωματική μου εργασία. Η επιστημονική γνώση του, η καθοδήγηση και η βοήθεια του διαδραμάτισαν καταλυτικό ρόλο στην ομαλή ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, Δρ Μαρία Κοντού και Δρ Βασιλική Σκαμνάκη για τη δική τους, πολύτιμη συμβολή και βοήθεια.

Σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της εργασίας μου διαδραμάτισε το ιδιαίτερα φιλικό και ευχάριστο κλίμα του εργαστηρίου. Ευχαριστώ λοιπόν, όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη συμβολή τους στην ομαλή ένταξη και προσαρμογή μου στο εργαστήριο. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Ευθύμιο Κυριάκη. Τον ευχαριστώ για την συνεχή ενθάρρυνση του, την απεριόριστη υπομονή του, καθώς και την προθυμία του να λύσει κάθε απορία μου. Ένα ακόμη μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ Γεώργιο Στραβοδότη για τη γενναιόδωρη βοήθεια, την καθοδήγηση και τη συνεχή στήριξη που μου προσέφερε. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Θεοδώρα Σολοβού και Όλγα Παπαϊωάννου, που ήταν πάντοτε πρόθυμες να με συμβουλέψουν και να απαντήσουν σε κάθε ερώτησή μου, καθώς και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Αναστασία Γκούσκου, Συμεών Κούλα, Αναστασία Τσαγκαράκου, αλλά και τις προπτυχιακές φοιτήτριες Αγγελική Εξάρχου και Τζούλια Λέκα, των οποίων οι συμβουλές υπήρξαν πολύτιμες και η συνεργασία μαζί τους ιδανική.

Κλείνοντας, δε μπορώ να μην αναφερθώ στην οικογένειά μου. Σε αυτούς οφείλω το μεγαλύτερο ευχαριστώ, διότι είναι οι άνθρωποι που μου παρείχαν τη μέγιστη υποστήριξη και την ψυχολογική ενθάρρυνση κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και όλα τα χρόνια των προπτυχιακών σπουδών μου.

I. Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί σοβαρή απειλή για την υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το Διαβήτη (*International Diabetes Federation, IDF*), εκτιμάται ότι το 2017 νοσούσαν παγκοσμίως 451 εκατομμύρια άτομα ενώ αναμένεται να φτάσουν τα 693 εκατομμύρια μέχρι το 2045. Συνεπώς, η εύρεση μιας αποτελεσματικής και ασφαλούς θεραπείας αποτελεί επιτακτική ανάγκη. Με στόχο τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι, ώστε μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων να βρεθούν νέα αντι-υπεργλυκαιμικά φάρμακα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*) αποτελεί έναν έγκυρο φαρμακευτικό στόχο για την ανακάλυψη νέων αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων. Το ένζυμο αυτό καταλύει το πρώτο και καθοριστικό βήμα του καταβολισμού του γλυκογόνου προς παράγωγη 1-φωσφορικής γλυκόζης (*G1P*). Η *GP* είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο που ακολουθεί το μοντέλο των *MWC* και διαθέτει τουλάχιστον 6 κέντρα σύνδεσης προσδετών. Στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε την επίδραση μίας ετεροκυκλικής ένωσης (***GB-P2-4i***) ως προς την ικανότητα της να αναστέλλει την *GP*. Η ένωση αυτή είχε σχεδιαστεί με στόχο το κέντρο αναστολής του ενζύμου μέσω μελετών μοριακού μοντελισμού από τον *Dr Joseph Hayes* του Πανεπιστημίου του *Lancashire* ενώ η σύνθεση της έγινε από τον καθηγητή *Goutam Brachmachari* του Πανεπιστημίου *Bharati* της Ινδίας. Προκειμένου να αξιολογήσουμε την ικανότητα της ένωσης να αναστέλλει την *GP*, διεξήχθη αρχικά απομόνωση της *GP* από σκελετικούς μύες κονίκλων (*rmGPb*) και κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής (K_i) ως προς την *rmGPb* με την εφαρμογή του μοντέλου του *Hill* για τα αλλοστερικά ένζυμα. Η K_i υπολογίστηκε σε $85.46 \pm 5.22 \mu\text{M}$. Σύνθετες κινητικές μελέτες απεκάλυψαν πως το κέντρο πρόσδεσης του ***GB-P2-4i*** είναι το κέντρο αναστολής της *GP*.

II. Abstract

Diabetes mellitus is a serious threat to health worldwide. According to the International Diabetes Federation (IDF), it was estimated that in 2017 there were 451 million people with diabetes worldwide and these figures were expected to increase to 693 million by 2045. Therefore, the discovery of an effective and safe treatment for this disease is an imperative need. In order to treat this pathological condition, enzymes and hormones receptors involved in the regulation of blood glucose levels are used as molecular targets for structure-based design of potential antihyperglycaemic drugs. Glycogen phosphorylase (*GP*) is a validated pharmaceutical target for the discovery of new potential anti-hyperglycemic compounds. This enzyme catalyzes the first step of glycogen breakdown to glucose-1-phosphate (*G1P*). *GP* is an allosteric enzyme that conforms to the *MWC* model and has at least six ligand binding sites. In this study, we examined the inhibitory

potential of a heterocyclic compound (**GB-P2-4i**) to *GP*. This compound was designed through molecular docking studies conducted by *Dr Joseph Hayes* of University of Lancashire, whereas its synthesis was performed by Professor *Goutam Brachmachari* of Bharati University in India. To assess the inhibitory potential of the compound, initially, *GP* from rabbit muscle (*rmGPb*) was isolated and purified and then kinetic studies were carried out for the determination of the inhibitory constant (K_i) by using the *Hill's* model for allosteric enzymes. K_i was determined at $85.46 \pm 5.22 \mu\text{M}$. Multiple inhibitor studies revealed that the binding site of **GB-P2-4i** was the inhibitor site of *GP*.

1. Εισαγωγή

1.1 Ομοιόσταση γλυκόζης

1.1.1 Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η ινσουλίνη συντίθεται στα β-κύτταρα του παγκρέατος με τον συνήθη μηχανισμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Αρχικά σχηματίζεται μια προορμόνη, η προϊνσουλίνη που αποτελείται από τρεις πεπτιδικές αλυσίδες A, B και C. Το μεγαλύτερο μέρος της προϊνσουλίνης κόβεται, περαιτέρω, σε μικρότερα κομμάτια στη συσκευή *Golgi* και έτσι παράγεται η ινσουλίνη, αποτελούμενη από τις αλυσίδες A και B, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Για την έναρξη των επιδράσεων της ινσουλίνης στα κύτταρα-στόχους, η ινσουλίνη συνδέεται πρώτα σε έναν πρωτεϊνικό υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης και τον ενεργοποιεί. Οι επακόλουθες επιδράσεις προκαλούνται από αυτόν τον ενεργοποιημένο υποδοχέα και όχι από την ινσουλίνη. Ο υποδοχέας για την ινσουλίνη αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς: δύο άλφα υπομονάδες που βρίσκονται εντελώς έξω από την κυτταρική μεμβράνη και δύο βήτα υπομονάδες που διαπερνούν τη μεμβράνη και το ένα άκρο τους προεξέχει μέσα στο κυτόπλασμα του κυττάρου. Η ινσουλίνη συνδέεται με τις α- υπομονάδες, εξαιτίας όμως των δεσμών με τις β-, τα τμήματα των β- υπομονάδων που προεξέχουν προς το εσωτερικό του κυττάρου υφίστανται αυτοφωσφορυλίωση. Η αυτοφωσφορυλίωση ενεργοποιεί μια τοπική κινάση της τυροσίνης, η οποία με τη σειρά της προκαλεί φωσφορυλίωση αρκετών άλλων ενδοκυττάρων ενζύμων. Με αυτόν τον έμμεσο τρόπο, η ινσουλίνη κατευθύνει τον ενδοκυττάριο μεταβολικό μηχανισμό για να προκαλεί τις επιθυμητές επιδράσεις στον μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών. Αμέσως μετά από ένα γεύμα με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, η γλυκόζη που απορροφάται προκαλεί ταχεία έκκριση ινσουλίνης, η οποία με τη σειρά της προκαλεί ταχεία πρόσληψη, αποθήκευση και χρησιμοποίηση γλυκόζης από όλους σχεδόν τους ιστούς του σώματος, αλλά ιδιαίτερα από τους μύες, τον λιπώδη ιστό και το ήπαρ, όπως αναλύεται παρακάτω. Κατά το μεγαλύτερο μέρος της ημέρας, ο μυϊκός ιστός δεν εξαρτάται από τη γλυκόζη για την παροχή ενέργειας αλλά από τα λιπαρά οξέα. Για λίγες ώρες μετά από ένα γεύμα ωστόσο, η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα είναι υψηλή, ενώ το πάγκρεας εκκρίνει μεγάλα ποσά ινσουλίνης, γεγονός που συμβάλλει στην ταχεία μεταφορά γλυκόζης στα μυϊκά κύτταρα, τα οποία αναγκάζονται να χρησιμοποιούν γλυκόζη έναντι των λιπαρών οξέων για αυτό το χρονικό διάστημα. Εάν οι μύες δεν λειτουργούν κατά το χρονικό διάστημα που ακολουθεί το γεύμα, τότε το μεγαλύτερο ποσό της γλυκόζης που μεταφέρεται προς το εσωτερικό των μυϊκών ινών, αντί να χρησιμοποιείται για την άμεση απόδοση

ενέργειας μετατρέπεται και εναποτίθεται σε αυτές με τη μορφή γλυκογόνου. Το γλυκογόνο αυτό μπορεί να χρησιμοποιείται αργότερα για να παρέχει ενέργεια στον μυ.

Μία από τις σημαντικότερες επιδράσεις της ινσουλίνης είναι η προαγωγή της αποθήκευσης του μεγαλύτερου μέρους της γλυκόζης που απορροφάται από το έντερο μετά από το γεύμα σχεδόν αμέσως στο ήπαρ, με τη μορφή γλυκογόνου. Στη συνέχεια, στα χρονικά διαστήματα μεταξύ των γευμάτων, όταν δεν υπάρχει διαθέσιμη τροφή και η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα αρχίζει να ελαττώνεται, η έκκριση της ινσουλίνης ελαττώνεται ταχέως και το γλυκογόνο του ήπατος αρχίζει να διασπάται προς γλυκόζη, που αποδίδεται προς το αίμα για τη διατήρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε ικανοποιητικό επίπεδο. Όταν η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα είναι μεγαλύτερη από αυτήν που μπορεί να αποθηκεύεται με τη μορφή γλυκογόνου ή να χρησιμοποιηθεί από τον τοπικό ηπατικό μεταβολισμό, η ινσουλίνη προάγει τη μετατροπή αυτής της περίσσειας της γλυκόζης σε λιπαρά οξέα. Αυτά στη συνέχεια “δεματοποιούνται” με τη μορφή τριγλυκεριδίων σε λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας και μεταφέρονται στον λιπώδη ιστό, όπου αποθηκεύονται με τη μορφή λίπους. Η ινσουλίνη επίσης αναστέλλει τη γλυκονεογένεση. Αυτό πραγματοποιείται κυρίως με την ελάττωση του ποσού και της δραστηριότητας των ηπατικών ενζύμων που απαιτούνται για τη γλυκονεογένεση. Η ινσουλίνη, επίσης, αυξάνει τη μεταφορά της γλυκόζης στα περισσότερα κύτταρα του σώματος, καθώς και τη χρησιμοποίησή της από αυτά με τον ίδιο τρόπο που επιδρά στη μεταφορά και χρησιμοποίηση της γλυκόζης στα μυϊκά κύτταρα. Η μεταφορά της γλυκόζης στα λιποκύτταρα είναι απαραίτητη για την απόδοση του γλυκερολικού τμήματος των μορίων του λίπους. Κατά συνέπεια, η ινσουλίνη έμμεσα προάγει την εναπόθεση λίπους σε αυτά τα κύτταρα. Όλες οι διεργασίες που αφορούν στη διάσπαση του λίπους και τη χρησιμοποίησή του για παροχή ενέργειας ενισχύονται σε μεγάλο βαθμό από την απουσία ινσουλίνης. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται ακόμα και φυσιολογικά στα χρονικά διαστήματα μεταξύ των γευμάτων, όταν η έκκριση της ινσουλίνης βρίσκεται στο χαμηλότερο επίπεδο, φτάνει όμως στο αποκορύφωμα του στον σακχαρώδη διαβήτη όταν η έκκριση της ινσουλίνης είναι μηδενική. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II (ΣΔ2) σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση της ινσουλίνης στο πλάσμα (υπερινσουλιναιμία). Αυτό οφείλεται στην αντιρροπιστική απάντηση των β-κυττάρων του παγκρέατος, ώστε να μειωθεί η ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης, μια κατάσταση που ονομάζεται αντίσταση στην ινσουλίνη. Η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελεί μέρος μιας σειράς διαταραχών που καλείται «μεταβολικό σύνδρομο», το οποίο αποτελείται από χαρακτηριστικά που είναι άμεσα συνδεδεμένα με την υπερβολική αύξηση του βάρους. Κατά την παρατεταμένη και έντονη αντίσταση στην ινσουλίνη, ακόμα και τα αυξημένα επίπεδα της ινσουλίνης δεν επαρκούν για τη διατήρηση της γλυκόζης

στα φυσιολογικά επίπεδα. Στα επόμενα στάδια του ΣΔ2, ακολουθεί εξάντληση των παγκρεατικών β-κυττάρων, τα οποία δεν μπορούν να συνθέσουν αρκετή ινσουλίνη ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση σοβαρής υπεργλυκαιμίας. Σε πολλές περιπτώσεις, ο ΣΔ2 αντιμετωπίζεται, κατά τα πρώιμα στάδια του τουλάχιστον, με σωματική άσκηση, θερμιδικό περιορισμό και απώλεια σωματικού βάρους, χωρίς εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης. Φάρμακα που αυξάνουν την ιστική ευαισθησία προς την ινσουλίνη (θειαζολιδινεδιόνες), φάρμακα που καταστέλλουν την παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ (μετφορμίνη) ή φάρμακα που ενισχύουν την απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας (σουλφονουρίες), μπορούν επίσης να χορηγηθούν. Πα'όλα αυτά, στα τελικά στάδια, η χορήγηση ινσουλίνης είναι συχνά απαραίτητη για τη ρύθμιση της γλυκόζης του πλάσματος. [1]

1.1.2 Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη είναι ορμόνη που εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων του *Langerhans* όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ελαττώνεται και οι λειτουργίες της είναι εκ διαμέτρου αντίθετες από αυτές της ινσουλίνης. Οι κύριες επιδράσεις της στον μεταβολισμό του γλυκογόνου είναι η διάσπαση του γλυκογόνου του ήπατος (γλυκογονόλυση) και η αύξηση της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ. Η ικανότητα της γλυκαγόνης να προκαλεί γλυκογονόλυση στο ήπαρ, η οποία με τη σειρά της αυξάνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα σε λίγα μόνο λεπτά, γίνεται με μια σειρά από αλυσιδωτές αντιδράσεις. Αρχικά, η γλυκαγόνη ενεργοποιεί την αδενυλοκυκλάση στη μεμβράνη των ηπατοκυττάρων και προκαλεί τον σχηματισμό κυκλικής *AMP* (*cAMP*). Ακολουθεί μια διαδοχική ενεργοποίηση των πρωτεϊνών πρωτεϊνική κινάση *A* (*PKA*), κινάση της φωσφορυλάσης (*PhK*), η οποία μετατρέπει τη φωσφορυλάση β σε φωσφορυλάση α, και φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*), η οποία προάγει τη διάσπαση του γλυκογόνου και τελικά η γλυκόζη απελευθερώνεται από τα ηπατικά κύτταρα. [1]

1.2 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης αναφέρεται σε μια ομάδα ετερογενών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από βλάβες στο μεταβολισμό της γλυκόζης, που οδηγεί σε αυξήσεις των επιπέδων σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία). Ο διαταραγμένος μεταβολισμός της γλυκόζης μπορεί να είναι αποτέλεσμα είτε της ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε της ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης. Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια νόσος και μπορεί να προκαλέσει μια σειρά σοβαρών επιπλοκών, όπως καρδιαγγειακή νόσο, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, βλάβες του αμφιβληστροειδούς, βλάβες των νεύρων, στυτική δυσλειτουργία. [2, 3]

Ο διαβήτης αποτελεί σοβαρή απειλή για την παγκόσμια υγεία καθώς και τεράστιο κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για τον

Διαβήτης (*International Diabetes Federation, IDF*), εκτιμάται ότι το 2017 έπασχαν 451 εκατομμύρια άτομα (ηλικίας 18-99 ετών) από διαβήτη παγκοσμίως. Οι αριθμοί αυτοί αναμένεται να αυξηθούν στα 693 εκατομμύρια μέχρι το 2045. Εκτιμάται ότι σχεδόν το ήμισυ του συνόλου των ανθρώπων (49,7%) που ζουν με διαβήτη δεν έχουν διαγνωσθεί. Επιπλέον, υπολογίστηκε ότι 374 εκατομμύρια άτομα εμφάνισαν μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη (*IGT*) παγκοσμίως και ότι σχεδόν 21,3 εκατομμύρια γεννήσεις επηρεάστηκαν από κάποια μορφή υπεργλυκαιμίας κατά την εγκυμοσύνη. Το 2017, περίπου 5 εκατομμύρια θάνατοι παγκοσμίως οφείλονταν στον διαβήτη στην ηλικιακή κλίμακα των 20 ετών. Οι συνολικές δαπάνες για την υγειονομική περίθαλψη σε άτομα με διαβήτη υπολογίστηκαν στα 850 δισεκατομμύρια δολάρια το 2017. [4]

Οι δύο πιο κοινές μορφές σακχαρώδους διαβήτη είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔ1) και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2).

1.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1

Ο ΣΔ1 εμφανίζεται συνήθως σε παιδιά και εφήβους ως αποτέλεσμα της αυτοάνοσης μεσολαβούμενης καταστροφής παγκρεατικών β κυττάρων που οδηγεί σε απόλυτη εξάρτηση από την ινσουλίνη και σε υπεργλυκαιμία. Η καταστροφή των β κυττάρων θεωρείται ότι συμβαίνει μέσω ενός συνδυασμού περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων. Μελέτες που δημοσιεύθηκαν το 2012 έχουν επίσης τονίσει τη σημασία των περιβαλλοντικών παραγόντων για την ανάπτυξη της διαβητικής νεφροπάθειας. Ο ΣΔ1 αντιπροσωπεύει περίπου το 10% των περιπτώσεων σακχαρώδους διαβήτη παγκοσμίως και παρατηρείται κυρίως στα δυτικά κράτη. [3]

1.2.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Ο ΣΔ2 αντιπροσωπεύει περίπου το 85% των περιπτώσεων σακχαρώδους διαβήτη παγκοσμίως. Η αύξηση του αριθμού των διαγνώσεων του ΣΔ2 παρατηρήθηκε ταυτόχρονα με την αύξηση της παχυσαρκίας στις δυτικές κοινωνίες. Το ποσοστό των διαγνώσεων ατόμων με ΣΔ2 υπολογίζεται στο 7% του παγκόσμιου πληθυσμού, με τον αριθμό των νέων που νοσούν να αυξάνεται όλο και περισσότερο. Στον μη ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη, τα μυϊκά και λιπώδη κύτταρα είναι «ανθεκτικά» στις δράσεις της ινσουλίνης και οι αντισταθμιστικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται στο β-κύτταρο για να εκκρίνουν περισσότερη ινσουλίνη δεν επαρκούν για τη διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα σε φυσιολογικά επίπεδα. Επομένως, παρά την παρουσία ινσουλίνης στους περισσότερους ασθενείς με ΣΔ2, η γλυκόζη δεν μπορεί να μεταφερθεί επαρκώς και να αποθηκευτεί ενδοκυτταρικά, γεγονός που οδηγεί σε υπεργλυκαιμία. Υπερβολική παραγωγή ηπατικής γλυκόζης είναι επίσης παρούσα σε ασθενείς με ΣΔ2, γεγονός που επιδεινώνει την υπεργλυκαιμία. Παρόλο που οι συνέπειες της αυτοανοσολογικής καταστροφής των παγκρεατικών β-κυττάρων είναι σαφείς, οι αιτίες παραμένουν

ασαφείς και δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί οι περιβαλλοντικοί παραγόντες που προκαλούν αυτήν την καταστροφή. Ο ΣΔ2 προκαλεί τύφλωση και προβλήματα στους νεφρούς ενώ οι ασθενείς παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου. Τα φάρμακα για τη θεραπεία της νόσου εμφανίζουν πολλές ανεπιθύμητες παρενέργειες, μεταξύ των οποίων και η υπογλυκαιμία. Συνεπώς, υπάρχει άμεση ανάγκη για νέες αποτελεσματικότερες θεραπείες. Η δυσλειτουργία ινσουλίνης στο ήπαρ είναι ο κυρίαρχος παράγοντας για τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η ηπατική γλυκόζη παράγεται τόσο με γλυκογονόλυση όσο και με γλυκονεογένεση. Η γλυκογονόλυση περιλαμβάνει τη διάσπαση του γλυκογόνου και αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 70% της παραγωγής γλυκόζης. Ως εκ τούτου, ο έλεγχος της δράσης ενζύμων που συμμετέχουν στη γλυκογονόλυση είναι μια υποσχόμενη προσέγγιση για τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης αίματος στον ΣΔ2. [3, 5, 17]

1.2.3 Γλυκογόνο – Μεταβολισμός του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο, διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει γλυκόζη όταν ο οργανισμός χρειάζεται ενέργεια. Τα περισσότερα κατάλοιπα γλυκόζης στο γλυκογόνο συνδέονται μεταξύ τους με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ υπάρχουν και διακλαδώσεις περίπου σε κάθε δέκατο κατάλοιπο, οι οποίες σχηματίζονται από α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το γλυκογόνο δεν είναι τόσο πλούσιο σε ενέργεια όσο τα λιπαρά οξέα, αλλά αποτελεί ένα σημαντικό απόθεμα ενέργειας. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς, το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, γεγονός πολύ σημαντικό καθώς η γλυκόζη είναι ουσιαστικά το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιείται από τον εγκέφαλο, εκτός από την περίπτωση παρατεταμένης ασιτίας. Επιπλέον, η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως, αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας για ξαφνική και έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Παρόλο που η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ παρά στους μύες, περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύες συνολικά, λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους. Στο ήπαρ, η σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού στο σύνολο του. Αντίθετα, στους μύς οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών μόνο. [6]

1.2.3.1 Σύνθεση του γλυκογόνου

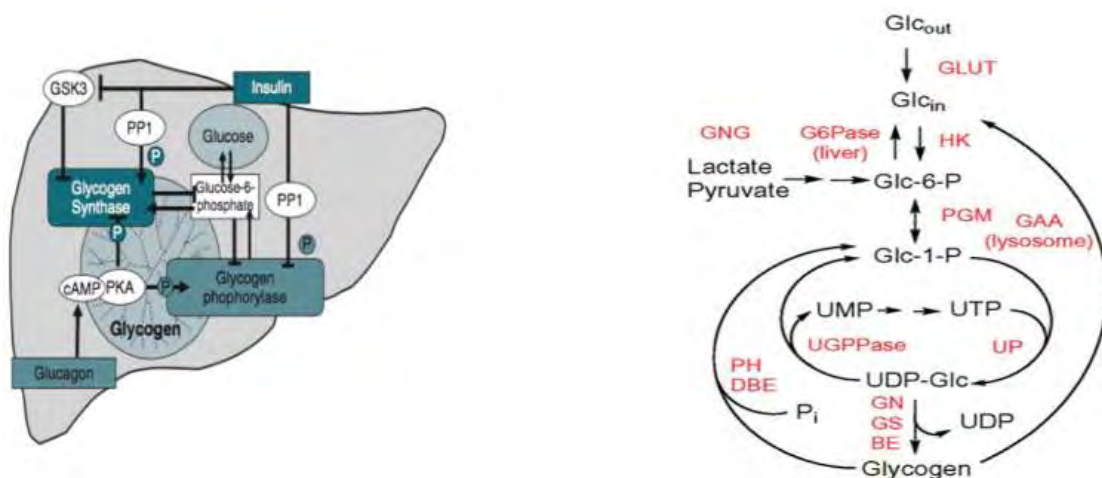
Η σύνθεση του γλυκογόνου χρειάζεται μια ενεργοποιημένη μορφή της γλυκόζης, την ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (*UDP-γλυκόζη*), η οποία παράγεται από την

αντίδραση της *UTP* και της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η *UDP*-γλυκόζη προστίθεται στο μη αναγωγικό άκρο του γλυκογόνου. Η γλυκογονίνη είναι αυτή η οποία ξεκινά τη σύνθεση του γλυκογόνου μέσω αυτογλυκοσυλίωσης, μεταφέροντας γλυκόζη από την *UDP*-γλυκόζη προς τον εαυτό της και σχηματίζοντας μια μικρή γραμμική αλυσίδα περίπου 10-20 μονάδων γλυκόζης. Η επιμήκυνση αυτής της αρχικής αλληλουχίας γλυκογόνου καταλύεται από τη συνθάση γλυκογόνου, η οποία μεταφέρει ένα τμήμα γλυκοζυλίου από την *UDP*-γλυκόζη στον αναπτυσσόμενο κλάδο του γλυκογόνου, καθώς παρέχει τους α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ανάμεσα στα κατάλοιπα γλυκόζης. Το ένζυμο διακλάδωσης εισάγει σημεία διακλάδωσης στο μόριο του γλυκογόνου, δημιουργώντας α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. [7]

1.2.3.2 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση συνίσταται σε τρία βήματα: i) απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο, ii) ανακατασκευή του υποστρώματος γλυκογόνου για νέα αποικοδόμηση και iii) μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό. Η 6-φωσφορική γλυκόζη που προέρχεται από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου ακολουθεί τρεις κατευθύνσεις: i) είναι το αρχικό υπόστρωμα για τη γλυκόλυση, ii) υφίσταται επεξεργασία με την πορεία των φωσφορικών πεντοζών προς απόδοση *NADPH* και παραγώγων της ριβόζης και iii) μετατρέπεται σε ελεύθερη γλυκόζη προς απελευθέρωση στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτή η μετατροπή λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερη έκταση στο έντερο και τους νεφρούς. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου για να προμηθεύσει 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό χρειάζεται τέσσερις ενζυμικές δράσεις: μία να αποικοδομεί το γλυκογόνο, δύο να ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο ώστε να παραμένει ένα υπόστρωμα για αποικοδόμηση και μία να μετατραπεί το προϊόν καταβολισμού του γλυκογόνου σε μια μορφή κατάλληλη για περαιτέρω μεταβολισμό. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*, *EC* 2.4.1.1), το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, διασπά το γλυκογόνο με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (*P_i*) προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης (*G1P*). Η παραπάνω αντίδραση αναφέρεται ως φωσφορόλυση καθώς ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ *C-1* του τελικού καταλοίπου και *C-4* του γειτονικού διασπάται από το ορθοφωσφορικό. Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μακρομορίου του γλυκογόνου μέχρι να συναντήσει ένα εμπόδιο. Οι γλυκοζιτικοί δεσμοί α -1,6 στα σημεία διακλάδωσης δε διασπώνται από τη φωσφορυλάση, καθώς αυτή σταματά τη διάσπαση των δεσμών α -1,4 όταν φθάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο διακλάδωσης. Επειδή περίπου 1 στα 10 κατάλοιπα βρίσκονται σε διακλάδωση, η αποικοδόμηση του γλυκογόνου με τη φωσφορυλάση θα σταματήσει μετά την απελευθέρωση έξι μορίων γλυκόζης ανά διακλάδωση. Για να συνεχιστεί η αποικοδόμηση με τη φωσφορυλάση, δύο επιπλέον ένζυμα, μια μεταφοράση και μια γλυκοζιτάση δεσμού

α -1,6 ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο. Η μεταφορά μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη. Αυτή η μεταφορά αφήνει εκτεθειμένο ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό α -1,6. Η γλυκοζιτάση, γνωστή επίσης ως το ένζυμο αποδιακλάδωσης, υδρολύει το γλυκοζιτικό δεσμό α -1,6, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης. Αυτό το ελεύθερο μόριο γλυκόζης φωσφορυλιώνεται από το γλυκοζιτικό ένζυμο εξοκινάση. Έτσι, η μεταφορά και το ένζυμο αποδιακλάδωσης μετατρέπουν τη διακλαδισμένη δομή σε γραμμική, γεγονός που ανοίγει τον δρόμο για περαιτέρω διάσπαση από τη φωσφορυλάση. [6]

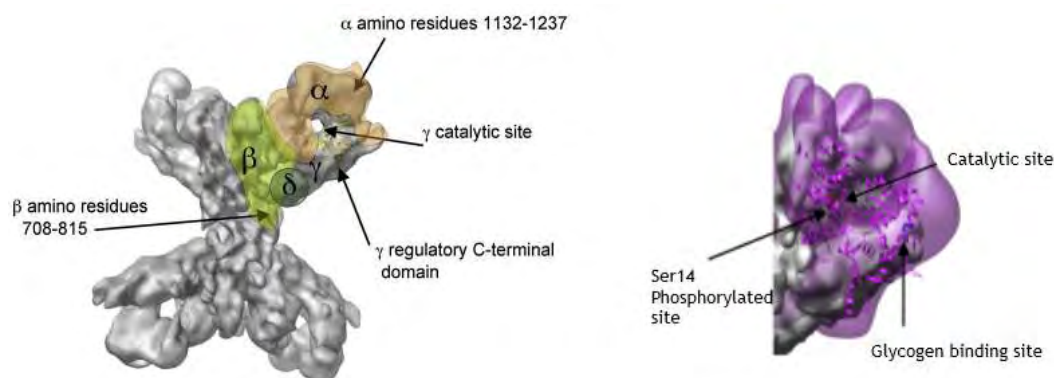


Εικόνα 1: Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται από τις αμοιβαίες δράσεις της συνθάσης και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η γλυκογονόλυση καταλύεται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η οποία ρυθμίζεται θετικά με φωσφορυλίωση και ρυθμίζεται αρνητικά από αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Η σύνθεση γλυκογόνου καταλύεται από τη συνθάση του γλυκογόνου, η οποία ρυθμίζεται θετικά από την ινσουλίνη και αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις με την 6-φωσφορική γλυκόζη. Η ανταγωνιστική δραστηριότητα αυτών των αντίθετων δράσεων καθορίζει εάν το γλυκογόνο συντίθεται ή αποικοδομείται σε γλυκόζη. Glc_{out} εξωκυτταρική γλυκόζη, Glc_{in} ενδοκυτταρική γλυκόζη, HK εξοκινάση, G6Pase γλυκόζη-6-φωσφατάση, PGM φωσφογλυκομουτάση, UP πυροφωσφορυλάση UDP-γλυκόζης. UGPPase πυροφωσφατάση UDP-γλυκόζης, GN γλυκογενίνη, GS συνθάση γλυκογόνου, BE ένζυμο διακλάδωσης, PH φωσφορυλάση γλυκογόνου, DBE ένζυμο αποκοπής, GAA λυσοσωμική α -γλυκοσιδάση, GNG γλυκονογένεση. [8, 9]

Η 1-φωσφορική γλυκόζη που απελευθερώνεται από το γλυκογόνο μπορεί γρήγορα να μετατραπεί σε 6-φωσφορική γλυκόζη, μέσω του ενζύμου φωσφογλυκομουτάση. Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, διότι το απελευθερούμενο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα απέδιδε γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια θα έπρεπε να φωσφορυλιωθεί με την κατανάλωση ενός μορίου *ATP* για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη, φορτισμένη αρνητικά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, δεν είναι δυνατόν να διαχυθεί έξω από το κύτταρο. [6]

1.3 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η κινάση της φωσφορυλάσης (*PhK*, EC 2.7.1.38) του γλυκογόνου είναι το ένζυμο το οποίο τροποποιεί ομοιοπολικά τη *GP*. Είναι μια πολύ μεγάλη πρωτεΐνη με 16 υπομονάδες ($\alpha\beta\gamma\delta$)₄ και μοριακό βάρος 1300 *kDa*. Η καταλυτική δραστηριότητα εντοπίζεται στην υπομονάδα γ , ενώ οι άλλες υπομονάδες έχουν ρυθμιστική λειτουργία. Όπως και το υπόστρωμά της, η *PhK* ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση: η *PhK* μετατρέπεται από μια μορφή χαμηλής δραστηριότητας σε μια υψηλής δραστηριότητας με φωσφορυλίωση της υπομονάδας β . Η ενεργοποίηση της κινάσης καταλύεται από την πρωτεϊνική κινάση *A* (*PKA*), η οποία αρχίζει να λειτουργεί με δράση ενός δεύτερου αγγελιαφόρου, την κυκλική *AMP*. Η *PhK* μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί εν μέρει, από επίπεδα Ca^{2+} της τάξεως του 10^{-6} M. Η υπομονάδα δ είναι η ασβεστιοτροποιογίνη, ένας αισθητήρας ασβεστίου που διεγείρει πολλά ένζυμα στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτός ο τρόπος ενεργοποίησης της κινάσης είναι σημαντικός για τους μύες, όπου το έναυσμα της σύσπασής τους είναι η απελευθέρωση Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Η *PhK* επιτυγχάνει τη μέγιστη δραστηριότητα μόνο ύστερα από φωσφορυλίωση της υπομονάδας β και ενεργοποίηση της υπομονάδας δ με δέσμευση Ca^{2+} . [6]

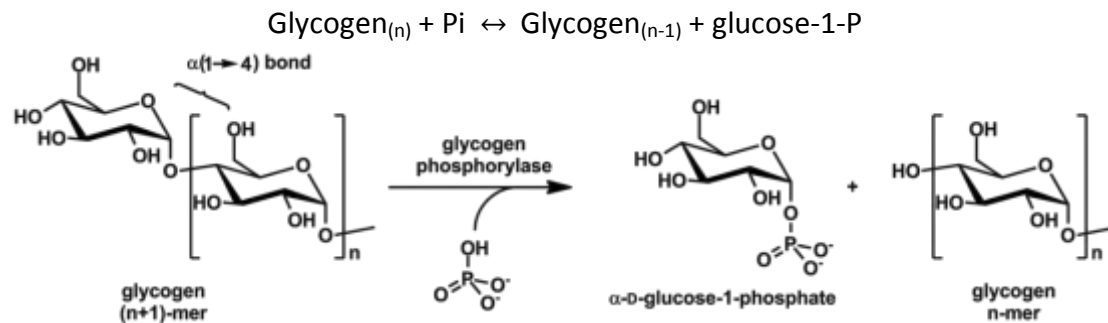


Εικόνα 2: Α) Σχηματική απεικόνιση του ολοενζύμου της *PhK* όπου παρουσιάζονται οι 4 υπομονάδες του, από μελέτες κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του ενζύμου. Β) Απεικόνιση του τρισδιάστατου χάρτη κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της *PhK* (γκρι), με το μονομερές του υποστρώματος της, την *GP* (μωβ). Η *Ser14* παρουσιάζεται με πράσινο χρώμα, το κέντρο πρόσδεσης του γλυκογόνου με μπλε και το καταλυτικό κέντρο με κόκκινο. [10]

1.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

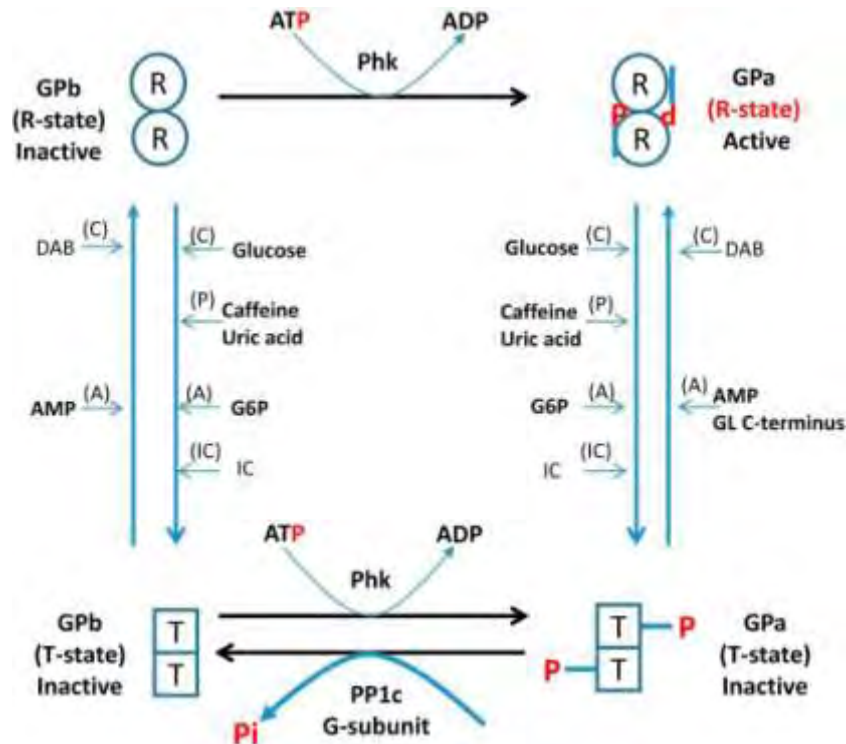
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*, EC 2.4.1.1) είναι το πιο καλά μελετημένο ένζυμο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Καταλύει το βασικό βήμα της αποικοδόμησης του γλυκογόνου για να δώσει 1-φωσφορική α -D-γλυκόζη (*Glc-1-P*) και η δράση της μπορεί να ανασταλεί από τη γλυκόζη και τα ανάλογα της. Η ηπατική φωσφορυλάση γλυκογόνου (*hIGP*) έχει αναγνωριστεί ως ένας νέος στόχος για φάρμακα που ελέγχουν τη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα. Η ενεργοποίηση της *GP* καθορίζει όχι μόνο το ρυθμό αποικοδόμησης του γλυκογόνου αλλά και την αναστολή της ενεργοποίησης της συνθάσης του γλυκογόνου. Επομένως, η ρύθμιση

της δράσης της φωσφορυλάσης είναι ένα σημαντικό γεγονός στον έλεγχο της μεταβολής του γλυκογόνου από εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά σήματα. [11]



Εικόνα 3: Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου [12]

Υπάρχουν τρεις ισομορφές φωσφορυλάσης που κωδικοποιούνται από 3 γονίδια, *PYGL*, *PYGM* και *PYGB* και εκφράζονται σε ήπαρ, μύες και εγκέφαλο αντίστοιχα. Υπάρχει 97 % ομολογία με βάση την αμινοξική αλληλουχία μεταξύ ανθρώπινων και αντίστοιχων ισομορφών των κονίκλων και 80-83 % ομολογία μεταξύ των ηπατικών, των μυϊκών και των εγκεφαλικών ισομορφών. Και οι 3 ισομορφές της φωσφορυλάσης ρυθμίζονται αλλοστερικά με δέσμευση διαφόρων τελεστών και με αναστρέψιμη φωσφορυλίωση της σερίνης-14. Οι φωσφορυλιωμένες και αποφωσφορυλιωμένες μορφές ορίζονται, αντιστοίχως, ως *GP_a* και *GP_b*. Η *GP* υπάρχει σε μια ισορροπία των στερεοδιαμορφώσεων, που αντιπροσωπεύεται από την ενεργή στερεοδιαμόρφωση (χαλαρή ή κατάσταση *R*) και μια αδρανή στερεοδιαμόρφωση (τεταμένη ή κατάσταση *T*). Η κατάσταση *R* έχει υψηλή συγγένεια για υποστρώματα και ορισμένους αλλοστερικούς τελεστές όπως η *AMP*. Η κατάσταση *T* έχει χαμηλή συγγένεια για τα υποστρώματα, το γλυκογόνο και τα ορθοφωσφορικά ιόντα (*P_i*). Η φωσφορυλίωση της σερίνης-14 και η δέσμευση της *AMP* σε ένα "αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης" ευνοεί την κατάσταση *R*. Αυτό το "αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης της *AMP*" το οποίο είναι γειτονικό ως προς τη θέση φωσφορυλίωσης μπορεί να δεσμεύσει προσδέτες, όπως *G6P*, 1-P φρουκτόζη, *ATP*, *APD*, *IMP*. Το καταλυτικό κέντρο δεσμεύει τα υποστρώματα *P_i* και *G1P*, τα οποία αμφότερα σταθεροποιούν την κατάσταση *R* και τη γλυκόζη, η οποία σταθεροποιεί την κατάσταση *T*. Η πρόσδεση του γλυκογόνου σε ένα αλλοστερικό κέντρο ή κέντρο "αποθήκευσης γλυκογόνου" ευνοεί την κατάσταση *R*. Ένα "αλλοστερικό κέντρο αναστολής", κοντά στο καταλυτικό κέντρο, δεσμεύει την καφεΐνη και άλλους προσδέτες. Η δέσμευση προσδετών σε αυτό το κέντρο σταθεροποιεί την κατάσταση *T* μαζί με τη σύνδεση γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο. [13]



Εικόνα 4: Έλεγχος της φωσφορυλάσης με φωσφορυλίωση και αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις. Η κινάση της φωσφορυλάσης (*Phk*) προωθεί τη μετατροπή της *GPb* σε *GPa* με φωσφορυλίωση μιας σερίνης στο *N*-τελικό άκρο της κάθε υπομονάδας του διμερούς. Οι αλλοστερικοί προσδέτες σταθεροποιούν είτε την *R* ή την *T* διαμόρφωση της κάθε μορφής. Οι προσδέτες που σταθεροποιούν την *T* διαμόρφωση περιλαμβάνουν τη γλυκόζη που δεσμεύεται στο καταλυτικό κέντρο (*C*), την καφεΐνη και το ουρικό οξύ που δεσμεύονται σε ένα κέντρο αναστολής (*P*) και η *G6P* που προσδέεται σε μία θέση που επικαλύπτεται με το κέντρο σύνδεσης *AMP*. Οι αναστολείς της *GP* μπορούν να σταθεροποιήσουν είτε την κατάσταση *R* είτε την κατάσταση *T*. Στην κατάσταση *T*, το *N*-τελικό άκρο είναι προσβάσιμο για αποφωσφορυλίωση της σερίνης 14 από την πρωτεϊνική φωσφατάση-1 (*PP1c*) μέσω μιας υπομονάδας που έχει στόχο το γλυκογόνο (υπομονάδα *G*), με αποτέλεσμα τη μετατροπή της *Gpa* σε *Gpb*. [13]

1.4.1 Δομή και δραστηριότητα ισομορφών της *GP*

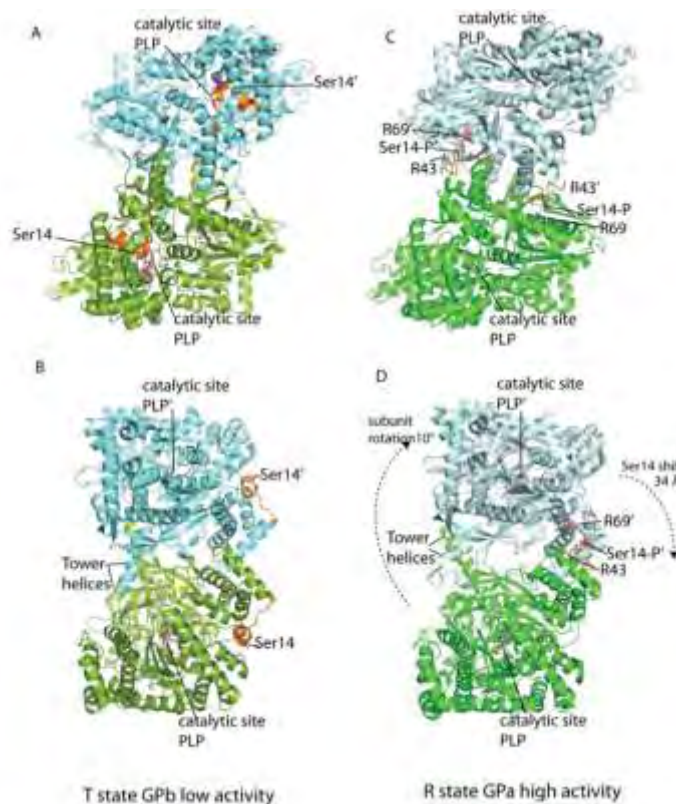
Η μυϊκή φωσφορυλάση είναι ένα διμερές, το οποίο χωρίζεται σε δύο επικράτειες. Η *N*-τελική επικράτεια (κατάλοιπα 1-484) περιλαμβάνει αρκετές ρυθμιστικές περιοχές. Η μία είναι η σερίνη-14, η οποία τροποποιείται με φωσφορυλίωση. Άλλη είναι το αλλοστερικό "κέντρο ενεργοποίησης της *AMP*", όπου προσδέονται η *AMP* και αρκετοί ακόμη προσδέτες, συμπεριλαμβανομένων των 6-φωσφορικής γλυκόζης, *ATP* και 1-φωσφορικής φρουκτόζης. Περιλαμβάνει επίσης το αλλοστερικό κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου και τμήματα των θέσεων του κέντρου αναστολής, του καταλυτικού κέντρου καθώς επίσης και κατάλοιπα της διεπαφής των δύο υπομονάδων (Εικόνα 5). Η *C*-τελική επικράτεια (κατάλοιπα 485-842) περιέχει τη θέση πρόσδεσης του συμπαραγόντα φωσφορική πυριδοξάλη (*PLP*) και μαζί με κατάλοιπα από την *N*-τελική επικράτεια συγκροτεί το καταλυτικό κέντρο το οποίο είναι μια βαθιά εσοχή. Η είσοδος στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζεται από ένα βρόχο που μετακινείται και αποτελείται από κατάλοιπα της *N*-τελικής επικράτειας (βρόχος 280s, κατάλοιπα 282-286). Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στη διεπιφάνεια

των δύο επικρατειών και έχει ομοιοπολικά συνδεμένη την *PLP*. Η πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο ελέγχεται από τον βρόχο 280s που έχει ανοικτή διαμόρφωση στην κατάσταση *R* και κλειστή διαμόρφωση στην κατάσταση *T*. Το κέντρο αναστολής που αποτελείται κυρίως από τα κατάλοιπα *Tyr613* και *Phe285* βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Οι μεταβάσεις μεταξύ των διαμορφώσεων *R* και *T* περιλαμβάνουν τη μετακίνηση του βρόχου που ελέγχει την είσοδο του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο και επίσης την περιστροφή των 2 υπομονάδων, που έχουν ως αποτέλεσμα δομικές αλλαγές στο καταλυτικό κέντρο (Εικόνα 5). Η σύνδεση της *G6P* συναγωνίζεται την *AMP* για σύνδεση στο αλλοστερικό κέντρο αλλά η σύνδεση της *G6P* σταθεροποιεί μια πιο τεταμένη στερεοδιαμόρφωση από την ελεύθερη από προσδέτες τεταμένη στερεοδιαμόρφωση της *GPb*. [13]

Η μυϊκή *GPb* ρυθμίζεται από το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου και είναι ενεργή μόνο σε αυξημένη συγκέντρωση *AMP*. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η *GPb* είναι ανενεργή, λόγω αναστολής από την *ATP* και την *G6P*. Η *GPα* έχει πλήρη δραστηριότητα ανεξάρτητα από τα επίπεδα *AMP*, *ATP*, *G6P* και είναι ανενεργή μόνο σε αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης. Όταν οι μύες βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό *b* μορφή. Με την άσκηση, το αυξημένο επίπεδο της *AMP* οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης *b*. Η άσκηση επίσης θα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ορμόνης η οποία προκαλεί τη δημιουργία της φωσφορυλιωμένης μορφής *α* του ενζύμου. Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα επινεφρίνης οδηγούν στη μετατροπή του στην *α* μορφή. [6]

Σε αντίθεση με την κρυσταλλική δομή της μυϊκής ισομορφής, όπου υπάρχουν σαφείς δομικές διαφορές μεταξύ της *T* στερεοδιαμόρφωσης της *GPα* και της *GPb*, στην ηπατική ισομορφή, η *T* στερεοδιαμόρφωση της *GPα* είναι εντελώς ίδια με την *T* στερεοδιαμόρφωση της *GPb* μορφής, υποδεικνύοντας, ότι η ανενεργή κατάσταση της ηπατικής ισομορφής είναι ανεξάρτητη από τη φωσφορυλίωση. Η ηπατική *GPb*, και σε μικρότερο βαθμό η *GPα*, αναστέλλεται επίσης από την *G6P*. [13]

Η ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης διαφέρει από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιοστασία της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με αυτή των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση *α* και όχι η *β* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη απόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση *T* στην *R*. Η δέσμευση της γλυκόζης μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης *α* από την κατάσταση *R* στην *T*, απενεργοποιώντας το ένζυμο. Η ηπατική φωσφορυλάση παράγει γλυκόζη για χρήση από άλλους ιστούς. Συνεπώς, εάν ελεύθερη γλυκόζη προέρχεται από άλλες πηγές, όπως η διατροφή, δεν υπάρχει ανάγκη κινητοποίησης γλυκογόνου. Η ηπατική φωσφορυλάση δεν ρυθμίζεται από την *AMP*, διότι στο ήπαρ δεν συμβαίνουν εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. [6]

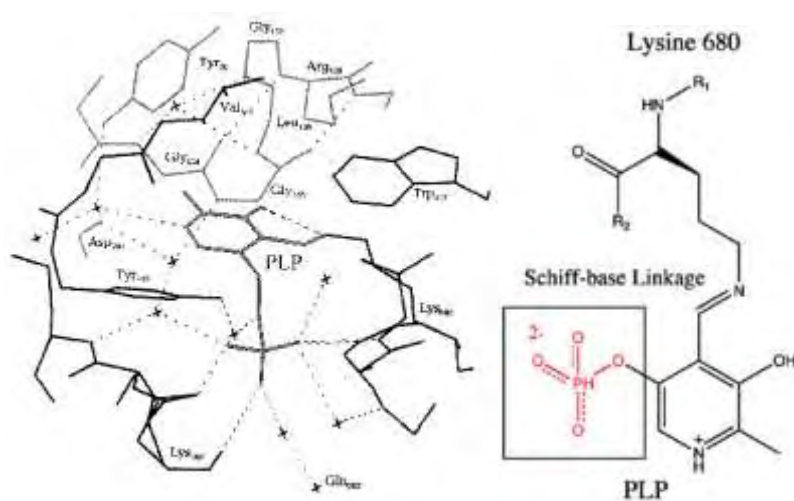


Εικόνα 5: Η ανενεργή (*GPb*) και ενεργή (*GPa*) μορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση είναι ένα διμερές και η μια υπομονάδα εμφανίζεται με πράσινο και η άλλη με κυανό. Η N-τελική περιοχή που φέρει τη *Ser14* εμφανίζεται με πορτοκαλί χρώμα στις δύο υπομονάδες. Το καταλυτικό κέντρο σημειώνεται με "PLP" που παρουσιάζεται με μωβ. (Α και Β) Προβολή κατά μήκος του δυαδικού άξονα συμμετρίας που δείχνει πως, κατά την φωσφορυλίωση, η *Ser14* μετακινείται από μια ενδομοριακή θέση στην *GPb* σε μια διαμοριακή θέση στο *GPa* στην επαφή των υπομονάδων και έρχεται σε επαφή με τα δύο κατάλοιπα αργινίνης *Arg69* και *Arg43'*. (C και D) Κανονική προβολή ως προς τον δυαδικό άξονα συμμετρίας, δείχνει την περιστροφή της μιας υπομονάδας σε σχέση με την άλλη σχετικά με τη φωσφορυλίωση της *Ser14*, που επηρεάζει τον προσανατολισμό των ελίκων του πύργου. [14]

1.4.2 Η φωσφορική πυριδοξάλη

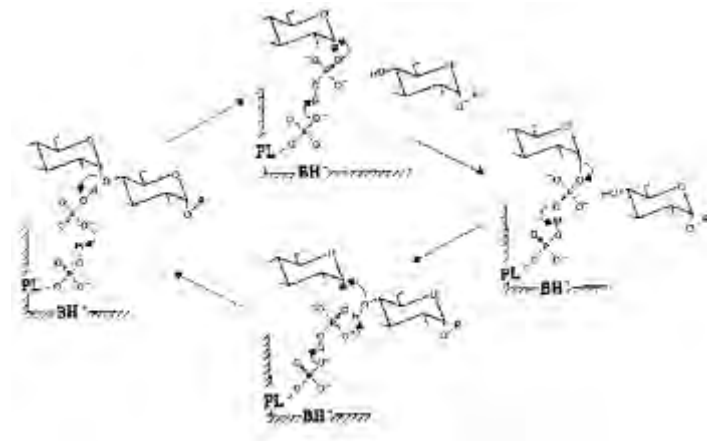
Η πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση της *ATP* που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Για να γίνει αυτό, χρειάζεται ο αποκλεισμός νερού από το ενεργό κέντρο. Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και η παραγόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της *GP*. Μία άμεση προσβολή της φωσφορικής ομάδας στον C-1 ενός σακχάρου θα ανέστρεφε τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα, διότι η αντίδραση θα προχωρούσε μέσω μιας πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης. Επειδή η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α παρά β, απαιτείται ένας αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Η πιο πιθανή εξήγηση για τα αποτελέσματα αυτά είναι ότι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν. [6] Η

φωσφορική πυριδοξάλη συμμετέχει ως συμπαράγοντας σε αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις του μεταβολισμού των αμινοξέων (τρανσαμίνωση, αποκαρβοξυλίωση κλπ.), αποτελεί μέρος του καταλυτικού μηχανισμού της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και συνεπώς είναι απαραίτητη για την δραστικότητα του ενζύμου. Το κύριο ενδιάμεσο βήμα στις αντιδράσεις τέτοιου τύπου είναι ο σχηματισμός μιας βάσης *Schiff* μεταξύ της φωσφορικής πυριδοξάλης και του κατάλληλου αμινοξέος. Στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η αλδεϋδική ομάδα της *PLP* σχηματίζει μία βάση *Schiff* με την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης 680 του ενζύμου, δεσμός που είναι απαραίτητος για την εμφάνιση καταλυτικής δραστικότητας. Η χρήση διαφορετικών χημικών αναλόγων της *PLP* με τροποποιήσεις σε κάθε θέση γύρω από τον δακτύλιο πυριδίνης, έδειξε ότι η *PLP* στηρίζει τη φυσική δομή του ενζύμου αλλά επίσης συμμετέχει και στην κατάλυση.



Εικόνα 6: Α) Απεικόνιση της ενεργούς περιοχής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Οι σταυροί συμβολίζουν τα μόρια νερού. Β) Δεσμός βάσης *Schiff* που σχηματίζει η *PLP*. Η *PLP* σχηματίζει μια βάση *Schiff* με την λυσίνη 680 στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. [15]

Η ακριβής διάταξη της *PLP* στο μόριο της φωσφορυλάσης και η φύση των καταλοίπων των αμινοξέων του πρωτεϊνικού μορίου που αλληλεπιδρούν με τα δομικά στοιχεία του συμπαράγοντα έγιναν εμφανή μετά από ανάλυση με χρήση ακτίνων Χ. Ο συμπαράγοντας τοποθετείται βαθιά σε ένα εξαιρετικά υδρόφοβο περιβάλλον και η αλδεϋδική του ομάδα συνδέεται ως βάση *Schiff* με τη *Lys680*. Η *PLP* σταθεροποιείται σε μια διαμόρφωση μέσω πολλών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων των πλευρικών ομάδων του συμπαράγοντα με τα κατάλοιπα αμινοξέων τόσο των *C*- όσο και των *N*-τελικών επικρατειών (βλ. εδάφιο 1.4.1.) Τέτοιες αλληλεπιδράσεις αποτελούν αυτή του δακτυλίου πυριδίνης του συμπαράγοντα με τους τρεις γειτονικούς αρωματικούς δακτυλίους *Tyr90*, *Trp491* και *Tyr648* καθώς και οι πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* της *C2'*-μεθυλομάδας και του *C6'*-ατόμου του δακτυλίου πυριδίνης με τα κατάλοιπα *Gly134*, *Gly135* και *Leu136*.



Εικόνα 7: Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η *PLP* συμμετέχει στην ενζυμική αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Το σχήμα της αντίδρασης δείχνει την αντιστρεψιμότητα της φωσφορόλυσης των ολιγοσακχαριτών (*R*) παρουσία ορθοφωσφορικού (πάνω μισό) και την σύνθεση παρουσία 1-φωσφορικής γλυκόζης (κάτω μισό). *PL* = πυριδοξάλη, *BH+* = πρωτονιωμένη γενική βάση που προσφέρεται από το πρωτεϊνικό ένζυμο. [15]

Η 5'-φωσφορική ομάδα της *PLP* λειτουργεί υπό μορφή διανιόντος ως δότης/δέκτης πρωτονίων σύμφωνα με το γενικό σχήμα της οξεοβασικής κατάλυσης. Στην κατεύθυνση προς τα εμπρός, η φωσφορόλυση των α-1,4-γλυκοσιδικών δεσμών αρχίζει με την πρωτονίωση του οξυγόνου του γλυκοζιδίου από το ορθοφωσφορικό ακολουθούμενη από σταθεροποίηση του αρχικού ιόντος οξοκαρβονίου και ομοιοπολική σύνδεση προς σχηματισμό 1-φωσφορικής γλυκόζης. Στην αντίθετη κατεύθυνση, η πρωτονίωση της φωσφορικής ομάδας της 1-φωσφορικής γλυκόζης αποσταθεροποιεί το γλυκοζιτικό δεσμό και προάγει το σχηματισμό του ζεύγους γλυκοζυλοοξοκαρβονικού ιόντος με το φωσφορικό ανιόν. Το φωσφορικό ανιόν ακολούθως διευκολύνει την πυρηνόφιλη προσβολή του τελικού καταλοίπου του γλυκοζιτικού επί του καρβονικού ανιόντος. Έτσι προκύπτει ο σχηματισμός του 1,4-γλυκοζιδικού δεσμού. Τόσο στην εμπρόσθια όσο και στην ανάστροφη πορεία της αντίδρασης, η φωσφορική ομάδα του συμπαραγόντα φωσφορική πυριδοξάλη δρα ως ένα γενικό οξύ και πρωτονιώνει το φωσφορικό υπόστρωμα που λειτουργεί ως μεταφορέας πρωτονίων. [15, 16]

1.4.3 Ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Οι ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης αλληλεπιδρούν με διάφορους προσδέτες ελέγχοντας τη δράση του ενζύμου. Η σύνδεση ενός προσδέτη σε μια ρυθμιστική περιοχή του ενζύμου μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα του μετατοπίζοντας την ισορροπία μεταξύ των διαμορφώσεων *T* και *R* του ενζύμου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου περιέχει τουλάχιστον επτά ρυθμιστικές περιοχές, οι οποίες είναι:

- Η θέση αναγνώρισης για την φωσφοσερίνη.
- Το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης όπου προσδέεται η *AMP*.
- Το καταλυτικό κέντρο όπου προσδέεται η γλυκόζη και η 1-φωσφορική γλυκόζη.

- Το κέντρο της αποθήκευσης του γλυκογόνου.
- Το κέντρο αναστολής όπου προσδένεται η καφεΐνη και σχετικές ενώσεις.
- Το νέο αλλοστερικό κέντρο που αποτελεί θέση πρόσδεσης του πιθανού αντιδιαβητικού φαρμάκου CP320626.
- Το κέντρο πρόσδεσης της κερσεΐνης, το οποίο αποτελεί και το πλέον πρόσφατο κέντρο που ανακαλύφθηκε. [5]

1.4.3.1 Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, που περιλαμβάνει τον συμπαράγοντα *PLP*, βρίσκεται στο κέντρο της κάθε υπομονάδας της *GP* και είναι προσβάσιμο στο διαλύτη διαμέσου ενός καναλιού μήκους 15 Å. Η πρόσδεση αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο σταθεροποιεί την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s (κατάλοιπα 282-287), εμποδίζοντας έτσι την πρόσβαση του υποστρώματος και προωθώντας τη διαμόρφωση της αδρανούς *T*-στερεοδιαμόρφωσης. Αν και ο πρωταρχικός στόχος για την ανακάλυψη αναστολέων της *GP* είναι η ανθρώπινη ηπατική *GPb*, οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει σε μυϊκή *GPb* κουνελιού, λόγω της διαθεσιμότητάς του και της τάσης του να παράγει κρυστάλλους καλής ποιότητας. Οι δραστικές θέσεις των *rmGPb* και *hlGPb* είναι ταυτόσημες στην αλληλουχία αμινοξέων και υπάρχει δομική ομοιότητα στην αρχιτεκτονική του καταλυτικού κέντρου, έτσι τα συμπεράσματα που συνάγονται από τις μελέτες δέσμευσης στην *rmGPb* ισχύουν για την *hlGPb*, όπως έχει φανεί και σε πρόσφατες μελέτες [5, 18, 19]. Οι αναστολείς της *GP* που δεσμεύονται πιο ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο είναι στην πλειονότητά τους ανάλογα της γλυκόζης, τα οποία είναι ικανά να μειώνουν τα επίπεδα γλυκόζης υπό κανονικές και υπεργλυκαιμικές συνθήκες σε ποντίκια [20]. Ο φυσιολογικός αναστολέας της *GP* είναι η α -D-γλυκόζη και προσδένεται με K_i 1.7 mM, ενώ η β -D-γλυκόζη με K_i 7.4 mM. Τα ανάλογα γλυκόζης αντιπροσωπεύουν τους πλέον ευρέως διερευνημένους αναστολείς της *GP* με α - και β -υποκαταστάσεις στο ανωμερικό C1 άτομο. [5]

1.4.3.2 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου

Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου της *GP* περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και είναι η περιοχή στην οποία συνδέεται το γλυκογόνο. Ο σχεδιασμός αναστολέων αυτού του κέντρου έχει λάβει σχετικά μικρή προσοχή. Έχουν πραγματοποιηθεί ωστόσο κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων *X* της σύνδεσης των α -, β - και γ -κυκλοδεξτρινών με την *GPb*, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν από σταθερές αναστολής 47.1 mM, 14.1 mM και 7.4 mM αντίστοιχα. Άλλοι αναστολείς που προσδένονται σε αυτό το κέντρο είναι η ακαρβόζη (K_i = 26 mM για την *rmGPa*), η μαλτοπεντόζη και η μαλτοεπταόζη (K_i = 1 mM για την *rmGPb*). Η δομική βάση για την πρόσδεση αυτών των προσδετών είναι πολύ παρόμοια και συνίσταται από αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με κατάλοιπα *Ser429*, *Lys473*, *Asn407* και από αλληλεπιδράσεις μορίων νερού με κατάλοιπα *Gln401*, *Arg426*, *Val431* και *Gln433*. [5]

1.4.3.3 Κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής, γνωστό επίσης ως κέντρο πρόσδεσης της καφεΐνης, βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Η δέσμευση προσδετών σε αυτό το κέντρο οφείλεται κυρίως στην παρεμβολή μεταξύ των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων *Phe285* και *Tyr613* μέσω π-π αλληλεπιδράσεων. Οι προσδέτες είναι πιο ισχυροί παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ανασταλτική δράση τους θα μπορούσε να ρυθμιστεί από τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και να μειωθεί όταν αυτά πλησιάζουν στο φυσιολογικό, μειώνοντας τον κίνδυνο υπογλυκαιμίας. Η καφεΐνη ήταν ο πρώτος αναστολέας που βρέθηκε να δεσμεύεται σε αυτή τη θέση, με $K_i = 0.1 \text{ mM}$. Κατά τη σύνδεση με την *rmGPb*, παρεμβάλλεται μεταξύ δύο αρωματικών καταλοίπων, *Phe285* και *Tyr613* και σχηματίζει μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων *van der Waals*. Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι τα φλαβονοειδή λειτουργούν ως αναστολείς της *GP*, παρόλο που δεν έχουν έναν συγκεκριμένο τρόπο δράσης. Διαφορετικά φλαβονοειδή προσδέονται σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης του ενζύμου. Η χρυσίνη είναι ένα φυσικό φλαβονοειδές που είναι γνωστό ότι δεσμεύεται στο κέντρο αναστολής της *GP* με $K_i = 19.01 \text{ } \mu\text{M}$ [21]. Η φλαβοπιριδόλη, ένα φλαβονοειδές παράγωγο με αντικαρκινική δράση και τα παράγωγά της έχει δείχθει ότι αποτελούν τους ισχυρότερους αναστολείς έως σήμερα με τιμές K_i 0.99-2.75 μM για την *rmGPb*. Η φλαβοπιριδόλη δρα συνεργιστικά με τη γλυκόζη και προάγει τη λιγότερο δραστική κατάσταση *T* μέσω μετατόπισης της θέσης του βρόχου *280s* στη κλειστή διαμόρφωση αποκλείοντας την πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο. Ένα ακόμη φυσικό φλαβονοειδές, το ελλαγικό οξύ, αποτελεί τον πιο ισχυρό, φυσικό αναστολέα για την *GP* μέχρι σήμερα με σταθερά αναστολής $13.4 \pm 1.2 \text{ } \mu\text{M}$ και $7.52 \pm 0.36 \text{ } \mu\text{M}$ για *GPb* και *GPa*, αντίστοιχα. Όπως και η φλαβοπιριδόλη, το ελλαγικό οξύ εμφανίζει συνεργιστική δράση με την γλυκόζη. [5, 23, 24]

1.4.3.4 Αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο της *GP* αποτελείται από δομικά στοιχεία και των δύο υπομονάδων του λειτουργικού διμερούς που βρίσκονται στις αντίθετες πλευρές του μορίου του ενζύμου. Δύο α έλικες (κατάλοιπα 47-78 και 289-314, αντίστοιχα) και τέσσερα β -πτυχωτά φύλλα (κατάλοιπα 153-160, 191-193, 222-232 και 237-247) δημιουργούν μια κοιλότητα σχήματος *V*, η οποία κλείνει από μια περιοχή που αποτελείται από τα κατάλοιπα 36 έως 47 της συμμετρικής υπομονάδας ώστε να σχηματιστεί το αλλοστερικό κέντρο. Το αλλοστερικό κέντρο συνδέεται με μια ποικιλία φωσφορυλιωμένων ενώσεων όπως *AMP*, *IMP*, *ATP*, γλυκόζη-6-*P*, *NADH*, *UDP*-γλυκόζη, 2-δεοξυ-γλυκόζη-6-*P*, β -γλυκεροφωσφορικό και φωσφορικά ιόντα. Η γλυκόζη-6-*P* είναι ο ισχυρότερος φυσικός αναστολέας της *GPb*, ο οποίος δεσμεύεται στο αλλοστερικό κέντρο με $K_d = 20\text{-}70 \text{ } \mu\text{M}$ για την *GPb* και $K_d = 1.700 \text{ } \mu\text{M}$ για την *GPa*. Η δέσμευση των προσδετών σε αυτό το κέντρο αναστέλλει την δραστικότητα

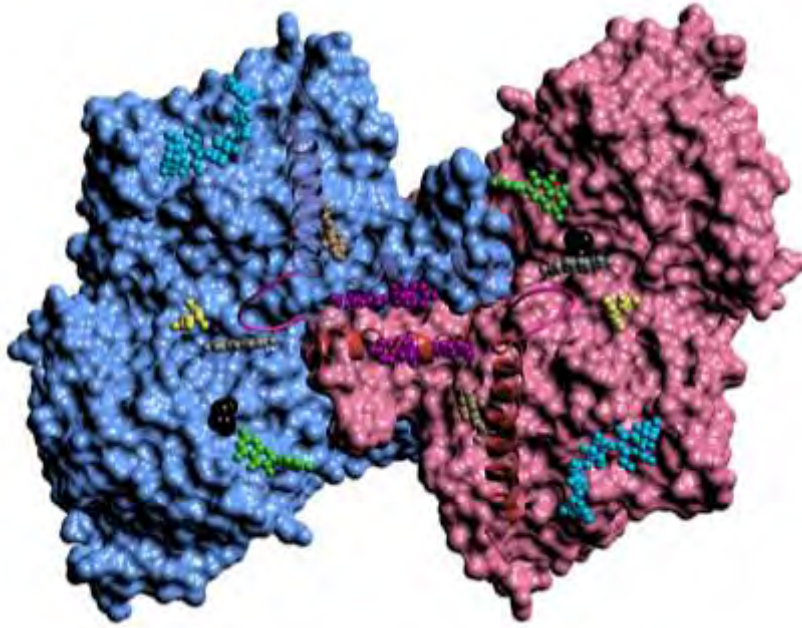
της GP είτε ανταγωνιζόμενη τον φυσιολογικό ενεργοποιητή που είναι η AMP είτε σταθεροποιώντας την αδρανή T διαμόρφωση του ενζύμου. [5]

1.4.3.5 Νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (ή κέντρο πρόσδεσης του ινδολίου) βρίσκεται εντός της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς ενζύμου που σχηματίζεται από τη σύνδεση των δύο υπομονάδων. Η κεντρική κοιλότητα του κέντρου σχηματίζεται στο ένα άκρο με κατάλοιπα της περιοχής *car'* και $\alpha 2$ ελίκες (*Arg33*, *His34*, *Arg60* και *Asp61* και τα συμμετρικά τους ισοδύναμα) και στο άλλο άκρο από τον $\alpha 7$ πύργο ελικών (κατάλοιπα *Asn270*, *Glu273*, *Ser276* και τα συμμετρικά τους ισοδύναμα). Τα 18 κατάλοιπα αμινοξέων (9 από κάθε υπομονάδα) που συνθέτουν αυτό το κέντρο είναι πολύ καλά συντηρημένα στην ανθρώπινη μυϊκή και ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου, στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου του ανθρώπινου εγκέφαλου, και αυτές του μυός, του ήπατος και του εγκεφάλου του αρουραίου. Το νέο αλλοστερικό κέντρο απέχει 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Οι αναστολές που δεσμεύονται σε αυτό το κέντρο λειτουργούν ως κλασικοί αλλοστερικοί αναστολές σταθεροποιώντας την ανενεργή στερεοδιαμόρφωση T του ενζύμου και παρουσιάζουν συνέργεια με άλλους αναστολές όπως η γλυκόζη. Ο πιο ισχυρός φυσικός αναστολέας του νέου αλλοστερικού κέντρου είναι το ινδόλιο. [5]

1.4.3.6 Κέντρο πρόσδεσης κερσετίνης

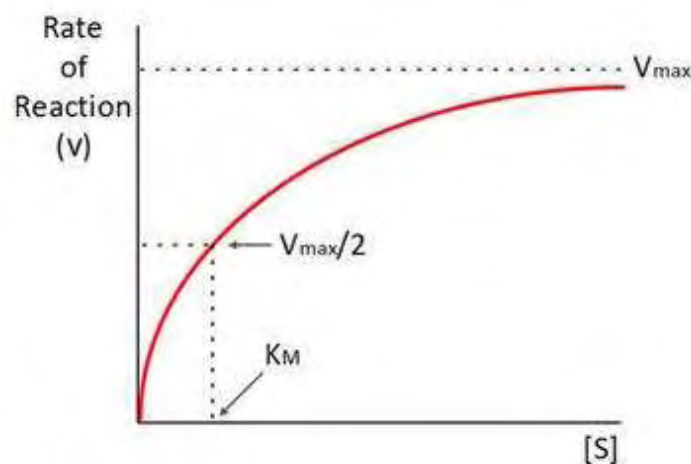
Ενώ η χρυσίνη και η φλαβοπιριδόλη δεσμεύονται αποκλειστικά στο κέντρο αναστολής, η κερσετίνη βρέθηκε ότι δεσμεύεται σε ένα νέο κέντρο που απέχει 15 Å από το καταλυτικό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Επιπλέον η κερσετίνη βρέθηκε ως το πλέον βιοενεργό συστατικό ανάμεσα σε δεκατρία πολυφαινολικά εκχυλίσματα που λαμβάνονται από τα υποπροϊόντα οινοποίησης των ελληνικών ποικιλιών *Vitis vinifera*. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης σχηματίζεται από κατάλοιπα *Lys544*, *Arg551*, *Lys655* και *Tyr548* της C- επικράτειας και από *Glu120* και *Glu123* της N- επικράτειας. Η συγκριτική δομική ανάλυση του συμπλέγματος *rmGPb*-κερσετίνης και της ελεύθερης *rmGPb* στις διαμορφώσεις των καταστάσεων T και R έδειξε ότι ενώ υπήρχαν σημαντικές διαφορές με την κατάσταση R, οι δομικές διαφορές με την κατάσταση T ήταν μικρές. Η δέσμευση της κερσετίνης σε αυτό το κέντρο προάγει την λιγότερο δραστική κατάσταση T του ενζύμου μέσω σταθεροποίησης της διαμόρφωσης του βρόχου 548-556 στην T- στερεοδιαμόρφωση. [5, 22]



Εικόνα 8: Η κρυσταλλική δομή της *GPb* με τα έξι κέντρα πρόσδεσης: καταλυτικό (1H5U ή 1C50), κέντρο αναστολής (4YUA), κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου (1P2B), νέο αλλοστερικό κέντρο (1H5U), κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης (4MRA), αλλοστερικό κέντρο (1GPY), βρόχος 280s και η Ser14. Η εικόνα αποτελεί υπέρθεση των κέντρων πρόσδεσης πάνω στην επιφάνεια του διμερούς του ενζύμου.

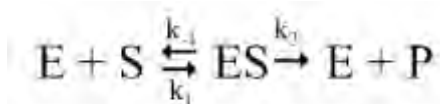
1.5 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Για πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης V_0 , η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο, μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$. Η ταχύτητα της κατάλυσης αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος και στη συνέχεια αρχίζει να σταθεροποιείται και να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος, με τον τρόπο που παρουσιάζεται στην εικόνα 9. [30]



Εικόνα 9: Διάγραμμα της ταχύτητας (V_0) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$, για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική *Michaelis-Menten* δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά *Michaelis* (K_M) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με $V_{max}/2$.

Σύμφωνα με την εικόνα 9, σε σταθερή συγκέντρωση ενζύμου και χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος $[S]$, η ταχύτητα V_0 είναι σχεδόν ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, αλλά σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, η ταχύτητα V είναι σχεδόν ανεξάρτητη από το $[S]$. Το 1913 οι *Michaelis* και *Menten* πρότειναν έναν απλό μηχανισμό που εξηγεί αυτά τα κινητικά χαρακτηριστικά. Το μοντέλο που προτάθηκε είναι



Όπου: **k_1, k_2, k_{-1}** : οι σταθερές ταχύτητας των αντίστοιχων αντιδράσεων

E: Ένζυμο

S: υπόστρωμα

ES: σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P: προϊόν

Για να απλοποιηθούν τα πράγματα, έγινε η παραδοχή της σταθερής κατάστασης, όπου οι συγκεντρώσεις των ενδιάμεσων (ES), παραμένουν σταθερές, ενώ οι συγκεντρώσεις των αρχικών ενώσεων και των προϊόντων αλλάζουν. Αυτό συμβαίνει όταν οι ταχύτητες σχηματισμού και διάσπασης του συμπλόκου ES είναι ίσες. Με τον ορισμό της σταθεράς K_M η εξίσωση που προκύπτει τελικά είναι

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

Όπου:

V_0 : η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

V_{max} : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Η μέγιστη ταχύτητα V_{max} αποκαλύπτει τον ρυθμό μετατροπής ενός ενζύμου, ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Η V_{max} ισούται με την κινητική σταθερά k_2 , η οποία ονομάζεται και k_{cat} .

K_M : σταθερά *Michaelis-Menten* που ορίζεται ως

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

Η K_M έχει μονάδες συγκέντρωσης και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος. Όταν $[S] = K_M$, τότε $V_0 = V_{max}/2$. Έτσι η K_M είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος,

όταν η $[S]$ είναι πολύ μικρότερη από την K_M , $V_0 = (V_{max}/K_M)/[S]$, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η $[S]$ είναι πολύ μεγαλύτερη από την K_M , $V_0 = V_{max}$. [6]

1.5.1 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Όταν μια ουσία προκαλεί παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης ονομάζεται αναστολέας. Ένας αναστολέας μπορεί να είναι αντιστρεπτός ή μη αντιστρεπτός. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Πολλές φορές οι συνέπειες ενός μη αντιστρεπτού αναστολέα μπορεί να αντιστραφούν με χημικά μέσα κι έτσι το ένζυμο να μπορεί να δράσει και πάλι. Αντιστρεπτός είναι ο αναστολέας που μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα και, όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά τη δραστηριότητά του. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο, έτσι ώστε να αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας. Η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα που σχηματίζεται δίνεται από τη σχέση:

$$K_i = \frac{[EI]}{[E][I]}$$

Όπου:

K_i : σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI ή σταθερά αναστολής

E : Το ένζυμο

I : ο αναστολέας

EI : το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα [6]

Γενικά, διακρίνουμε 4 κύριους τύπους ενζυμικής αναστολής: τη συναγωνιστική, τη μη συναγωνιστική, την ανταγωνιστική και τη μικτή.

➤ Συναγωνιστική αναστολή

Εάν ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος S , τότε τα S και I συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Σε μια οποιαδήποτε συγκέντρωση του αναστολέα, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Στη συναγωνιστική αναστολή η μέγιστη ταχύτητα V_{max} δεν μεταβάλλεται, ενώ η τιμή της K_M αυξάνεται.

➤ Μη συναγωνιστική αναστολή

Αν αντί ο αναστολέας I να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα S για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ενζύμου, δηλαδή το ενεργό κέντρο, δεσμεύεται ταυτόχρονα με αυτό σε διαφορετική περιοχή, τότε αναφερόμαστε σε μη συναγωνιστική αναστολή, όπου δηλαδή μπορεί να δημιουργηθεί ένα τριπλό σύμπλοκο του

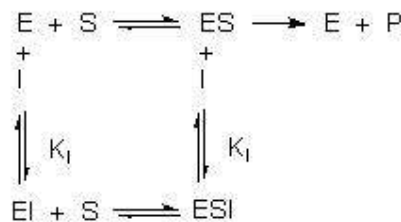
τύπου *EIS*. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Στη μη συναγωνιστική αναστολή η V_{max} ελαττώνεται, ενώ η K_M μένει ανεπηρέαστη.

➤ Μικτή αναστολή

Η μικτή αναστολή προκύπτει όταν ένας αναστολέας επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και επίσης μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου. Στους αναστολείς μικτού τύπου μεταβάλλονται τόσο K_M όσο και η V_{max} . Η K_M μπορεί να αυξηθεί ή να ελαττωθεί από τον αναστολέα, ενώ η V_{max} πάντα θα ελαττώνεται.

➤ Ανταγωνιστική αναστολή

Στην περίπτωση της ανταγωνιστικής αναστολής, η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Η δέσμευση του αναστολέα ελαττώνει το ποσό του ενζύμου που είναι στην κατάλληλη μορφή ώστε να δώσει προϊόντα, δηλαδή την *ES*, και ως εκ τούτου θα ελαττωθεί η V_{max} . Αυτό όμως θα ελαττώσει και το ρυθμό διασπάσεως του συμπλόκου *ES* σε ελεύθερο ένζυμο και υπόστρωμα με αποτέλεσμα να ελαττωθεί και η K_M . [27]



Εικόνα 10: Γενικό διάγραμμα αναστολής ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Το *ESI* θεωρείται ότι είναι ανενεργό. [30]

Όταν το ένζυμο βρίσκεται σε αναστολή εξακολουθεί να υπακούει στην κινητική των *Michaelis* και *Menten*, όπως απουσία αναστολέα, με τη διαφορά ότι για την σταθερά K_M και τη μέγιστη ταχύτητα V_{max} διαμορφώνονται νέες τιμές, οι οποίες ονομάζονται φαινομενικές (*apparent values*). Οι φαινομενικές τιμές προσδιορίζονται ώστε τελικά να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής K_i . Η σταθερά *Michaelis-Menten*, K_M , υπολογίζεται συνήθως με τη μέθοδο των *Lineweaver-Burk*, η οποία είναι γνωστή και σαν μέθοδος του διπλού αντιστρόφου. Απαραίτητη είναι η προσεκτική επιλογή των τιμών των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων $[S]$, ώστε οι αντίστοιχες αντίστροφες τιμές να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες στον άξονα των τετμημένων. Η εξίσωση των *Michaelis-Menten* είναι:

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

Αν η παραπάνω σχέση γραφεί με τη μέθοδο του διπλού αντιστρόφου, τότε προκύπτει:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Η σχέση περιγράφει την ευθεία, η οποία λαμβάνεται από τη γραφική παράσταση των *Lineweaver-Burk*, και η οποία προκύπτει εάν παραστήσουμε γραφικά τις τιμές $1/V$ στον άξονα των τεταγμένων και $1/[S]$ στον άξονα των τετμημένων. Η κλίση της ευθείας ισούται με K_M/V_{max} . Το σημείο στο οποίο η ευθεία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων ισούται με $1/V_{max}$ και το σημείο στο οποίο τέμνει τον άξονα των τετμημένων ισούται με $-1/K_M$. Η μέγιστη ταχύτητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου και δεν αποτελεί σταθερά όπως η K_M . [26-28]

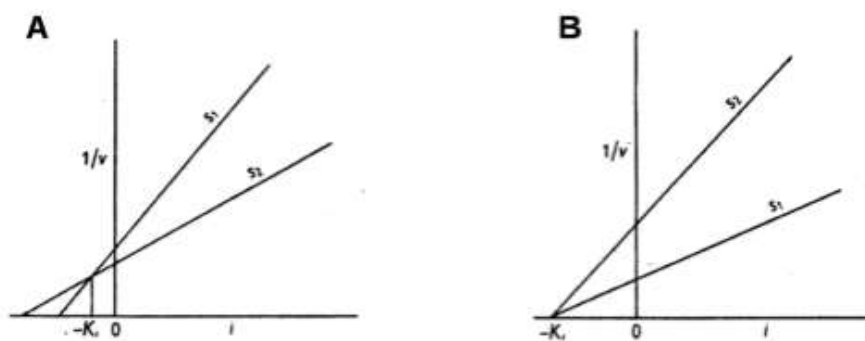
Διαγράμματα Dixon:

Η σταθερά αναστολής K_i , δηλαδή η σταθερά ισορροπίας μεταξύ του ενζύμου και ενός συναγωνιστικού αναστολέα που συνδέεται με αντιστρεπτό τρόπο, υπολογίζεται συνήθως βασιζόμενοι στις εξίσωση των *Michaelis-Menten* για ένα συναγωνιστικό σύστημα:

$$\frac{V_{max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) + [S]} \quad (A)$$

Όπου: $[i]$ η συγκέντρωση του αναστολέα

Για τον υπολογισμό της K_i υπάρχει μια απλή μέθοδος μέσω γραφικών παραστάσεων που πρωτοδιατυπώθηκε από τον *Dixon M.* το 1953. Εάν απεικονίσουμε διάγραμμα $1/v$ προς $[i]$, διατηρώντας τη συγκέντρωση του υποστρώματος σταθερή, θα παρατηρήσουμε ότι δημιουργείται μια ευθεία γραμμή. Εάν σε ένα διάγραμμα με τον ίδιο τρόπο απεικονίσουμε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, οι γραμμές θα τέμνονται σε ένα σημείο αριστερά του κάθετου άξονα, με το σημείο τομής στον άξονα των τετμημένων να προσδιορίζει την τιμή $-K_i$.



Εικόνα 11: Α) Προσδιορισμός της K_i σε συναγωνιστική αναστολή. Β) Προσδιορισμός K_i σε μη συναγωνιστική αναστολή. [28]

Κάθε γραμμή σύμφωνα με την εξίσωση A παίρνει τη μορφή:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{1}{V} + \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{[i]}{K_i} \quad (B)$$

Στο σημείο της διασταύρωσης το $1/v$ και το $[i]$ όπως επίσης και η V_{max} θα είναι ίδια και για τις δύο γραμμές, όταν πρόκειται για συναγωνιστική αναστολή. Επομένως:

$$\frac{K_M}{S1} + 1 + \frac{K_M}{S1} \frac{i}{K_i} = \frac{K_M}{S2} + 1 + \frac{K_M}{S2} \frac{i}{K_i} \quad \text{ή} \quad \frac{1}{S1} \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) = \frac{1}{S2} \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)$$

Τα παραπάνω μπορούν να ισχύουν μόνο αν $[S1] = [S2]$ ή $[i] = -K_i$.

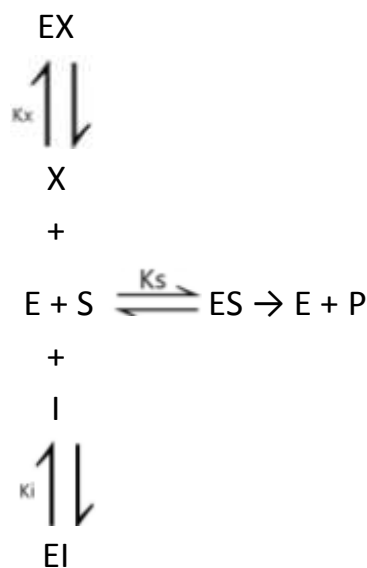
Στη μη συναγωνιστική αναστολή, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα της Εικόνα 11B, οι γραμμές δεν διασταυρώνονται, αλλά συναντώνται σε ένα σημείο που δίνει ξανά την τιμή $-K_i$. Αυτό φαίνεται εύκολα όταν βάλουμε $1/v = 0$ στη μη συναγωνιστική εξίσωση, όπου θα έχουμε:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_M}{[S]}\right) \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \quad [29]$$

Διαγράμματα Dixon με περισσότερους από έναν αναστολείς:

➤ Συναγωνιστική αναστολή:

Η ισορροπία για ένα ένζυμο που υπόκειται σε συναγωνιστική αναστολή από δύο διαφορετικές ενώσεις, I και X, παρουσιάζεται παρακάτω. Το ένζυμο μπορεί να συνδεθεί είτε με τον I είτε με τον X, αλλά όχι και με τους δύο. Οι I και X είναι συναγωνιστικοί ο ένας σε σχέση με τον άλλον.



Το σύστημα συμπεριφέρεται πανομοιότυπα με την συναγωνιστική αναστολή του ενός αναστολέα. Κάθε ένας από τους αναστολείς μπορεί να μειώσει την ταχύτητα στο μηδέν. Το μίγμα των I και X δεν επιφέρει περισσότερη αναστολή από ό,τι μια ισοδύναμη ολική ειδική συγκέντρωση του καθενός από τους δύο αναστολείς. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι ο I και ο X είναι αμοιβαία αποκλειόμενοι. Ο έλεγχος του αμοιβαίου αποκλεισμού παρέχεται από διαγράμματα *Dixon* $1/v$ έναντι των συγκεντρώσεων του άλλου αναστολέα. Η εξίσωση για το διάγραμμα *Dixon* μπορεί να αναδιαταχθεί για να δείξει είτε τον I είτε το X ως τον αναστολέα του οποίου αλλάζει η συγκέντρωση (διαφοροποιούμενος αναστολέας). Όταν ο $[I]$ είναι αυτός ο αναστολέας, τότε η εξίσωση είναι:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{[S] V_{max} K_i} [I] + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{K_s[X]}{[S]K_x} \right)$$

Αντίστοιχα, όταν $[X]$ είναι ο διαφοροποιούμενος αναστολέας:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{[S] V_{max} K_x} [X] + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{K_s[I]}{[S]K_i} \right)$$

Έτσι το γράφημα $1/v$ έναντι $[I]$ σε σταθερές συγκεντρώσεις $[S]$ και $[X]$ είναι γραμμικό με κλίση $K_s/[S]V_{max}K_i$. Η κλίση είναι ανεξάρτητη από τον $[X]$. Συνεπώς, το σύνολο των καμπυλών που λαμβάνονται σε διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις του X είναι παράλληλες. Οι καμπύλες που λαμβάνονται για το γράφημα $1/v$ έναντι $[X]$ σε διαφορετικές σταθερές συγκεντρώσεις του I είναι επίσης παράλληλες. Οι καμπύλες δεν θα είναι παράλληλες εάν αμφότερα τα I και X μπορούν να συνδεθούν ταυτόχρονα με το ένζυμο. Το σημείο τομής στον άξονα $1/v$ αντιπροσωπεύει την επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων του δεύτερου (σταθερού) αναστολέα απουσία του διαφοροποιούμενου αναστολέα. Συνεπώς, το διάγραμμα των σημείων τομής του άξονα $1/v$ έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης σταθερού αναστολέα δίνει τη συνήθη γραφική παράσταση *Dixon* για τον σταθερό αναστολέα.

➤ Μη συναγωνιστική αναστολή:

Στην περίπτωση όπου το ένζυμο έχει περισσότερα από ένα κέντρα πρόσδεσης, δύο διαφορετικές ενώσεις, I και X , μπορούν να είναι δύο διαφορετικοί αναστολείς, δύο διαφορετικοί ενεργοποιητές, ή μπορεί ο ένας να είναι αναστολέας και ο άλλος ενεργοποιητής. Υποθέτουμε ότι οι I και X είναι δύο μη συναγωνιστικοί αναστολείς, δηλαδή οι αναστολείς δεν έχουν επίδραση στη δέσμευση του υποστρώματος και τα σύμπλοκα ESI , ESX και $ESXI$ δεν είναι καταλυτικά δραστικά. Η εξίσωση ταχύτητας είναι:

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_s \left(1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[X]}{K_x} + \frac{[I][X]}{\gamma K_i K_x} \right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i} + \frac{[X]}{K_x} + \frac{[I][X]}{\gamma K_i K_x} \right)}$$

όπου $V_{max}=k_p[E]_t$. Η k_p είναι η σταθερά ταχύτητας που χαρακτηρίζει τον διαχωρισμό του συμπλόκου ES σε ένζυμο και προϊόν. Οι τιμές των K_i και K_x μπορούν να προσδιοριστούν με τον χειρισμό κάθε αναστολέα, χωριστά εάν ο καθένας μόνος του επιφέρει σημαντική αναστολή. Ο παράγοντας αλληλεπίδρασης αναστολέα, γ , μπορεί να ληφθεί από τα διαγράμματα Dixon $1/v$ έναντι της συγκέντρωσης του ενός αναστολέα σε σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος και διάφορες σταθερές συγκεντρώσεις του άλλου αναστολέα. Οι εξισώσεις για τα διαγράμματα Dixon είναι:

$$\frac{1}{v} = \frac{\left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right)}{K_i V_{max}} \left(1 + \frac{[X]}{\gamma K_x}\right) [I] + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right) \left(1 + \frac{[X]}{K_x}\right)$$

και

$$\frac{1}{v} = \frac{\left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right)}{K_x V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{\gamma K_i}\right) [X] + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_S}{[S]}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

Το σύνολο των καμπυλών για τις δύο παραπάνω σχέσεις τέμνονται στο $[I] = -\gamma K_i$ ή στο $[X] = -\gamma K_x$. Όταν $\gamma = 1$, οι καμπύλες τέμνονται στον οριζόντιο άξονα. Όταν $\gamma < 1$, οι καμπύλες τέμνονται πάνω από τον οριζόντιο άξονα, ενώ όταν $\gamma > 1$ τέμνονται κάτω από τον οριζόντιο άξονα. [32]

1.6 Αλλοστερισμός

Όλα τα αλλοστερικά ένζυμα έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

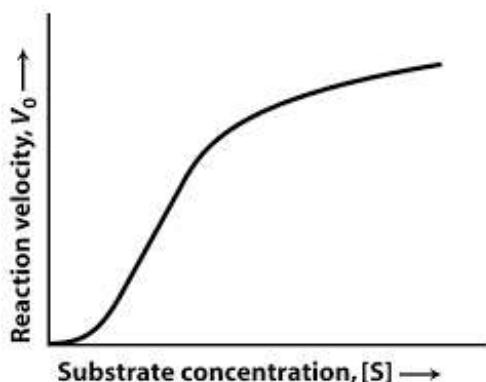
- Αποτελούνται από περισσότερες της μιας υπομονάδες. Τα βρίσκουμε δηλαδή είτε ως συσσωματώματα ενός αριθμού ομοίων μονομερών μονάδων, είτε ως ολιγομερή δύο ειδών μονομερών μονάδων
- Αποτελούν συστήματα που περιέχουν περιοχές δέσμευσης τόσο για το υπόστρωμα ή υποστρώματα, όσο και για τους τροποποιητές της ενζυμικής δράσης, δηλαδή τους αναστολείς και ενεργοποιητές που μετατρέπουν το ένζυμο από την ενεργό σε ανενεργό μορφή και αντίστροφα
- Η ενεργός και η ανενεργός μορφές τους διαφέρουν στην τρισδιάστατη δομή τους

Σε πολλά αλλοστερικά ένζυμα παρατηρείται το φαινόμενο της συνεργειακής δέσμευσης (*cooperativity*), κατά το οποίο η δέσμευση ενός μορίου επηρεάζει τη δέσμευση άλλων μορίων του ίδιου προσδέτη. Όταν η δέσμευση του πρώτου μορίου προωθεί την επιτάχυνση της δέσμευσης των υπόλοιπων μορίων αναφερόμαστε σε θετική συνέργεια, ενώ όταν η δέσμευση του πρώτου μορίου δυσκολεύει τη δέσμευση των υπόλοιπων αναφερόμαστε σε αρνητική συνέργεια. Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται επιπλέον σε ομοτροπικές και ετεροτροπικές. Ως ομοτροπική χαρακτηρίζεται μια αλληλεπίδραση όταν ένας προσδέτης επηρεάζει τη

δέσμευση του εαυτού του στις υπόλοιπες υπομονάδες του ενζύμου, ενώ ετεροτροπική χαρακτηρίζεται όταν ο προσδέτης επηρεάζει τη δέσμευση διαφορετικών προσδετών στο ένζυμο. Στην περίπτωση που συμβαίνουν και τα δύο η αλληλεπίδραση είναι ομοτροπική-ετεροτροπική. Σύμφωνα με το μοντέλο *MWC*, στο οποίο υπακούει και η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή που αποτελούνται από πανομοιότυπα πρωτομερή. Το κάθε πρωτομερές περιέχει από ένα κέντρο δέσμευσης για κάθε προσδέτη. Σε περίπτωση που το αλλοστερικό ένζυμο αποτελείται από διαφορετικά είδη υπομονάδων, το πρωτομερές δεν ανταποκρίνεται σε μία υπομονάδα αλλά αντιπροσωπεύει μια ομάδα υπομονάδων που η κάθε μια περιέχει από μία διαφορετικού τύπου υπομονάδα. Τα πρωτομερή συνδέονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να κατέχουν ισοδύναμες θέσεις στο ελεύθερο μόριο, με αποτέλεσμα το ένζυμο να έχει τουλάχιστον έναν άξονα συμμετρίας. Το ένζυμο απαντάται σε δυο πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την *T* (χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα) και την *R* (υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα). Η σταθερά ισορροπίας τους που συμβολίζεται με *L*, είναι ίση με T/R και εξαρτάται από τον αριθμό των μορίων που είναι δεσμευμένα στο ένζυμο. Το μοντέλο *MWC* ερμηνεύει πολύ ικανοποιητικά την αλλοστερική ενεργοποίηση και αναστολή και αυτό γιατί, καθώς το υπόστρωμα δεσμεύεται κατά προτίμηση στην *R* διαμόρφωση, ο ενεργοποιητής θα δεσμεύεται επίσης σε αυτή, μετακινώντας έτσι την ισορροπία προς την κατεύθυνση της *R* διαμόρφωσης, ενώ ο αναστολέας θα δεσμεύεται εκλεκτικά στην διαμόρφωση *T*, ελαττώνοντας το ποσό της *R* διαμόρφωσης. [27]

1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα και κινητικές μελέτες

Τα αλλοστερικά ένζυμα δεν υπακούουν στην κινητική *Michaelis-Menten*. Συχνά, εμφανίζουν σιγμοειδείς γραφικές παραστάσεις της ταχύτητας αντίδρασης V_0 σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος [*S*], παρά ορθογώνιες υπερβολές που προβλέπονται από την εξίσωση *Michaelis-Menten*. Στα αλλοστερικά ένζυμα, η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες των άλλων ενεργών κέντρων στο ίδιο μόριο. Ένα πιθανό αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής μεταξύ υπομονάδων είναι ότι η πρόσδεση του υποστρώματος γίνεται συνεργειακά, δηλαδή η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο διευκολύνει την πρόσδεση στα άλλα ενεργά κέντρα. Από τέτοια συνεργειακότητα προκύπτει μια σιγμοειδής γραφική παράσταση της V_0 σε συνάρτηση με το [*S*]. Επιπλέον, η δραστηριότητα των αλλοστερικών ενζύμων μπορεί να μεταβληθεί από ρυθμιστικά μόρια που προσδένονται αντιστρεπτά σε ειδικές περιοχές, διαφορετικές από τα καταλυτικά κέντρα. Με τον τρόπο αυτό οι καταλυτικές ιδιότητες των αλλοστερικών ενζύμων μπορούν να ρυθμιστούν για να αντιμετωπιστούν οι άμεσες ανάγκες ενός κυττάρου. Για τον λόγο αυτό, τα αλλοστερικά ένζυμα είναι οι καθοριστικοί ρυθμιστές στις μεταβολικές πορείες του κυττάρου. [6]



Εικόνα 12: Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν σιγμοειδή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

1.6.1.1 Το πρότυπο του Hill

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής του **GB-P2-4i** χρησιμοποιήσαμε το πρότυπο του Hill. Ο Hill πρότεινε ένα φαινόμενο που εξηγεί ικανοποιητικά το φαινόμενο της θετικής ομότροπης συνέργειας και της σιγμοειδούς καμπύλης που παρατηρείται κατά τη δέσμευση του οξυγόνου στο μόριο της μη καταλυτικής πρωτεΐνης αιμοσφαιρίνης. Η εξίσωση του Hill που περιγράφεται παρακάτω ισχύει για ένζυμο που φέρει n όμοιες θέσεις δεσμεύσεως μεταξύ των οποίων αναπτύσσεται θετική ομότροπη συνέργεια.

$$\log K_B + n \cdot \log[S] = \log\left(\frac{y}{1-y}\right)$$

Η γραφική παράσταση $\log[y/(1-y)]$ έναντι $\log[S]$, γνωστή και ως γραφική παράσταση του Hill, δίνει ευθεία η οποία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων στο σημείο $\log K_B$ και έχει κλίση n που ονομάζεται συντελεστής του Hill. Η K_B είναι η σταθερά διάστασης που συμβολίζει τη συγκέντρωση προσδέτη κατά την οποία τα μισά κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου έχουν καταληφθεί. Το n δίνει τον ελάχιστο αριθμό θέσεων δέσμευσης και συνήθως είναι ίσο ή μικρότερο από αυτόν τον αριθμό, οπότε στρογγυλοποιείται στον αμέσως επόμενο ακέραιο αριθμό

- Αν $n=1$, τότε δεν υπάρχουν φαινόμενα συνέργειας.
- Αν $n>1$, τότε λειτουργεί φαινόμενο θετικής συνέργειας.
- Αν $n<1$, τότε ενδεχομένως λειτουργεί φαινόμενο αρνητικής συνέργειας.

Το φαινόμενο της αρνητικής συνέργειας δεν εξασφαλίζεται. Οπότε το πρότυπο του Hill είναι καλύτερο να χρησιμοποιείται και την ύπαρξη ή όχι φαινομένου θετικής συνέργειας [26].

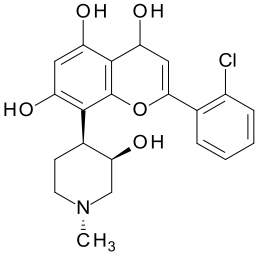
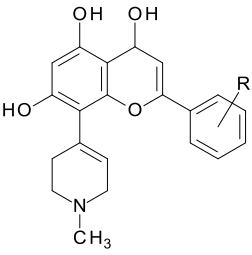
Όπως έχει αναλυθεί και στην ενότητα 1.5, σε πολλά ολιγομερή ένζυμα παρατηρείται το φαινόμενο της συνέργειας, κατά το οποίο η δέσμευση ενός μορίου-δεσμευτή σε μια περιοχή δέσμευσης επηρεάζει τη συγγένεια κάποιας άλλης θέσης δέσμευσης του ενζύμου για το δεσμευτή, κάτι το οποίο προϋποθέτει την δυνατότητα επικοινωνίας μεταξύ των περιοχών δέσμευσης. Αυτό συμβαίνει επειδή

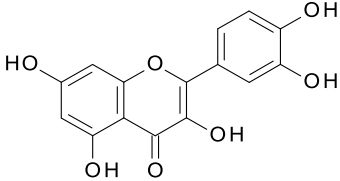
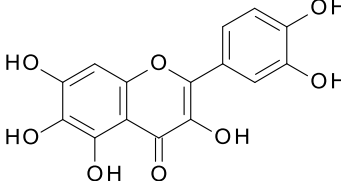
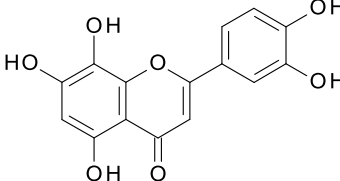
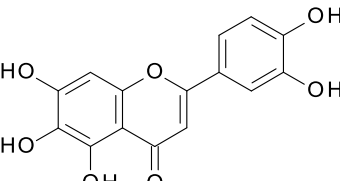
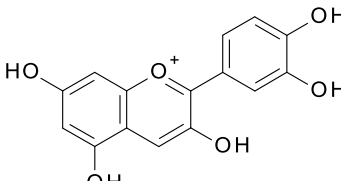
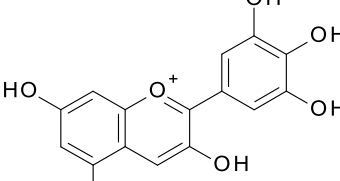
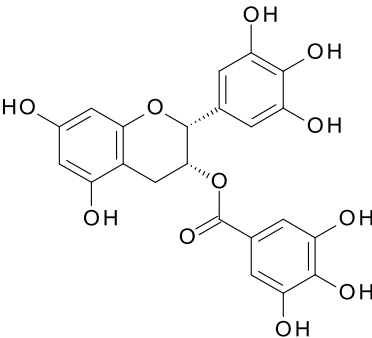
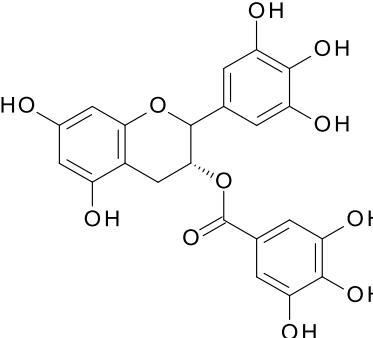
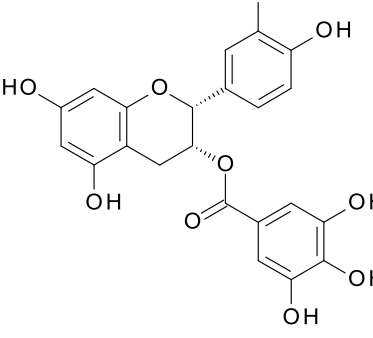
τα άτομα σε ένα τυπικό ένζυμο βρίσκονται κοντά το ένα στο άλλο, ακόμα και μικρές μεταβολές στη στερεοδιάταξη των πλευρικών ομάδων των αμινοξικών κατάλοιπων σε μία υπομονάδα, είναι δυνατόν να μεταφερθούν, μέσω της τριτοταγούς δομής, και να επιφέρουν στεροδιατακτικές μεταβολές σε κάποια άλλη μακρινή περιοχή του ενζυμικού μορίου. [26]

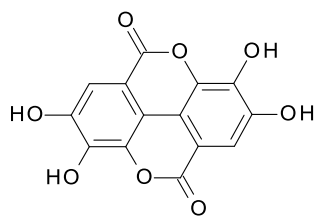
1.7 Ετεροκυκλικές ενώσεις ως αναστολείς της GP

Τα τερπενοειδή αντιπροσωπεύουν μια ομάδα φυτικών δευτερογενών μεταβολιτών και μπορούν να βρεθούν σε μικρές ποσότητες παίζοντας πολλούς ζωτικούς ρόλους στη φυσιολογία των φυτών και στις κυτταρικές μεμβράνες. Αποτελούνται από τρεις τερπενικές ή έξι μονάδες ισοπρενίου. Εμφανίζουν αρκετά αντιδιαβητικά χαρακτηριστικά, αναστέλλοντας τα ένζυμα μεταβολισμού της γλυκόζης, εμποδίζοντας την αντίσταση στην ινσουλίνη και διατηρώντας τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης στο πλάσμα σε φυσιολογικά επίπεδα. Μεταξύ των τερπενοειδών, τα τετρακυκλικά και πεντακυκλικά τριτερπένια (*PT*) είναι τα πιο άφθονα στη φύση. Τα *PT* εμφανίζουν αντικαρκινικές, αντι-ιικές, αντιδιαβητικές και αντιφλεγμονώδεις δυνατότητες. Τα *PT* έχει δειχθεί ότι αποτελούν αναστολείς της *GP*. Από αυτούς, το μασλινικό, το ασιατικό και το ολεανολικό οξέα έχουν αποδειχθεί ικανά να μειώσουν τη γλυκόζη αίματος σε διαβητικούς ποντικούς. [25]

Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι τα флаβονοειδή λειτουργούν ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, παρόλο που δεν έχουν έναν συγκεκριμένο τρόπο δράσης. Διαφορετικά флаβονοειδή προσδένονται σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης του ενζύμου. Το ελλαγικό οξύ (φυσικό флаβονοειδές) και η флаβοπιριδόλη (συνθετικό флаβονοειδές) αποτελούν τις πιο ισχυρές ενώσεις που έχουν βρεθεί ότι αναστέλλουν την *GP* και προσδένονται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Εκτός από τους παραπάνω γνωστούς αναστολείς, αναστολή παρουσιάζουν και άλλα флаβονοειδή, τα οποία είτε προσδένονται σε ένα από τα υπόλοιπα κέντρα της *GP* είτε ο τρόπος σύνδεσης τους δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμη. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) παρουσιάζονται τα флаβονοειδή που βρέθηκαν ως οι ισχυρότεροι αναστολείς. Ενώ αρχικά θεωρήθηκε ότι τα флаβονοειδή ασκούν την ανασταλτική τους δράση μέσω δέσμευσης στο ίδιο κέντρο πρόσδεσης της *GP*, πρόσφατες μελέτες απεκάλυψαν ότι ο τρόπος δράσης τους και η θέση πρόσδεσης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη θέση των διάφορων ομάδων στο флаβονοειδές ικρίωμα. [25]

Φλαβοπυριδόλη	K_i (μM)	Ανάλογα Φλαβοπυριδόλης	R	K_i (μM)
	1.16 1.24		H	1.28
			2-Cl	0.99
			3-Cl	0.83
			4-Cl	1.89
			2-F	2.75
			2-Br	1.50
			3,5-diCl	2.50

		
Quercetin $IC_{50}(\text{GPa}) = 4.8$ $IC_{50}(\text{GPb}) = 20.9$ Κέντρο πρόσδεσης: Κερσετίνης	Quercetagenin $IC_{50}(\text{GPb}) = 9.7, (3.5(K_i))$ Κέντρο πρόσδεσης: αλλοστερικό	hypolaetin $IC_{50}(\text{GPb}) = 15.7$ Κέντρο πρόσδεσης: Άγνωστο
		
6-hydroxyluteolin $IC_{50}(\text{GPb}) = 11.6$ Κέντρο πρόσδεσης: Άγνωστο	Cyanidin $IC_{50}(\text{GPa}) = 3.0$ $IC_{50}(\text{GPb}) = 9.0$ Κέντρο πρόσδεσης: Άγνωστο	delphinidin $IC_{50}(\text{GPa}) = 3.1$ $IC_{50}(\text{GPb}) = 10.7$ Κέντρο πρόσδεσης: Άγνωστο
		
EGCG $IC_{50}(\text{GPa}) = 7.7$ $IC_{50}(\text{GPb}) = 33.9$ Κέντρο πρόσδεσης: Άγνωστο	GCG $IC_{50}(\text{GPb}) = 6.3$ Κέντρο πρόσδεσης: Νέο αλλοστερικό	ECG $IC_{50}(\text{GPa}) = 12.5$ $IC_{50}(\text{GPb}) = 27.0$ Κέντρο πρόσδεσης: Άγνωστο

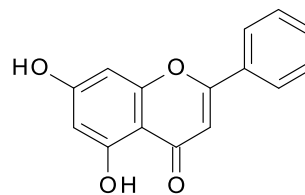


Ellagic acid

$IC_{50}(GPa) = 3.2$

$IC_{50}(GPb) = 12.1$

Κέντρο πρόσδεσης: Αναστολέα



Chrysin

$IC_{50}(GPa) = 27.5$

$IC_{50}(GPb) = 15.3, (19.01(K_i))$

Κέντρο πρόσδεσης: Αναστολέα

Πίνακας 1: Μερικά από τα πιο ισχυρά φλαβονοειδή που έχουν βρεθεί έναντι της GP μέχρι σήμερα. [25]

1.8 Σκοπός

Καθώς οι ήδη υπάρχουσες θεραπευτικές αγωγές για το διαβήτη τύπου 2 δεν είναι ικανοποιητικές, υπάρχει ενδιαφέρον για την εύρεση ενός άλλου δραστικού και ασφαλούς τρόπου ρύθμισης των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Μια μοριακή προσέγγιση στοχεύει στην μείωση παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ με αναστολή της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η οποία είναι ένα ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης. Γι' αυτό, η GP χρησιμοποιείται ως στόχος για την σύνθεση αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. [33] Οι πιο διαδεδομένοι και ευρέως μελετημένοι αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι τα ανάλογα της γλυκόζης που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Παρ' ότι το καταλυτικό κέντρο της GP είναι αρκετά καλά μελετημένο με μελέτες αλληλεπίδρασης με πολλά ανάλογα γλυκόζης, δεν συμβαίνει το ίδιο με τα άλλα κέντρα του ενζύμου, όπως το κέντρο αναστολής. Το κέντρο αναστολής παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον διότι, οι ενώσεις που προσδένονται στο συγκεκριμένο κέντρο είναι πιο ισχυροί παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ανασταλτική δράση τους θα μπορούσε να ρυθμιστεί από τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και να μειωθεί όταν αυτά πλησιάζουν στο φυσιολογικό, μειώνοντας τον κίνδυνο υπογλυκαιμίας [5]. Όπως αναφέραμε και στην ενότητα 1.4, οι ενώσεις που έχουν βρεθεί να προσδένονται στο ένζυμο μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X είναι πολύ λιγότερες σε αριθμό συγκριτικά με τις μελέτες που έχουν γίνει στοχεύοντας το καταλυτικό κέντρο. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήσαμε την πρόσδεση της ένωσης **GB-P2-4i** στην *rmGPb* μέσω κινητικών μελετών ώστε να προσδιορίσουμε τη σταθερά αναστολής του ως προς το ένζυμο αλλά και το κέντρο πρόσδεσης. Η ένωση αυτή είχε προκύψει από μελέτες μοριακού μοντελισμού που έγιναν από τον *Dr Joseph Hayes* του Πανεπιστημίου του *Lancashire* ενώ η σύνθεση της έγινε από τον καθηγητή *Goutam Brachmachari* του Πανεπιστημίου *Bharati* της Ινδίας.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Αντιδραστήρια

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Εταιρεία</i>
Acetic acid (CH ₃ COOH)	Sds
α-D-Glucose 1-Phosphate Dipotassium Salt hydrate	Sigma
Acrylamide	Serva
Activated Charcoal	Sigma
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma
Ammonium Molybdate	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Ammonium sulfate	ChemLab
BES	Sigma
Bis acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay 5x	Biorad
Bromophenole blue	Research Organics
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Imidazole 99%	Sigma
KHCO ₃	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
Magnesium acetate tetrahydrate (CH ₃ COOH) ₂ Mg	Applichem
Methanol	Scharleu
Potassium chloride (KCl)	Merck
SDS	Serva
Sodium carbonate anhydrous	Sds
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Spermine	Sigma
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra Pure	Applichem
Zinc acetate	Sigma
β-GP	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Πυκνό διάλυμα αμμωνίας	Fluka

2.2 Οργανολογία

Όργανο	Εταιρεία
Φυγόκεντρος - Z36HK	HermLe
Πεχάμετρο	Metrohm
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρηση (mini gel)	BioRad
Υδατόλουτρο	Wisd
Φωτόμετρο UV-VIS	VWR
ÄKTA Purifier (FPLC)	GE Healthcare Life Sciences
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma

2.3 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών - Πηκτώματα

2.3.1 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων και βασίζεται στην δυνατότητα μορίων που φέρουν καθαρό φορτίο να μετακινηθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ($E=F/z$), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και τον συντελεστή τριβής (f). Η τεχνική αυτή μπορεί να διαχωρίσει πρωτεΐνες που διαφέρουν κατά λίγες εκατοντάδες *daltons* στο μοριακό τους βάρος και κατά 0.1 μονάδα του *pH* στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Η ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*) αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο ηλεκτροφόρησης. Η μέθοδος *SDS-PAGE* εφαρμόζεται συχνά στα κλάσματα που προέρχονται από τη χρωματογραφία πρωτεϊνών ώστε να γίνει μια οπτική παρατήρηση των προσμίξεων που υπάρχουν στο κάθε κλάσμα αλλά και για την αξιολόγηση της καθαρότητας της πρωτεΐνης, μιας και κάθε συστατικό θα διατρέξει το πήκτωμα και θα διαχωριστεί ανάλογα με το μοριακό του βάρος. Αυτό που καθορίζει κυρίως την ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εκτός από το φορτίο τους είναι το πήκτωμα, το οποίο και τις σταθεροποιεί στη συγκεκριμένη θέση μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης. Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται κυρίως πολυακρυλαμίδα, η οποία διαθέτει κάποια χαρακτηριστικά που την καθιστούν ιδανική για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

Αυτά είναι τα εξής:

- Είναι δυνατόν να παρασκευαστεί πήκτωμα με διαφορετικό μέγεθος πόρων, για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών.
- Η αντίδραση πολυμερισμού είναι εύκολη.
- Το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από τις συνθήκες πολυμερισμού και μπορεί εύκολα να μεταβληθεί αλλάζοντας τη συγκέντρωση του μονομερούς.

- Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι υδρόφιλα και ηλεκτρικά ουδέτερα τη στιγμή που παρασκευάζονται.
- Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι διάφανα στο φως σε μήκη κύματος πάνω από 250 nm και δεν προσδένουν χρωστικές των πρωτεϊνών.

Για να σχηματιστεί το πήκτωμα γίνεται ανάμιξη του ακρυλαμιδίου με το με το *N'-N'methylbisacrylamide (bis)* και ξεκινούν να συν-πολυμερίζονται παρουσία ελευθέρων ριζών. Τα μονομερή του ακρυλαμιδίου πολυμερίζονται σε μακριές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με μόριο *bis* ακρυλαμιδίου, σχηματίζοντας έτσι ένα στερεό πήκτωμα, που αποτελείται από ίνες οι οποίες συγκρατούν τον διαλύτη στο εσωτερικό του πηκτώματος, ο οποίος είναι απαραίτητος για την διατήρηση του τρισδιάστατου σχήματος του πηκτώματος. Η δημιουργία των ελεύθερων ριζών απαιτείται για την εκκίνηση του πολυμερισμού και προκύπτει από την παρουσία *ammonium persulfate*, ενώ επιταχύνεται μέσω του *N,N,N',N'tetramethylethylenediamine (TEMED)*. Το *TEMED* επιταχύνει την μετατροπή του *APS* σε ελεύθερες ρίζες θείου οι οποίες είναι αυτές που ξεκινούν τον πολυμερισμό με μεγαλύτερη απόδοση σε αλκαλικό *pH*. Ο ρυθμός του πολυμερισμού εξαρτάται από την θερμοκρασία, την καθαρότητα των αντιδραστηρίων και την συγκέντρωση των μονομερών (ακρυλαμίδιο και *bis* ακρυλαμίδιο) που συμμετέχουν στην αντίδραση πολυμερισμού. Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει τον πολυμερισμό είναι το οξυγόνο που προτιμάται να απομακρύνεται με απαέρωση. Βέβαια, πηκτώματα καλής ποιότητας παράγονται και χωρίς να έχει προηγηθεί απαέρωση των διαλυμάτων. [34]

Η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου δημιουργείται μέσα σε μια κάθετη διάταξη 2 τζαμιών τα οποία μεταξύ τους απέχουν 1 mm. Οι θέσεις υποδοχής του δείγματος (φρεάτια) δημιουργούνται με την προσθήκη μιας χτένας που δημιουργεί τα φρεάτια κατά την πήξη της πηκτής επιστοίβαξης. Μόλις παρασκευαστεί η πηκτή τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (*running buffer*: 25 mM *Tris*, 192 mM *Glycine*, 0.1 % *SDS*). Τα δείγματα προετοιμάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4× έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραίωση των δειγμάτων να είναι 1× (10 % *glycerol*, 154 mM *Tris*, 2 % *SDS*, 0.01 % *bromophenol blue*, 1.25 % *β-Mercaptoethanol*). Στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5 min στους 95-98 °C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε δείγμα. Έπειτα, τα δείγματα και ο πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών φορτώνονται στα πηγάδια. Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται στο τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 120 V στο κλειστό κύκλωμα μεταξύ της δεξαμενής της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στον Πίνακα 2 φαίνεται η σύσταση για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης σε διαφορετικές πυκνότητες.

Παρασκευή πηκτωμάτων (% πυκνότητα)			
		10%	15%
Συστατικά	Επιστοιβάξης (3ml)	Διαχωρισμού (5ml)	
dH₂O	2.1	1.9	1.1
30% Acrylamide-mix	0.5	1.7	2.5
Tris 1.5 M, pH 8.8	-	1.3	1.3
Tris 1.0 M, pH 6.8	0.38	-	-
SDS (10%)	0.03	0.05	0.05
APS 10%	0.03	0.05	0.05
TEMED	0.003	0.002	0.002

Πίνακας 2 : Αναλογία συστατικών για την παρασκευή πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου διαφορετικής πυκνότητας

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μέσω της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην αρχή πως ένα φορτισμένο μόριο θα μεταναστεύσει σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, λόγω της ροής του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης διαμέσου του πηκτώματος. Η κοινή πορεία, από την κάθοδο προς την άνοδο, όλων των μορίων που περιέχονται σε κάθε δείγμα, εξασφαλίζεται με την προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ο οποίος καταργεί τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων φορτίζοντάς τα αρνητικά και προσδίδοντάς τους ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, ώστε να μεταναστεύσουν όλα προς την άνοδο και να διαχωριστούν βάσει του μοριακού τους βάρους. Η μερκαπτοαιθανόλη στο διάλυμα συμβάλλει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών ανάγοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ η γλυκερόλη αποτρέπει τη διάχυση των πρωτεϊνών στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, καθώς τις διατηρεί σε ένα πυκνότερο διάλυμα. Επίσης το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί το pH του περιβάλλοντος σταθερό. Η γλυκίνη, που υπάρχει στο *running buffer*, είναι ασθενές οξύ και μπορεί να απαντηθεί σε δύο καταστάσεις, ένα αφόρτιστο αμφιτεριόν (σε χαμηλές τιμή pH) ή ένα φορτισμένο γλυκινικό ανιόν (σε υψηλότερες τιμές pH. Κατά τη διαβίβαση ηλεκτρικού ρεύματος, τα ιόντα της γλυκίνης απομακρύνονται από την κάθοδο και κατευθύνονται προς την άνοδο. Στην άνοδο βρίσκεται η πηκτή επιστοιβάξης και τα δείγματα που έχουν χαμηλή τιμή pH (pH 6.8) οπότε η γλυκίνη χάνει το φορτίο της και κινείται με μικρή ταχύτητα. Παράλληλα, στην πηκτή και στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιέχονται ιόντα χλωρίου που μετακινούνται, επίσης, από την κάθοδο με υψηλή κινητικότητα. Έτσι, δημιουργείται μια στενή ζώνη χαμηλής αγωγιμότητας στην κορυφή της πηκτής επιστοιβάξης όπου συγκεντρώνεται όλη η τάση του ρεύματος. Η πολύ υψηλή τάση του πεδίου οδηγεί τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες (από το SDS) να μεταναστεύσουν προς την κάθοδο. Οι πρωτεΐνες, λόγω του υψηλού λόγου φορτίο/μάζα που διαθέτουν σε σχέση με τη γλυκίνη, κινούνται ταχύτερα από τη

γλυκίνη, αλλά βραδύτερα από τα ιόντα χλωρίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συμπίκνωση του μετώπου ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε μια πολύ στενή ζώνη που μεταναστεύει προς την πηκτή διαχωρισμού. Όλες οι πρωτεΐνες που εμπεριέχονται στην πηκτή εισέρχονται ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού όπου η μετανάστευση είναι συνάρτηση του μοριακού μεγέθους καθώς αυξάνεται και η τριβή μεταξύ πρωτεϊνών και των πόρων του πλέγματος της πηκτής διαχωρισμού. Με την είσοδο στην πηκτή διαχωρισμού η γλυκίνη φορτίζεται αρνητικά λόγω της υψηλότερης τιμής του pH και κινείται ταχύτερα προς την άνοδο, ενώ οι πρωτεΐνες επιβραδύνονται διότι η πηκτή δρα ως ηθμός. Σε αυτό το σημείο οι πρωτεΐνες αρχίζουν να διαχωρίζονται στο ενιαίο ηλεκτρικό πεδίο ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης, και συνεπώς όσο μεγαλύτερο το μέγεθός της, τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητα του μορίου αυτού στην πηκτή.

2.3.2 Χρώση πηκτώματος

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα που λαμβάνουμε τοποθετείται σε διάλυμα 10 % v/v οξικού οξέος μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min. Το διάλυμα οξικού οξέως αποχύνεται και η πηκτή (*gel*) τοποθετείται σε διάλυμα χρώσης (*Staining solution*: 0,1 % w/v *Brilliant blue R-250*, 50 % μεθανόλη, 5 % v/v οξικό οξύ) υπό ανάδευση για περίπου 10 min. Έπειτα το πήκτωμα επανατοποθετείται στον φούρνο μικροκυμάτων για 1 min και πάλι υπό ανάδευση για 10 min. Αποχύνουμε το διάλυμα χρώσης και προσθέτουμε πάλι διάλυμα οξικού οξέος 10% v/v υπό ανάδευση έως ότου αποχρωματιστεί τελείως το πήκτωμα.

2.4 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος *Bradford* χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της ολικής ποσότητας των πρωτεϊνών. Η μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση ότι η χρωστική *Coomassie Brilliant Blue G-250* σε όζινες συνθήκες απορροφά σε μήκος κύματος 465 nm όταν είναι μόνη της στο διάλυμα και η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται σε μήκος κύματος 595 nm όταν είναι προσδεσμένη σε πρωτεΐνη, καθώς αντιδρά με τα αμινοξέα της και δημιουργείται ένα χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με την πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιονική μπλε μορφή της χρωστικής που απορροφά σε μήκος κύματος 595 nm. Τυχόν αύξηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm είναι ενδεικτική της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη. Αρχικά, παρασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων διαλυμάτων πρωτεΐνης *BSA* γνωστής συγκεντρώσεως. Σε όγκο 20 μL από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα προσθέτονται 780 μL απιονισμένο ύδωρ και 200 μL αντιδραστηρίου *Bradford 5x*, έτσι ώστε να γίνει 1x. Τα διαλύματα αναδεύτηκαν και αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 10 λεπτά.

Ακολούθησε ανάδευση των διαλυμάτων και φασματοφωτομέτρηση τους σε μήκος κύματος 595 nm. Τέλος υπολογίστηκε η συγκέντρωση τους βάσει της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης.

2.5 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGPb)

Η απομόνωση της *rmGPb* (*rabbit muscle Glycogen Phosphorylase b*) έγινε από σκελετικούς μύες κονίκλων μετά από τροποποίηση της μεθόδου των *Ficher* και *Krebs*, με τη χρήση β -μερκαπτοαιθανόλης αντί *L*-κυστεΐνης σε όλα τα στάδια της πορείας του καθαρισμού. [35]

Πειραματική διαδικασία:

Ημέρα 1^η

A. Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος.

Ο μυϊκός ιστός λαμβάνεται από τα πίσω πόδια καθώς και από τους ραχιαίους μυς κοντά στη σπονδυλική στήλη από τους 3 αρσενικούς κονίκλους και τοποθετείται αμέσως σε πάγο. Έπειτα, ομογενοποιείται σε κρεατομηχανή, ζυγίζεται και επανατοποθετείται σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η άλεση όλου του ιστού. Ακολουθεί εκχύλιση του ομογενοποιημένου ιστού με απιονισμένο ύδωρ 3 φορές εν ψυχρώ. Τις δύο πρώτες φορές χρησιμοποιείται ίσος όγκος κιμά και απιονισμένου ύδατος, ενώ στην τρίτη εκχύλιση χρησιμοποιείται μισός όγκος ύδατος σε σχέση με τον όγκο του κιμά. Η διήθηση γίνεται μέσω διπλής γάζας. Ο συνολικός χρόνος εκχύλισης δεν πρέπει να ξεπεράσει τα 30 min. Η παραπάνω διαδικασία, το ζύμωμα του κιμά δηλαδή, πραγματοποιείται για να βγει η *GPb* από τα ζωικά κύτταρα. Το τελικό εκχύλισμα διηθείται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών.

B. Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον.

Αρχικά γίνεται ρύθμιση του *pH* του ψυχρού εκχυλίσματος σε 5.1 - 5.2 με προσθήκη 1 N CH_3COOH υπό ελαφρά ανάδευση, οπότε παρατηρείται αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος εξαιτίας της κατακρήμνισης διάφορων πρωτεϊνών. Το εκχύλισμα αφήνεται σε πάγο για 5 min. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που καταβυθίστηκαν πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0-4 °C σε 4.225 rcf επί 30 min. Έπειτα, το υπερκείμενο υγρό διηθείται με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί *Buchner*, εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Σ' αυτό το σημείο κρατάμε το πρώτο δείγμα για την *SDS-PAGE* (δείγμα A). Ακολουθεί ρύθμιση του *pH* του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος σε 6.8 με τη χρήση κεκορεσμένου διαλύματος $KHCO_3$ και ογκομέτρηση (4,910lt).

Γ. Καταβύθιση του ενζύμου με θειικό αμμώνιο (90 % w/v).

Ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος θειικού αμμωνίου υπολογίζεται από τον τύπο $0.837 \times$ όγκος εκχυλίσματος. Έπειτα ρυθμίζεται το pH του διαλύματος σε 6.8 με την προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνής αμμωνίας (NH_4OH). Στη συνέχεια προσθέτουμε το διάλυμα του θειικού αμμωνίου στο πρωτεϊνικό διάλυμα αργά και με συνεχή ανάδευση και το μίγμα αφήνεται στο ψυκτικό θάλαμο για 24 hrs. Παράλληλα, 20 λίτρα απιονισμένου ύδατος ψύχονται στο ψυκτικό θάλαμο για την παρασκευή του διαλύματος διαπίδυσης την επόμενη ημέρα.

Ημέρα 2^η

Προετοιμασία μεμβρανών διαπίδυσης

Κόβουμε την μεμβράνη στο μήκος που θέλουμε. Ζυγίζουμε 6.5 g Na_2CO_3 και 2.44 g $EDTA$ για την προετοιμασία 650 ml διαλύματος. Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετούνται στο παραπάνω διάλυμα και αφήνονται να βράσουν για 30 min. Στη συνέχεια, τα σακουλάκια ξεπλένονται πολύ καλά με απιονισμένο νερό. Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετούνται σε απιονισμένο νερό και αφήνονται να βράσουν για περίπου 30min. Αφού ξεπλυθούν πολύ καλά φυλάσσονται σε καθαρή αλκοόλη στους 4°C.

Μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο έχουν σχηματιστεί 2 φάσεις, το υπερκείμενο και το ίζημα. Ο μεγαλύτερος όγκος του υπερκείμενου διαλύματος αποχύνεται με τη χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0–4 °C σε 5110 rcf επί 40 min. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα αποχύνεται και το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου. Εδώ κρατάμε το δείγμα *B* για την *SDS-PAGE*. Ακολούθως προετοιμάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα *Tris* 0.001 M pH 7.5 όγκου 2 Lt ως εξής: 10 ml διαλύματος *Tris* 2 M αραιώνονται με απιονισμένο ύδωρ σε όγκο 400 ml (συγκέντρωση περίπου 50 mM). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στη τιμή 7.5 με τη χρήση διαλύματος 1 N *HCl*. Το διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται σε τελικό όγκο 20 Lt με τη χρησιμοποίηση του απιονισμένου ύδατος που έχει ψυχθεί. Τα σακουλάκια διαπίδυσης πλένονται με απιονισμένο ύδωρ για την απομάκρυνση του αιθανολικού διαλύματος στο οποίο φυλάσσονται και το διαλυτοποιημένο ένζυμο τοποθετείται σε αυτά, τα οποία εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα *Tris* 0.001 M, pH 7.5 στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα υπό ανάδευση.

Ημέρα 3^η

A. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Συλλέγουμε το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά τη διαπίδυση σε ογκομετρικό κύλινδρο και ακολουθεί διαύγαση του πρωτεϊνικού διαλύματος με φυγοκέντρηση στις 34.540 rcf για 15 min σε 0–4 °C. Το υπερκείμενο υγρό ογκομετρείται (95ml). Έπειτα, γίνεται

προσθήκη πρόσφατου διαλύματος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

$$\begin{aligned}\text{Όγκος } 0.3 \text{ M } 2\text{-μερκαπτοαιθανόλης} &= \text{πρωτεϊνικός όγκος} \times 3/27 \\ &= 95\text{ml} \times 3/27 = 10.55 \text{ mL}\end{aligned}$$

καθώς και προσθήκη διαλύματος EDTA 0.1 M, pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος EDTA } 0.1 \text{ M} = \text{πρωτεϊνικός όγκος μετά την προσθήκη του διαλύματος } 0.3 \text{ M } 2\text{-μερκαπτοαιθανόλης} \times 5/1000 = (10.55\text{ml} + 95\text{ml}) \times 5/1000 = 0.527\text{ml}$$

Ακολουθεί αργή και υπό ανάδευση προσθήκη διαλύματος 2 M *Tris* ώστε το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος να γίνει 8.8. Στη συνέχεια, το μίγμα επωάζεται στους 37 °C επί 1 hr με ταυτόχρονη ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα και έπειτα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 10 – 15 min και το pH ρυθμίζεται σε τιμή 7.0 με τη χρήση διαλύματος CH_3COOH 1 N (Κρατάμε δείγμα Γ). Τέλος για τη διαύγαση του διαλύματος πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 34.540 rcf επί 10 min σε 25-30 °C με τη χρήση της μικρής κεφαλής (Δείγμα Δ).

B. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β

Το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα μετά τη φυγοκέντρηση ογκομετρείται. Γίνεται προθήκη διαλύματος AMP 0.1 M, pH 7.0 στο υπερκείμενο σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος AMP } 0.1 \text{ M, pH } 7.0 = \text{πρωτεϊνικός όγκος} \times 1/100 = 105\text{ml}/100 = 1.05\text{ml}$$

Καθώς και προσθήκη διαλύματος $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος } (\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg, pH } 7.0 = \text{πρωτεϊνικός όγκος} \times 1/100 = 105\text{ml}/100 = 1.05\text{ml}$$

Το διάλυμα τοποθετείται σε μικρά tubes φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται, καλύπτεται με *parafilm*, και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα για να κρυσταλλωθεί (οι κρύσταλλοι αρχίζουν να φαίνονται σε 1-2 h).

Ημέρα 4^η

Γίνεται συλλογή των κρυστάλλων της φωσφορυλάσης με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf σε θερμοκρασία 0–4 °C επί 10 min. Διαλυτοποιούμε το κρυσταλλικό ίζημα στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1, pH 6.8 σε θερμοκρασία 30 °C εντός του υδατόλουτρου. Ακολουθεί διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf επί 10 min σε θερμοκρασία 25-30 °C και το υπερκείμενο ενζυμικό υγρό ογκομετρείται. Έπειτα, γίνεται προσθήκη διαλύματος AMP 0.1 M, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Όγκος AMP } 0.1 \text{ M, pH } 7.0 = \text{πρωτεϊνικός όγκος} \times 1/100 = 61\text{ml}/100 = 610 \mu\text{l}$$

Καθώς και προσθήκη διαλύματος $(CH_3COO)_2Mg$, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος $(CH_3COO)_2Mg$, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100 = 61ml/100 = 610 μ l

Από το διάλυμα που προκύπτει κρατάμε το δείγμα E, έπειτα τοποθετείται σε μικρούς σωλήνες φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στο ψυκτικό θάλαμο για 3-4 hrs (1^η ανακρυστάλλωση). Η διαδικασία της 1^{ης} ανακρυστάλλωσης επαναλαμβάνεται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο ύστερα από 3-4 hrs και έτσι λαμβάνει χώρα η 2^η ανακρυστάλλωση, από την οποία έχουμε αντιστοίχως κρατήσει δείγμα ΣΤ για την SDS-PAGE, και το μίγμα αφήνεται για μία νύκτα στον ψυκτικό θάλαμο.

Ημέρα 5^η

Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία της ανακρυστάλλωσης που περιγράφηκε την 4η ημέρα (1^η ανακρυστάλλωση) χωρίς όμως την προσθήκη AMP και $(CH_3COO)_2Mg$ και έτσι λαμβάνει χώρα η 3^η ανακρυστάλλωση, από όπου κρατάμε δείγμα Z. Συνεχίζουμε πραγματοποιώντας την ίδια διαδικασία δύο ακόμα φορές, κρατώντας αντιστοίχως δείγματα H και Θ. Για να προσδιορίσουμε φωτομετρικά στο τελικό ενζυμικό διάλυμα, τελικού όγκου 7.8 mL, τη συγκέντρωση της φωσφορυλάσης β , προσθέτουμε 10 μ l ενζυμικού δείγματος, 2500 μ l ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 και φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 280 nm. Η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίζεται από τη σχέση:

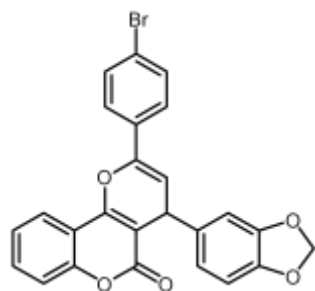
$(OD_{280}/1.32) \times (2510/10) = [GPb]$, mg/mL = 139,113 mg/mL, με απόδοση 1,085g.

Τέλος, το ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης και φυλάσσεται στους -20°C.

2.6 Κινητικές μελέτες έναντι της GP

Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση είναι αμφίδρομη. Στις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήσαμε *in vitro* έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μελετήσαμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, δηλαδή την ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο ώστε να προκύψει γλυκογόνο με ένα περισσότερο κατάλοιπο γλυκόζης με παράλληλη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων από την G1P. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά ώστε να ποσοτικοποιηθούν με την μέθοδο του ασκορβικού οξέος. [36]

Κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της IC_{50} του αναστολέα **GB-P2-4i** (εικόνα 13), για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής (K_i) ως προς την *rmGPb* αλλά και τον προσδιορισμό του κέντρου της πρόσδεσής του στο ένζυμο. Μετά τον προσδιορισμό της K_i , πραγματοποιήθηκαν δύο ξεχωριστές κινητικές μελέτες για τον έλεγχο συναγωνισμού του **GB-P2-4i** έναντι της καφεΐνης και της AMP.



Εικόνα 13: Η χημική δομή της ένωσης GB-P2-4i

2.6.1 Καθαρισμός γλυκογόνου από νουκλεοτίδια

Ο καθαρισμός ξεκινάει με την διαλυτοποίηση 22.5 g γλυκογόνου σε 450 ml απιονισμένου ύδατος και ανάδευση με γυάλινη ράβδο. Έπειτα, προστίθενται 1 g ζωάνθρακα και η ανάδευση συνεχίζεται για 10 min. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 4225 g σε θερμοκρασία 8 °C για 10 min. Η παραπάνω επεξεργασία με ζωάνθρακα επαναλαμβάνεται. Φιλτράρουμε το υπερκείμενο με συσκευή διήθησης υπό κενό (*Buchner*) και τοποθετούμε το διήθημα σε πάγο. Προσθέτουμε στο διήθημα 1.5 όγκο απόλυτης αιθανόλης (δηλ. όγκος διηθήματος = όγκος αιθανόλης × 1.5) και το αφήνουμε σε πάγο για 15 min. Ακολουθως, φυγοκεντρούμε το διάλυμα στις 4225 g σε θερμοκρασία 4 °C για 10 min, κρατάμε το ίζημα και το φιλτράρουμε με συσκευή διήθησης υπό κενό. Το φιλτραρισμένο ίζημα ξεπλένεται με απόλυτη αιθανόλη και λυοφιλοποιείται. Τέλος, ζυγίζουμε το γλυκογόνο και προσθέτουμε ανάλογο όγκο απιονισμένου ύδατος ώστε να προκύψει διάλυμα 10 % $\frac{w}{v}$.

2.6.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φωσφορικών ιόντων

Η αρχή της μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων βασίζεται στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των φωσφορικών ιόντων, με τη δημιουργία χρωμοφόρου συμπλόκου ένωσης. Τα φωσφορικά ιόντα σχηματίζουν σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου (Zn^{2+}). Η αντίδραση προχωρά σε pH 5.0, και μετά από αναγωγή με το ασκορβικό οξύ, παράγεται ένα χρωμοφόρο το οποίο έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. Απουσία ορθοφωσφορικών ιόντων, το χρωμοφόρο δεν παράγεται.

Παρασκευάζουμε τα διαλύματα ως εξής:

- Διάλυμα 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100 mM οξικού ψευδαργύρου. Το pH του μίγματος ρυθμίζεται στο 5.0 με πυκνό HCl και φυλάσσουμε το διάλυμα σε αδιαφανές μπουκάλι και μακριά από ηλιακή ακτινοβολία σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10 % $\frac{w}{v}$, pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με πυκνό NaOH και φυλάσσουμε το διάλυμα σε αδιαφανές μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα ασκορβικού οξέος παρασκευάζεται φρέσκο κάθε φόρα.

Αφού ετοιμάσουμε τα δύο διαλύματα και γίνει η ρύθμιση του *pH*, αναμιγνύουμε το διάλυμα οξικού ψευδαργύρου/μολυβδαινικού αμμωνίου με το διάλυμα ασκορβικού οξέος σε αναλογία 4:1 σε ένα αδιαφανές σκούρο δοχείο. Αφήνουμε το μίγμα για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση. Έπειτα, προσθέτουμε στα δείγματα κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος και τα αφήνουμε για επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για άλλα 15 min σε υδατόλουτρο. Για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε την ποσότητα των ορθοφωσφορικών ανιόντων σε ένα δείγμα, πρέπει να παρασκευάσουμε ένα δείγμα αναφοράς ορθοφωσφορικών ανιόντων, στο οποίο θα μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση, ώστε να το χρησιμοποιήσουμε ως πρότυπο για τον υπολογισμό της ποσότητας στο άγνωστο δείγμα. [36]

2.6.3 Ενζυμικό διάλυμα

Από το ένζυμο το οποίο είχαμε αποθηκεύσει με γλυκερόλη παρασκευάσαμε μια αραιώση της οποίας τη συγκέντρωση προσδιορίσαμε φασματοφωτομετρικά, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Η συγκέντρωση αυτής της αραιώσης ήταν ίση με $358 \frac{\mu g}{ml}$ και το ενζυμικό διάλυμα που παρασκευάσαμε είχε συγκέντρωση $15 \frac{\mu g}{ml}$ σε όγκο 240 μL , έτσι ώστε στον όγκο της αντίδρασης, που είναι 180 μL , η συγκέντρωση της *rmGPb* να γίνει $3 \frac{\mu g}{ml}$. Στο ενζυμικό διάλυμα προσθέσαμε *GPb*, γλυκογόνο και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 στις αναλογίες που αναφέρονται παρακάτω (Πίνακας 3):

Ενζυμικό διάλυμα <i>rmGPb</i>	
Αρχικές συγκεντρώσεις και ποσότητες	Τελικές συγκεντρώσεις
Glycogen 10% w/v, 24 μL	Glycogen 1 % w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1, 12 μL	Ρυθμιστικό διάλυμα 2.5:2.5:0.05
<i>rmGPb</i> $358 \frac{\mu g}{ml}$, 50.3 μL	<i>rmGPb</i> $15 \frac{\mu g}{ml}$
dH ₂ O 969.7 μL	
V _τ = 240 μL	

Πίνακας 3: Παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος *rmGPb*.

Αφήσαμε το ενζυμικό διάλυμα σε θερμοκρασία 30 °C στο υδατόλουτρο για 15 min, έτσι ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του ενζύμου με το γλυκογόνο.

2.6.4 Διαλύματα υποστρωμάτων και πειραματική διαδικασία

Μελετάμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης που καταλύει η φωσφορυλάση, δηλαδή αυτήν της προσθήκη της G1P στο μακρομόριο του γλυκογόνου. Επομένως, το υπόστρωμα στις παρούσες κινητικές μελέτες ήταν η α -D-1-φωσφορική γλυκόζη. Αρχικά, παρασκευάσαμε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 1 (*Assay Buffer 1*) που περιέχει 400 mM *KCl*, 200mM ιμιδαζόλιο, 4 mM *DTT*, 4 mM *EDTA*. Από αυτό με αραιώση παρασκευάσαμε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 2 (*Assay Buffer 2*) ώστε να περιέχει 270 mM *KCl*, 135 mM ιμιδαζόλιο, 2.7 mM *DTT*, 2.7 mM *EDTA*. Σε αυτές

τις συνθήκες βρίσκονται οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος που μελετάμε. Παρασκευάσαμε ένα πυκνό υδατικό διάλυμα *G1P* με συγκέντρωση 400 mM στο οποίο ρυθμίσαμε το *pH* στο 6.8 και το αποθηκεύσαμε σε θερμοκρασία -20 °C, αφού πρώτα το διαμοιράσαμε σε κλάσματα των 500 μL. Από τα 400 mM παρασκευάσαμε *G1P* με συγκέντρωση 90 mM ως εξής:

Αρχικές συγκεντρώσεις και όγκοι	Τελικές συγκεντρώσεις
G1P 400 mM, 1913 μL	G1P 90mM
Assay Buffer 1 5738 μL	Assay Buffer 2
dH ₂ O 849 μL	
V _{τελ} = 8500 μL	

Οι υπόλοιπες αραιώσεις *G1P* που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν με αραιώση από την *G1P* 90 mM χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2.

G1P 90 mM (μL)	Assay Buffer 2 (μL)	Συγκέντρωση της αραιωμένης G1P
550	4950	9 mM
825	4675	13.5 mM
1100	4400	18 mM
1650	3850	27 mM
2750	2750	45 mM

Πίνακας 4: Παρασκευή πυκνών διαλυμάτων των υποστρωμάτων

Τα διαλύματα υποστρωμάτων περιείχαν: *G1P*, AMP και αναστολέα/εις όπως θα αναλυθεί για την κάθε μια περίπτωση παρακάτω. Ο όγκος του κάθε διαλύματος υποστρώματος ήταν 144 μL.

2.6.5 Πειραματική πορεία κινητικών μελετών

Τα διαλύματα των υποστρωμάτων τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C για 5 min πριν την λήξη των 15 min της επώασης του ενζυμικού διαλύματος, ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ένζυμο. Μετά το πέρας της επώασης, λάβαμε 36 μl από το ενζυμικό διάλυμα και τα προσθέσαμε στα 144 μl του πρώτου διαλύματος υποστρώματος. Εκείνη τη χρονική στιγμή, όπου t=0, ξεκίνησε η ενζυμική αντίδραση η οποία εξελίχθηκε σε όγκο αντίδρασης ίσο με 180 μl. Στη συνέχεια, πήραμε 40 μL από το μίγμα της αντίδρασης ανά 1, 2, 3, 4 min, και τα αποθέσαμε σε 10 μL SDS 1% (w/v). Έπειτα, κάναμε έντονη ανάδευση ώστε να σταματήσει πλήρως η αντίδραση. Αφού τελειώσαμε με όλες τις συγκεντρώσεις του αναστολέα, τοποθετήσαμε τα δείγματα σε θερμοκρασία 4 °C. Ακολούθησε η ανάμιξη του διαλύματος φωτομέτρησης όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.6.2.

Παράλληλα παρασκευάσαμε διαλύματα τα οποία είχαν ρόλο “τυφλού μάρτυρα” ώστε να προσδιορίσουμε την ποσότητα των φωσφορικών ιόντων που υπάρχουν στο ενζυμικό διάλυμα, στα διαλύματα υποστρωμάτων και στον αναστολέα με απώτερο

στόχο την ποσοτικοποίηση των φωσφορικών ιόντων που παρήχθησαν μόνο από την ενζυμική αντίδραση. Για το σκοπό αυτό παρασκευάσαμε και ένα δείγμα γνωστής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων. Πιο αναλυτικά παρασκευάσαμε τα παρακάτω δείγματα εις διπλούν:

Τυφλό dH₂O	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 40 μL dH ₂ O
Τυφλό ενζυμικού διαλύματος	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 32 μL dH ₂ O+ 8 μL ενζυμικού διαλύματος
Τυφλό G1P	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 31.1 μL dH ₂ O+ 8.9 μL από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση G1P
Τυφλό φωσφορικών	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 30 μL dH ₂ O+ 10 μL Pi 1 mM
Τυφλό αναστολέα	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 36 μL dH ₂ O+ 4 μL GB-P2-4i 25 mM

Πίνακας 5: Παρασκευή τυφλών διαλυμάτων

Οι συνθήκες διεξαγωγής όλων των κινητικών μελετών σε 180 μL της αντίδρασης ήταν: pH 6.8, 30 °C, 60 mM KCl, 30 mM Imidazole, 0.6 mM DTT, 0.6 mM EDTA, 1 % ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 (0.5 mM β-φωσφορική γλυκερόλη, 0.5 mM β-Μερκατοαιθανόλη), 0.2 % (w/v) γλυκογόνο, 1 mM AMP και 2 % (v/v) DMSO. Οι συγκεντρώσεις της G1P και των αναστολέων διέφερε ανάλογα με την πειραματική προσέγγιση που ακολουθούσαμε, όπως θα αναλυθεί παρακάτω για κάθε μια περίπτωση.

Μετά το πέρας της διαδικασίας παρασκευάσαμε το διάλυμα φωτομέτρησης, όπως έχουμε περιγράψει στην ενότητα 2.6.2. Έπειτα, ακολούθησε προσθήκη 700 μL από το διάλυμα φωτομέτρησης σε όλα τα δείγματα, ανακίνηση, επώαση για 15 min σε θερμοκρασία 30 °C και τέλος, φασματοφωτομετρία σε μήκος κύματος 850 nm. Ως τυφλό για να μηδενίσουμε στο φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιήσαμε το τυφλό dH₂O. Παρ' ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη είναι ασταθής σε όξινο pH, στο pH 5.0 είναι αρκετά σταθερή. Οπότε, αυτή η φασματοφωτομετρική μέθοδος είναι κατάλληλη για τη μέτρηση του φωσφόρου που παράγεται κατά την αντίδραση της GP που μελετήσαμε. [37]

Στα 40 μL των τυφλών είχαμε 3 μg/mL *rmGPb*, τη μεγαλύτερη συγκέντρωση G1P (mM), ανάλογα την πειραματική προσέγγιση και 0.25 mM Pi. Από την απορρόφηση που πήραμε για την G1P, κάναμε αναγωγή για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις.

2.6.6 Προσδιορισμός της IC₅₀

Ζυγίσαμε ποσότητα αναστολέα, ώστε διαλύοντας τον σε πυκνό DMSO να έχει συγκέντρωση 100 mM. Ωστόσο, επειδή δεν διαλύθηκε εντελώς, προσθέσαμε επιπλέον DMSO ώστε ο αναστολέας να έχει συγκέντρωση 25 mM. Οι επόμενες

διαδοχικές αραιώσεις του αναστολέα επιλέχθηκαν ώστε η συγκέντρωση του *DMSO* στην αντίδραση να είναι 2%.

Για τον προσδιορισμό της IC_{50} χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα και ένα *control*, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης *G1P* 2 mM. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 250 μ M. Τα διαλύματα των υποστρωμάτων έγιναν σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6). Η πειραματική διαδικασία αναλύεται στην ενότητα 2.6.5.

GB-P2-4i	0 μM	50 μM	100 μM	150 μM	200 μM	250 μM
G1P 9mM (μL)	40	40	40	40	40	40
AMP 25 mM (μL)	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
DMSO/inhibitor (μL) (Stock GB-P2-4i, mM)	3.6/ -	-/3.6 (2.5)	-/ 3.6 (5)	-/ 3.6 (7.5)	-/ 3.6 (10)	-/ 3.6 (12.5)
dH₂O (μL)	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2
Ντελ= 144μl						

Πίνακας 6: Παρασκευή διαλυμάτων των υποστρωμάτων

Με βάση την IC_{50} , προχωρήσαμε στον προσδιορισμό των K_M και $K_{M(app)}$ ώστε να προσδιορίσουμε την K_i του αναστολέα. Για τον προσδιορισμό της $K_{M(app)}$ χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρωμάτων, όπως και για τον προσδιορισμό της K_M , παρουσία όμως μιας σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα κάθε φορά. Ο προσδιορισμός της K_i γίνεται με τουλάχιστον 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα.

2.6.7 Προσδιορισμός της K_i

Αρχικά έγινε ο προσδιορισμός της K_M του ενζύμου παρασκευάζοντας τα υποστρώματα όπως φαίνεται στον πίνακα 7. Οι συγκεντρώσεις της *G1P* στον όγκο της αντίδρασης (180 μ L) ήταν 2, 3, 4, 6, 10 mM. Για τον προσδιορισμό των $K_{M(app)}$ το παραπάνω πείραμα έγινε παρουσία μιας σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα κάθε φορά. Ο προσδιορισμός της K_i έγινε για τον αναστολέα **GB-P2-4i** έγινε προσδιορίζοντας τις $K_{M(app)}$ παρουσία συγκεντρώσεων 25, 50, 130, 150 μ M.

Η παρασκευή των υποστρωμάτων έγινε σύμφωνα με τους εξής πίνακες:

Για την K_M :

Συγκέντρωση G1P στα 180 μL αντίδρασης	2 mM	3 mM	4 mM	6 mM	10 mM
---	-------------	-------------	-------------	-------------	--------------

G1P (μL) (από stock)	40 (9 mM)	40 (13.5 mM)	40 (18 mM)	40 (27 mM)	40 (45 mM)
AMP 25mM (μL)	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
DMSO 100% (μL)	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
dH₂O (μL)	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2
Vτελ= 144μl					

Πίνακας 7: Παρασκευή διαλυμάτων των υποστρωμάτων για την K_M

Για την $K_{M(app)}$:

Συγκέντρωση G1P στα 180 μL αντίδρασης	2 mM	3 mM	4 mM	6 mM	10 mM
G1P (μL) (από stock)	40 (9 mM)	40 (13.5 mM)	40 (18 mM)	40 (27 mM)	40 (45 mM)
AMP 25mM (μL)	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
Inhibitor (DMSO 100%)	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
dH₂O (μL)	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2
Vτελ= 144μl					

Πίνακας 8: Παρασκευή διαλυμάτων των υποστρωμάτων για τις $K_{M(app)}$

Η πειραματική διαδικασία αναφέρεται αναλυτικά στην ενότητα 2.6.5.

2.6.8 Έλεγχος ύπαρξης συναγωνισμού για κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου

Η καφεΐνη και η AMP αποτελούν δύο από τους πλέον γνωστούς προσδέτες της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, οι οποίοι προσδένονται στο κέντρο αναστολής και στο αλλοστερικό κέντρο αντίστοιχα. Με σκοπό να διαπιστωθεί εάν ο αναστολέας **GB-P2-4i** αλληλεπιδρά με το κέντρο αναστολής ή με το αλλοστερικό κέντρο, μελετήθηκε η συμπεριφορά της αναστολής του **GB-P2-4i** σε σχέση αφενός με την καφεΐνη και αφετέρου με το AMP. [24, 33]

2.6.8.1 Έλεγχος συναγωνισμού μεταξύ αναστολέα GB-P2-4i και καφεΐνης

Οι κινητικές μελέτες για τον έλεγχο ύπαρξης συναγωνισμού ανάμεσα στους δύο αναστολείς της *rmGPb* (**GB-P2-4i**, καφεΐνη) έγιναν χρησιμοποιώντας 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις καφεΐνης (0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mM) και 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις **GB-P2-4i** (0, 25, 50, 100, 130, 150 μM). Κάθε πείραμα γινόταν παρουσία σταθερής συγκέντρωσης καφεΐνης και διαφορετικών συγκεντρώσεων του **GB-P2-4i**. Επιπλέον, σταθερή διατηρήθηκε η συγκέντρωση της G1P σε όλα τα υποστρώματα, όπου χρησιμοποιήθηκε αυτή των 10 mM. Για την παρασκευή των υποστρωμάτων υπολογίζουμε τις ποσότητες καφεΐνης που θα χρησιμοποιήσουμε ώστε να έχουμε τις επιθυμητές συγκεντρώσεις στην αντίδραση. Το πυκνό stock της καφεΐνης ήταν 2 mM.

Caffeine 2mM (μl)	[Caffeine] mM στα 180μl της αντίδρασης
9	0.1

18	0.2
36	0.4
72	0.8

Τα υλοστρώματα προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τους παρακάτω πίνακες.

Για καφεΐνη 0.1 mM:

[GB-P2-4i]	0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	130 μ M	150 μ M
[G1P] 10 mM (μ L)	40	40	40	40	40	40
[AMP] 25 mM (μ L)	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
[Caffeine] 2 mM (μ L)	9	9	9	9	9	9
DMSO 100%/ [GB-P2-4i] (μ L)	3.6/ -	-/ 3.6 (1.25mM)	-/ 3.6 (2.5mM)	-/ 3.6 (5mM)	-/ 3.6 (6.5mM)	-/ 3.6 (7.5mM)
dH ₂ O (μ L)	84.2	84.2	84.2	84.2	84.2	84.2

Για καφεΐνη 0.2 mM:

[GB-P2-4i]	0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	130 μ M	150 μ M
[G1P] 10 mM (μ L)	40	40	40	40	40	40
[AMP] 25 mM (μ L)	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
[Caffeine] 2 mM (μ L)	18	18	18	18	18	18
DMSO 100%/ [GB-P2-4i] (μ L)	3.6/ -	-/ 3.6 (1.25mM)	-/ 3.6 (2.5mM)	-/ 3.6 (5mM)	-/ 3.6 (6.5mM)	-/ 3.6 (7.5mM)
dH ₂ O (μ L)	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2	75.2

Για καφεΐνη 0.4 mM:

[GB-P2-4i]	0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	130 μ M	150 μ M
[G1P] 10 mM (μ L)	40	40	40	40	40	40

[AMP] 25 mM (μL)	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
[Caffeine] 2 mM (μL)	36	36	36	36	36	36
DMSO 100%/ [GB-P2-4i] (μL)	3.6/ -	-/ 3.6 (1.25mM)	-/ 3.6 (2.5mM)	-/ 3.6 (5mM)	-/ 3.6 (6.5mM)	-/ 3.6 (7.5mM)
dH ₂ O (μL)	57.2	57.2	57.2	57.2	57.2	57.2

Για καφεΐνη 0.8 mM:

[GB-P2-4i]	0 μM	25 μM	50 μM	100 μM	130 μM	150 μM
[G1P], 10 mM (μL)	40	40	40	40	40	40
[AMP], 25 mM (μL)	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
[Caffeine], 2 mM (μL)	72	72	72	72	72	72
DMSO 100%/ [GB-P2-4i] (μL)	3.6/ -	-/ 3.6 (1.25mM)	-/ 3.6 (2.5mM)	-/ 3.6 (5mM)	-/ 3.6 (6.5mM)	-/ 3.6 (7.5mM)
dH ₂ O (μL)	21.2	21.2	21.2	21.2	21.2	21.2

Η πειραματική πορεία αναφέρεται αναλυτικά στην ενότητα 2.6.5.

2.6.8.2 Έλεγχος συναγωνισμού μεταξύ αναστολέα *GB-P2-4i* και *AMP*

Οι κινητικές μελέτες για τον έλεγχο ύπαρξης συναγωνισμού μεταξύ του αναστολέα *GB-P2-4i* και της *AMP* πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις *AMP* (50, 100, 200, 400 μM) και 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις *GB-P2-4i* (0, 25, 50, 100, 130, 150 μM). Σε κάθε πείραμα κρατήσαμε σταθερή την εκάστοτε συγκέντρωση της *AMP* και χρησιμοποιούσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Επιπλέον, σταθερή διατηρήθηκε η συγκέντρωση της *G1P* σε όλα τα υποστρώματα, όπου χρησιμοποιήθηκε αυτή των 2.5 mM. Για την παρασκευή των υποστρωμάτων υπολογίσαμε τις ποσότητες της *AMP* που χρησιμοποιήσαμε ώστε να έχουμε τις επιθυμητές συγκεντρώσεις στην αντίδραση.

Το πυκνό διάλυμα της *AMP* είναι 2.5 mM.

AMP 2.5mM (μL)	[AMP], μM σε 180 μL της αντίδρασης
3.6	50
7.2	100
14.4	200

28.8	400
------	-----

Προετοιμάσαμε τα υποστρώματα σύμφωνα με τους παρακάτω πίνακες.

Για AMP 50 μ M:

[GB-P2-4i]	0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	130 μ M	150 μ M
G1P [2.5mM] (μ L)	40	40	40	40	40	40
AMP 50 μ M (μ L)	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
DMSO 100%/GB-P2-4i (μ L)	3.6/ -	-/ 3.6 (1.25mM)	-/ 3.6 (2.5mM)	-/ 3.6 (5mM)	-/ 3.6 (6.5mM)	-/ 3.6 (7.5mM)
dH ₂ O (μ L)	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8	96.8

Για AMP 100 μ M:

[GB-P2-4i]	0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	130 μ M	150 μ M
G1P [2.5mM] (μ L)	40	40	40	40	40	40
AMP 50 μ M (μ L)	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
DMSO 100%/GB-P2-4i (μ L)	3.6/ -	-/ 3.6 (1.25mM)	-/ 3.6 (2.5mM)	-/ 3.6 (5mM)	-/ 3.6 (6.5mM)	-/ 3.6 (7.5mM)
dH ₂ O (μ L)	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2	93.2

Για AMP 200 μ M:

[GB-P2-4i]	0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	130 μ M	150 μ M
G1P [2.5mM] (μ L)	40	40	40	40	40	40
AMP 50 μ M (μ L)	14.4	14.4	14.4	14.4	14.4	14.4
DMSO 100%/GB-P2-4i (μ L)	3.6/ -	-/ 3.6 (1.25mM)	-/ 3.6 (2.5mM)	-/ 3.6 (5mM)	-/ 3.6 (6.5mM)	-/ 3.6 (7.5mM)
dH ₂ O (μ L)	86	86	86	86	86	86

Για AMP 400 μ M:

[GB-P2-4i]	0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	130 μ M	150 μ M
G1P [2.5mM]	40	40	40	40	40	40

(μL)						
AMP 50 μM	28.8	28.8	28.8	28.8	28.8	28.8
(μL)						
DMSO 100%/ GB-P2-4i (μL)	3.6/ -	-/ 3.6 (1.25mM)	-/ 3.6 (2.5mM)	-/ 3.6 (5mM)	-/ 3.6 (6.5mM)	-/ 3.6 (7.5mM)
dH ₂ O (μL)	71.6	71.6	71.6	71.6	71.6	71.6

Η πειραματική πορεία αναφέρεται αναλυτικά στην ενότητα 2.6.5.

2.6.9 Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων και η παραγωγή των απαραίτητων διαγραμμάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα *GraFit*. [38] Προκειμένου να υπολογιστούν οι κινητικές παράμετροι (K_M , V_{max} , K_i) έπρεπε αρχικά να προσδιορίσουμε την ειδική δραστικότητα του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήσαμε. Η ειδική δραστικότητα ορίζεται ως τα μολ υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε *mg* πρωτεΐνης, δηλαδή $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

Για να υπολογίσουμε την ειδική δραστικότητα από τα αποτελέσματα του κινητικού πειράματος, έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε τα μολ φωσφορικών ιόντων που παρήχθησαν από την αντίδραση. Για το λόγο αυτό είχαμε παρασκευάσει ένα πρότυπο διάλυμα φωσφορικών ιόντων το οποίο είχε συγκέντρωση 0.25 mM. Τα 0.25 mM φωσφορικών ιόντων αντιστοιχούσαν σε 0.01 μολ φωσφορικών ιόντων, διότι:

$$0.25 \text{ mM} = 0.25 \text{ mmole/Lt} = 0.25 \text{ \mu mole/mL}$$

Άρα σε 1000 μL περιέχονταν 0.25 μολ φωσφορικών ιόντων. Επομένως, σε 40 μL που ήταν ο όγκος του τυφλού των φωσφορικών ιόντων που φωτομετρήσαμε είχαμε 0.01 μολ φωσφορικών. Αν υποθέσουμε ότι το τυφλό των φωσφορικών ιόντων είχε απορρόφηση *A*, τότε αυτή η απορρόφηση δηλώνει την παρουσία 0.01 μολ φωσφορικών ιόντων. Με αυτό τον τρόπο υπολογίσαμε την ποσότητα των φωσφορικών ιόντων σε μολ για κάθε δείγμα. Ας υποθέσουμε ότι μία μέτρηση έδωσε απορρόφηση *B*. Για να υπολογίσουμε μόνο τα μολ φωσφορικών ιόντων που υπήρχαν μέσα στο δείγμα έπρεπε να αφαιρέσουμε τις απορροφήσεις που προήλθαν από το ενζυμικό διάλυμα και την *G1P*. Έτσι, η απορρόφηση των φωσφορικών ιόντων ισούταν με:

$$(B - \text{Abs}_{\text{τυφλού ενζυμικού διαλύματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού G1P}}) = \text{Abs}_{\text{φωσφορικών του δείγματος}} = C$$

Εφόσον γνωρίζουμε ότι τα 0.01 μολ έδωσαν απορρόφηση *A*, τότε τα μολ των φωσφορικών ιόντων στο δείγμα ισούταν με:

$$\frac{c \times 0.01}{A} \text{ ή } \frac{B}{A \times 100} = \text{μολ φωσφορικών ιόντων στο άγνωστο δείγμα}$$

Έπειτα, υπολογίσαμε την ειδική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας μη γραμμική εξίσωση λαμβάνοντας υπόψη το ανώτατο όριο υδρόλυσης και ένα συντελεστή f .

$$f = 0.78 \times [G1P] \times \text{assay volume}$$

Όπου: **0.78** : το % (78%) ποσοστό της *G1P* που έχει καταναλωθεί για παραγωγή ορθοφωσφορικών ιόντων όταν η αντίδραση φτάσει σε ισορροπία.

[G1P] : η συγκέντρωση της *G1P* στην αντίδραση

Assay volume : Ο όγκος που λάβαμε για να σταματήσουμε την αντίδραση (40 μl) .

Και,

$$f = \frac{\text{limit}}{\text{assay volume} \times C}$$

Όπου : **C** : η συγκέντρωση του ενζύμου στον όγκο της αντίδρασης που ισούταν με $5 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$ για τη *rmGPb*.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten* (K_M , mM) και των φαινομενικών σταθερών *Michaelis-Menten* ($K_{M(\text{app})}$, mM) παρουσία αναστολέων, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση *Michaelis-Menten*:

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

Όπου : **v** : ταχύτητα

V_{\max} : μέγιστη ταχύτητα

[S] : συγκέντρωση υποστρώματος

K_M : σταθερά *Michaelis-Menten*.

Ακολούθως, έγινε η καμπύλη (*non linear fit*) $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού. Η K_M και οι $K_{M(\text{app})}$, υπολογίστηκαν από το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου *Lineweaver-Burk*. [28] Για τον υπολογισμό της K_i , αφού υπολογίστηκαν πρώτα οι $K_{M(\text{app})}$ παρουσία του αναστολέα, κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα που στον yy' άξονα τοποθετήθηκαν οι τιμές των $K_{M(\text{app})}$ και στον xx' οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν. Τέλος, χρησιμοποιώντας γραμμική εξίσωση (*linear fit*) υπολογίστηκε η K_i στο σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα xx' , το σημείο αυτό ισούται με το $-K_i$. Η γραμμική αυτή εξίσωση ήταν του τύπου:

$$y = ax + b$$

Όπου:

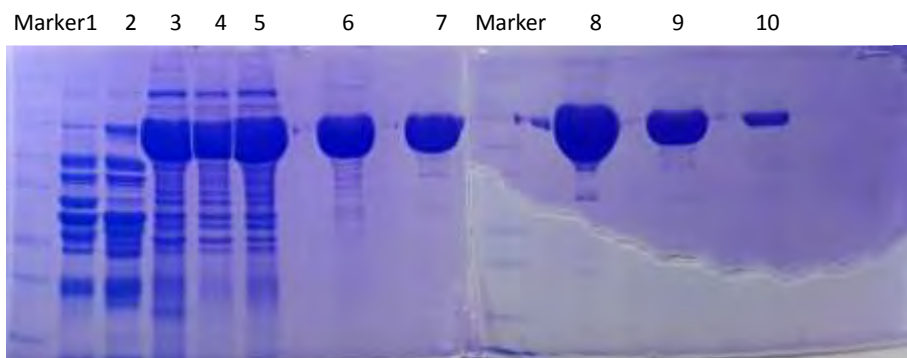
α : η κλίση της ευθείας (gradient ή slope)

b : η τεταγμένη επί της αρχής (intercept)

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων του ελέγχου συναγωνισμού του αναστολέα **GB-P2-4i** με το *AMP* και την *καφεΐνη* και η παραγωγή των απαραίτητων διαγραμμάτων μορφής *Dixon* και *Hill* έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα *GraFit*.
[38]

3. Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση και καθαρισμός της *rmGPb*



Εικόνα 14: 10% SDS-PAGE, από την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (97 kDa). Διαδρομές με την αναγραφή Marker: παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Έπειτα, διαδρομή 1: Μετά την παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος και αφού έχει διηθηθεί μέσω υαλοβάμβακα, διαδρομή 2: Μετά την καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο, διαδρομή 3: Μετά από διαύγαση, προσθήκη β-μερκαπταιθανόλης και EDTA και ρύθμιση pH, διαδρομή 4: Μετά από διαύγαση και φυγοκέντρηση, διαδρομή 5: Μετά την 1^η ανακρυστάλλωση, διαδρομή 6: Μετά την 2^η ανακρυστάλλωση, διαδρομή 7: Μετά την 3^η ανακρυστάλλωση (χωρίς προσθήκη AMP και $(CH_3COO)_2Mg$), διαδρομή 8: Μετά την 4^η ανακρυστάλλωση, διαδρομή 9: Μετά την 5^η ανακρυστάλλωση, διαδρομή 10: Το τελικό προϊόν, μετά από αραιώση.

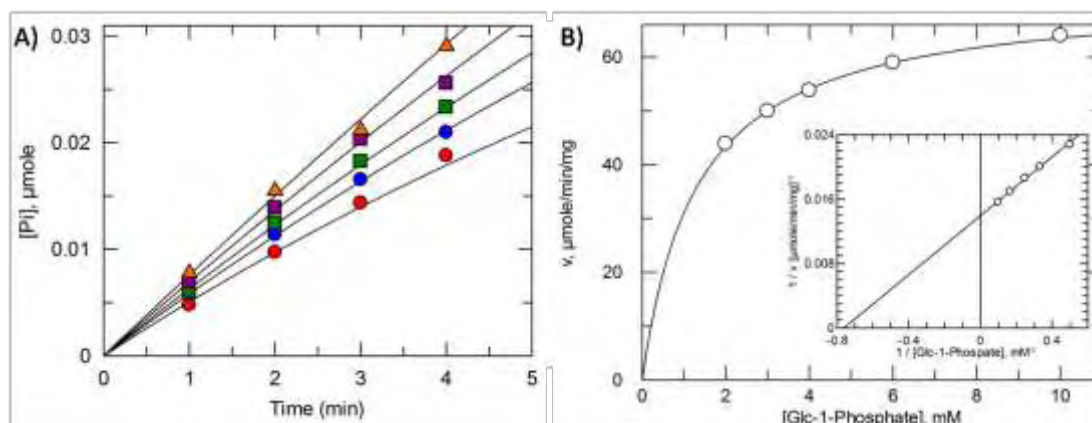
Παρατηρούμε πως η ποσότητα και η καθαρότητα της πρωτεΐνης αυξάνονται σημαντικά κατά τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων, κατά τα οποία κρυσταλλώνεται η *rmGPb*, ενώ πρωτεΐνες που δεν κρυσταλλώνονται, στις συγκεκριμένες συνθήκες, απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. Τέλος, στη διαδρομή 10, φαίνεται πως η καθαρότητα της φωσφορυλάσης είναι περισσότερη από 95 %. Η συνολική απόδοση της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού ήταν:

1,085 g ανά 2.340 kg σκελετικών μυών κονίκλων.

3.2 Κινητικές μελέτες

3.2.1 Προσδιορισμός της K_M της *rmGPb*

Όπως περιγράφεται στην παράγραφο 1.5, η σταθερά *Michaelis-Menten* (K_M) αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αλληλεπιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος. Έχει μονάδες συγκέντρωσης και είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, όταν η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της. Η μέγιστη ταχύτητα, V_{max} , αποκαλύπτει τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Από την πειραματική διαδικασία όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.7 προέκυψε το διάγραμμα 1A όπου παρουσιάζονται οι καμπύλες προϊόντος/χρόνου από τα οποία προέκυψαν οι ειδικές δραστηριότητες. Οι ειδικές αυτές δραστηριότητες χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της K_M και της V_{max} που παρουσιάζονται στο διάγραμμα 1B.



Διάγραμμα 1: Α) Οι καμπύλες προϊόντος/χρόνο από τις οποίες προκύπτουν οι ενζυμικές δραστηριότητες για τις διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε ήταν 2 mM (●), 3 mM (●), 4 mM (■), 6 mM (■) και 10 mM (▲) 1-φωσφορικής γλυκόζης. **Β)** Η γραφική παράσταση *Michaelis-Menten*, αποτελεί διάγραμμα της ταχύτητας (v) συναρτήσει της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων $[S]$. Το διάγραμμα αποτελεί μια ορθογώνια υπερβολή. Το ένθεμα αποτελεί το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (*Lineweaver-Burk*), $1/v$ ως προς $1/G1P$.

Οι ειδικές δραστηριότητες προσδιορίστηκαν στα:

[G1P], mM	Ειδική δραστηριότητα, μmole/min/mg
2	43.9288 ± 1.1256
3	49.9913 ± 0.2873
4	53.7857 ± 0.5983
6	58.9700 ± 0.6222
10	64.0322 ± 1.2058

Η σταθερά *Michaelis-Menten* και η μέγιστη ταχύτητα, V_{max} , για την *rmGPb* ως προς την 1-φωσφορική γλυκόζη υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος *GraFit*:

- K_M : 1.32 ± 0.04 mM
- V_{max} : 71.86 ± 0.67 μmole/min/mg

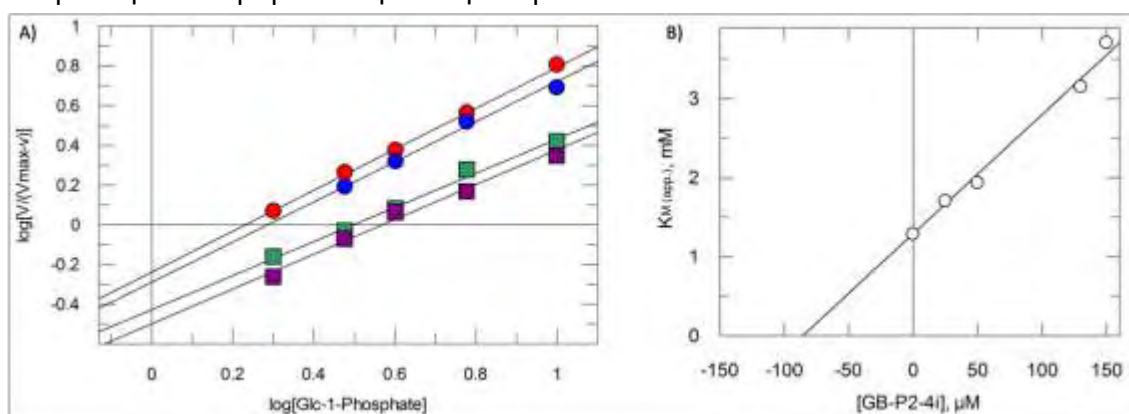
3.2.2 Προσδιορισμός της K_i του **GB-P2-4i**

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της σταθεράς αναστολής K_i περιγράφηκε στην παράγραφο 2.7. Αρχικά προσδιορίσαμε την IC_{50} του αναστολέα όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.6.6. Η τιμή της IC_{50} υπολογίστηκε σε 144.24 ± 5.21 μM. Το αποτέλεσμα αυτό μας βοήθησε ώστε να χρησιμοποιήσουμε ένα εύρος τιμών συγκεντρώσεων αναστολέα για τον προσδιορισμό της K_i . Για να υπολογίσουμε την σταθερά αναστολής και το είδος της συνέργειας (θετική/αρνητική) χρησιμοποιήσαμε το πρότυπο του *Hill* (Διάγραμμα 2A), όπως αναλύεται στην ενότητα 1.6.1.1. Αρχικά υπολογίσαμε τη φαινομενική σταθερά *Michaelis-Menten* για κάθε συγκέντρωση **GB-P2-4i** που μελετήθηκε: 25, 50, 130 και 150 μM. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε το διάγραμμα 2B από το οποίο προέκυψε η τιμή της K_i . Η K_i για τον αναστολέα **GB-P2-4i** έναντι της *rmGPb* υπολογίστηκε σε 85.46 ± 5.22 μM.

Πίνακας 9: Προσδιορισμός της K_i του **GB-P2-4i**. Παρουσιάζονται οι $K_{M(app.)}$ και οι τιμές του συντελεστή του Hill (n)

GB-P2-4i (μM)	$K_{M(app.)}$ (mM)	Συντελεστής Hill (n)
25	1.7029 ± 0.0034	1.0312
50	1.9316 ± 0.0110	1.0115
130	3.1471 ± 0.0173	0.8590
150	3.7061 ± 0.0401	0.8764

Στις συγκεντρώσεις του **GB-P2-4i** 25 μM και 50 μM, ο συντελεστής του Hill ισούται με 1 ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (130 μM και 150 μM), ο συντελεστής του Hill ισούται με 0.9 υποδηλώνοντας πιθανώς την ύπαρξη αρνητικής συνέργειας, δηλαδή η δέσμευση του πρώτου μορίου στην μία υπομονάδα δυσκολεύει τη δέσμευση άλλων μορίων στην άλλη υπομονάδα.



Διάγραμμα 2: Κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της αναστολής που προκαλεί ο **GB-P2-4i** στην rmGPb. A) Η γραφική παράσταση Hill του $\log[v/(V_{max}-v)]$ ως προς τον $\log[\text{glucose 1-phosphate}]$ σε 1mM AMP, 0.2% γλυκογόνο και διάφορες συγκεντρώσεις του **GB-P2-4i**: 25 μM (●), 50 μM (●) 130 μM (■) και 150 μM (■). Οι συγκεντρώσεις της 1-φωσφορικής γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2 mM, 3 mM, 4 mM, 6 mM, και 10 mM. B) παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της σταθεράς αναστολής K_i του **GB-P2-4i**. Το διάγραμμα αποτελείται από τις $K_{M(app.)}$ ως προς τις συγκεντρώσεις του **GB-P2-4i**. Η K_i του **GB-P2-4i** υπολογίστηκε 85.46 ± 5.22 μM.

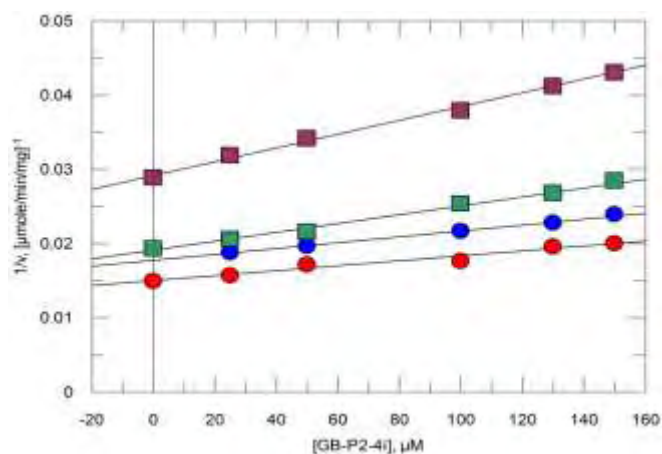
3.2.3 Έλεγχος συναγωνισμού

Τα δεδομένα των κινητικών μελετών για τον έλεγχο του συναγωνισμού του **GB-P2-4i** σε σχέση αφενός με την **καφεΐνη** και αφετέρου με την **AMP** αναλύθηκαν μέσω των διαγραμμάτων *Dixon* από τα οποία μπορεί να εκτιμηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ περισσότερων από έναν αναστολέων.

3.2.3.1 Έλεγχος συναγωνισμού **GB-P2-4i**/caffeine

Η πειραματική διαδικασία έχει αναλυθεί στην ενότητα 2.6.8.1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις **καφεΐνης** και **GB-P2-4i** και σε σταθερές συγκεντρώσεις **AMP** (1mM) και υποστρώματος (**G1P** 10mM). Το διάγραμμα *Dixon* (διάγραμμα 3) έδωσε ένα

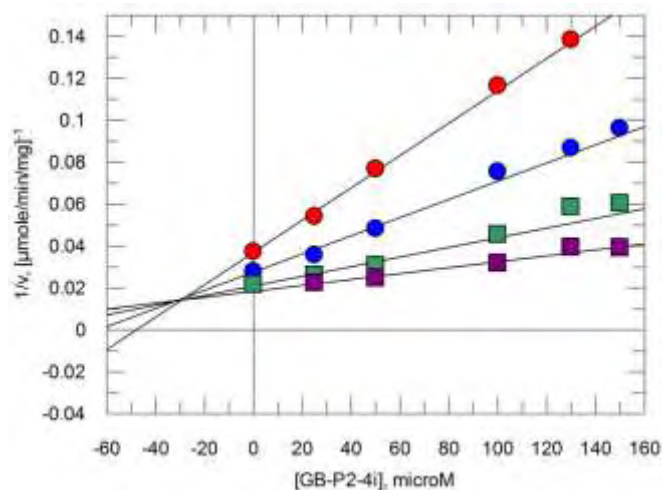
μοτίβο παράλληλων γραμμών, το οποίο υποδεικνύει ότι ο **GB-P2-4i** και η **καφεΐνη** συναγωνίζονται για το ίδιο κέντρο πρόσδεσης. [31]



Διάγραμμα 3: Η συναγωνιστική αναστολή μεταξύ του *GB-P2-4i* και της καφεΐνης. Οι συγκεντρώσεις του *GB-P2-4i* ήταν 0, 25, 50, 130, και 150 μM και της καφεΐνης 100 μM (●), 200 μM (●), 400 μM (■) και 800 μM (■).

3.2.3.2 Έλεγχος συναγωνισμού *GB-P2-4i*/ AMP

Η πειραματική διαδικασία έχει αναλυθεί στην ενότητα 2.6.8.1 σε διαφορετικές μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις *AMP* και **GB-P2-4i** και σταθερές συγκεντρώσεις υποστρώματος (*G1P* 2.5mM) το διάγραμμα *Dixon* έδωσε διασταυρωμένες γραμμές (διάγραμμα 4) οι οποίες τέμνονται αριστερά του γ , που υποδεικνύει ότι ο **GB-P2-4i** και η *AMP* δεν προσδέονται στο ίδιο κέντρο. [32]



Διάγραμμα 4: Η έλλειψη συναγωνισμού μεταξύ του *GB-P2-4i* και της *AMP*. Οι συγκεντρώσεις του *GB-P2-4i* ήταν 0, 25, 50, 130, και 150 μM και της *AMP* 50 μM (●), 100 μM (●), 200 μM (■) και 400 μM (■).

4. Συζήτηση

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*) αποτελεί έναν έγκυρο φαρμακευτικό στόχο για τη διαχείριση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Η *GP* καταλύει την φωσφορόλυση του γλυκογόνου προς παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης (*G1P*) η οποία στο ήπαρ μετατρέπεται εν τέλει σε ελεύθερη γλυκόζη για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του οργανισμού, σε συνθήκες που δεν παρέχεται γλυκόζη από την διατροφή. Η *GP* είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο με 6 γνωστές θέσεις πρόσδεσης μικρών μορίων. Στο επίκεντρο των μελετών βρίσκεται κυρίως το καταλυτικό κέντρο για το οποίο έχει συντεθεί και μελετηθεί μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων, ανάλογων γλυκόζης και μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού ενώσεων, έχει επιτευχθεί η σύνθεση ενώσεων που μπορούν να αναστέλλουν το ένζυμο με σταθερές αναστολής (K_i) της τάξης των nM . Ωστόσο, η έρευνα γύρω από τα υπόλοιπα κέντρα της *GP* είναι περιορισμένη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το κέντρο αναστολής, στο οποίο προσδένονται ενώσεις που μοιάζουν δομικά με την καφεΐνη, πολυφαινόλες κ.α. Επιπλέον, ενώσεις που προσδένονται σε αυτό το κέντρο φαίνεται να δρουν συνεργιστικά με την γλυκόζη, γεγονός που δηλώνει ότι η ανασταλτική δράση τους θα μπορούσε να ρυθμιστεί από τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και να μειωθεί όταν αυτά πλησιάζουν στο φυσιολογικό, μειώνοντας τον κίνδυνο υπογλυκαιμίας. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την επίδραση μια ετεροκυκλικής ένωσης (**GB-P2-4i**) για την οποία μελέτες μοριακού ελλιμενισμού, είχαν δείξει ότι μπορεί να αναστέλλει την *GP* και να προσδέεται πιθανώς στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Οι ετεροκυκλικές ενώσεις παρουσιάζουν πλεονέκτημα, έναντι των αναλόγων γλυκόζης, διότι λόγω υδροφοβικότητας μπορούν να διαπερνούν πιο εύκολα την μεμβράνη των κυττάρων. Με στόχο την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας του **GB-P2-4i** έναντι της *GP* έγινε αρχικά απομόνωση της καθαρής φωσφορυλάσης από σκελετικούς μύες κονίκλων (*rmGPb*, εικόνα 14) και προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου. Η K_M υπολογίστηκε στα 1.32 ± 0.05 mM η V_{max} στα 71.86 ± 0.67 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ (διάγραμμα 1). Έπειτα, για τον προσδιορισμό της K_i του **GB-P2-4i**, εφαρμόσαμε το πρότυπο του *Hill* (διάγραμμα 2A) για τα αλλοστερικά ένζυμα και η K_i προσδιορίστηκε στα 85.46 ± 5.22 μM (διάγραμμα 2B). Με σκοπό να προσδιορίσουμε το πιθανό κέντρο πρόσδεσης του **GB-P2-4i** στην *GP*, κάναμε κινητικές μελέτες χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα γνωστούς προσδέτες της *GP* και τον **GB-P2-4i**. Η καφεΐνη προσδέεται στο κέντρο αναστολής της *GP* ενώ η AMP στο αλλοστερικό κέντρο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καφεΐνη και ο **GB-P2-4i** συναγωνίζονται για την σύνδεση στο κέντρο αναστολής, εφόσον το διάγραμμα *Dixon* έδωσε παράλληλες ευθείες (διάγραμμα 3), ενώ η AMP και ο **GB-P2-4i** δεν συναγωνίζονται για την πρόσδεση το αλλοστερικό κέντρο, εφόσον το διάγραμμα *Dixon* έδωσε ευθείες που τέμνονταν αριστερά του άξονα γγ' (διάγραμμα 4). Τα τελευταία αυτά αποτελέσματα προτείνουν ότι ο **GB-P2-4i** πιθανώς προσδέεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Μελλοντικά, θα γίνουν κινητικές μελέτες έναντι της

hIGPa με σκοπό τον προσδιορισμό της K_i ώστε να ερευνησουμε αν θα υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ των δύο ισομορφών. Επιπλέον, μελέτες πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ του συμπλόκου *rmGPb-GB-P2-4i* θα αναδείξει το κέντρο πρόσδεσης του **GB-P2-4i** καθώς και τις αλληλεπιδράσεις αυτές με τα κατάλοιπα της *GP* που επιφέρουν αυτή την αναστολή. Τα αποτελέσματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν, ώστε μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού ενώσεων να σχεδιαστούν νέες ενώσεις που θα προσδέονται πιο ισχυρά στη *GP*, όπως έχει γίνει με επιτυχία για το καταλυτικό κέντρο.

5. Βιβλιογραφία

- [1] Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders;2006
- [2] Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. *Nature* 2001;414:788–791
- [3] Harcourt BE, Penfold SA, Forbes JM. Coming full circle in diabetes mellitus: from complications to initiation. *Nature Reviews Endocrinology* 2013;9:113-123
- [4] Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, Malanda B. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Research Clinical Practice* 2018;138:271-281
- [5] Hayes JM, Kantsadi AL, Leonidas DD. Natural Products and their Derivatives as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: Potential Treatment For Type 2 Diabetes. *Phytochemistry Reviews* 2014;13(2):471
- [6] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman;2012.
- [7] Adeva-Andany MM, González-Lucán M, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C, Ameneiros-Rodríguez E. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin.* 2016;5:85–100
- [8] DeFronzo R, Ferrannini E, Alberti G. International Textbook of Diabetes Mellitus. 4th Ed. Great Britain: Royal Society of Medicine;2015
- [9] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J* 2012;441:763-8
- [10] Venien-Bryan C, Jonic S, Skamnaki V, Brown N, Bischler N, Oikonomakos NG, et al. The structure of phosphorylase kinase holoenzyme at 9.9 angstroms resolution and location of the catalytic subunit and the substrate glycogen phosphorylase. *Structure* 2009;17:117-27
- [11] Docsa T, Marics B, Németh J, Hüse C, Somsák L, Gergely P, Peitl B. Insulin sensitivity is modified by a glycogen phosphorylase inhibitor: glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Curr Top Med Chem.* 2015;15:2390-4
- [12] Voet D and Voet JG. Biochemistry, Wiley, 2011
- [13] Agius L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Molecular Aspects of Medicine* 2015;46:34-45

- [14] Johnson LN. The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions* 2009;37:627-41
- [15] Livanova NB, Chebotareva NA, Eronina TB, Kurganov BI. Pyridoxal 5'-phosphate as a catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase B. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67:1089-98
- [16] Helmreich EJ. How pyridoxal 5'-phosphate could function in glycogen phosphorylase catalysis. *Biofactors* 1992;3:159-72.
- [17] Agius L. New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;21:587-605
- [18] Bokor É, Kyriakis E, Solovou TGA, Koppány C, Kantsadi AL, Szabó KE, Szakács A, Stravodimos GA, Docsa T, Skamnaki VT, Zographos SE, Gergely P, Leonidas DD, Somsák L. Nanomolar Inhibitors of Glycogen Phosphorylase Based on beta-d-Glucosaminyll Heterocycles: A Combined Synthetic, Enzyme Kinetic, and Protein Crystallography Study. *J Med Chem* 2017;60:9251-9262
- [19] Kyriakis E, Solovou TGA, Kun S, Czifrák K, Szócs B, Juhász L, Bokor É, Stravodimos GA, Kantsadi AL, Chatzileontiadou DSM, Skamnaki VT, Somsák L, Leonidas DD. Probing the beta-pocket of the active site of human liver glycogen phosphorylase with 3-(C-beta-d-glucopyranosyl)-5-(4-substituted-phenyl)-1, 2, 4-triazole inhibitors. *Bioorg Chem* 2018;77:485-493.
- [20] Nagy L, Docsa T, Szántó M, Brunyánszki A, Hegedűs C, Márton J, et al. Glycogen Phosphorylase Inhibitor N-(3,5-Dimethyl-Benzoyl)-N'-(β-D-Glucopyranosyl)Urea Improves Glucose Tolerance under Normoglycemic and Diabetic Conditions and Rearranges Hepatic Metabolism. *PLoS ONE* 2013;8:e69420
- [21] Tsitsanou KE, Hayes JM, Keramioti M, Mamais M, Oikonomakos NG, Kato A, Leonidas DD, Zographos SE. Sourcing the affinity of flavonoids for the glycogen phosphorylase inhibitor site via crystallography, kinetics and QM/MM-PBSA binding studies: comparison of chrysin and flavopiridol. *Food Chem Toxicol* 2013;61:14-27
- [22] Kantsadi AL, Apostolou A, Theofanous S, Stravodimos GA, Kyriakis E, Gorgogietas VA, Chatzileontiadou D, Pegiou K, Skamnaki VT, Stagos D, Kouretas D, Psarra AG, Haroutounian SA, Leonidas DD. Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food Chem Toxicol* 2014;67:35-43
- [23] Oikonomakos NG, Schnier JB, Zographos SE, Skamnaki VT, Tsitsanou KE, Johnson LN. Flavopiridol Inhibits Glycogen Phosphorylase by Binding at the Inhibitor Site. *J Biol Chem.* 2000;275:34566-73.

- [24] Kyriakis E, Stravodimos GA, Kantsadi AL, Chatzileontiadiou DS, Skamnaki VT, Leonidas DD. Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b. *FEBS Lett* 2015;589:1787-94.
- [25] Stravodimos GA, Chetter BA, Kyriakis E, Kantsadi AL, Chatzileontiadiou DS, Skamnaki VT, Kato A, Hayes JM, Leonidas DD. Phytogetic Polyphenols as Glycogen Phosphorylase Inhibitors: The Potential of Triterpenes and Flavonoids for Glycaemic Control in Type 2 Diabetes. *Current Medicinal Chemistry* 2016;23:1-20
- [26] Κλώνης Ι. Ενζυμολογία: Έμβρυο; 2007
- [27] Γεωργάτσος ΙΓ, Γιουψάνης ΤΑ, Κυριακίδης ΔΑ. Ενζυμολογία: Ζήτη; 2001
- [28] Lineweaver H, Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 1934;56:658–666
- [29] Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 1953;55:170-1.
- [30] Michaelis L, Menten ML, Johnson KA, Goody RS. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* 2011;50:8264–8269.
- [31] A generalized model for enzymatic substrate inhibition. *The Science Snail*; 2016
- [32] Segel IH. Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley Interscience, New York 1993
- [33] Oikonomakos NG. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr Protein Pept Sci.* 2002;3:561-86
- [34] Davey J, Lord M. Essential cell biology: a practical approach. Oxford; New York: Oxford University Press; 2003.
- [35] Fischer EH, Krebs, E. G. Muscle Phosphorylase-B. *Methods in Enzymology* 1962;5:369-73.
- [36] Tsirkone VG, Tsoukala E, Lamprakis C, Manta S, Hayes JM, Skamnaki VT, et al. 1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. *Bioorg Med Chem* 2010;18:3413-25.
- [37] Saheki S, Takeda A, Shimazu T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal Biochem* 1985;148:277-81
- [38] Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998