



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΣΑΡΩΣΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΕΝΑΝΤΙ  
ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ  
ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ**



**ΛΕΚΑ ΓΙΟΥΓΚΕΝΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2018**

**ΣΑΡΩΣΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΕΝΑΝΤΙ  
ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ  
ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ**

**SCREENING LIBRARY OF HERO-CYCLIC COMPOUNDS AGAINST  
GLYCOGEN PHOSPHORYLASE FOR THE DEVELOPMENT OF  
NEW INHIBITORS**

**ΣΑΡΩΣΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΕΝΑΝΤΙ  
ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ  
ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ**

**ΟΝΟΜΑ: ΛΕΚΑ ΓΙΟΥΓΚΕΝΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

**ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ**: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

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

## Περιεχόμενα

I. Περίληψη .....	7
II. Abstract .....	7
III. ΣΚΟΠΟΣ .....	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	10
1.1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου I .....	11
1.1.2 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II .....	12
1.2 Ομοιόσταση της γλυκόζης .....	12
1.2.1 Ινσουλίνη - Ρόλος και Μεταβολικές επιδράσεις .....	12
1.2.2 Γλυκαγόνη .....	14
1.2.3 Γλυκογόνο – Μεταβολισμός του Γλυκογόνου .....	15
1.2.3.1 Σύνθεση-Αποικοδόμηση του γλυκογόνου .....	16
1.3 Φωσφατάση 6- φωσφορικής γλυκόζης .....	19
1.4 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .....	20
1.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) .....	21
1.5.1 Ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου .....	22
1.5.2 Μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου .....	22
1.5.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου στον εγκέφαλο .....	23
1.5.4 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης .....	24
1.5.5 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου-Δομή .....	25
1.5.5. 1 Καταλυτικό κέντρο .....	26
1.5.5.2 Το κέντρο αναστολής .....	27
1.5.5.3 Αλλοστερικό κέντρο .....	27
1.5.5.4 Νέο αλλοστερικό κέντρο .....	27
1.5.5.5 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου .....	27
1.5.5.6 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης .....	28
1.5.6 Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου ως Στόχος Υπογλυκαιμικών Φαρμάκων .....	28
1.6 Κουμαρίνες .....	29
1.6.1 Οι κουμαρίνες ως πιθανοί αντιδιαβητικοί παράγοντες .....	29
1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων .....	30
1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα και κινητικές μελέτες .....	32
1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων .....	33

1.6.3 Υπολογισμός IC50 .....	34
2.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών-Πηκτώματα .....	36
2.3.1 Χρώση πηκτώματος .....	39
2.4 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών-Μέθοδος Bradford .....	40
2.5 Καθαρισμός γλυκογόνου από νουκλεοτίδια .....	40
2.6 Απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου gmGPb .....	41
2.7 Κινητικές μελέτες έναντι της Φωσφορυλάσης του γλυκογόνου GP .....	46
2.7.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φωσφορικών ιόντων .....	47
2.7.2 Ενζυμικό διάλυμα .....	47
2.7.3 Προσδιορισμός της $K_M$ .....	48
2.7.4 Σάρωση των αναστολέων .....	49
2.7.6 Προσδιορισμός IC50 των ενώσεων .....	50
2.7.7 Ανάλυση κινητικών δεδομένων .....	50
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	51
3.1 Καθαρισμός και απομόνωση της gmGPb .....	51
3.2 Κινητικές μελέτες .....	52
3.2.1 Προσδιορισμός της $K_M$ .....	52
3.2.3 Υπολογισμός της IC50 του GB-P3-7b'a .....	59
4. Συζήτηση .....	60
Βιβλιογραφία .....	62

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Ιούνιο του 2017 έως Φεβρουάριο του 2018, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Βιοχημείας του ΤΒΒ, Δρ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του. Η καθοδήγηση, η ενθάρρυνση και η βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας ήταν καθοριστικές. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη θερμά τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, Δρ. Μπαλατσό Νικόλαο, Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική, για τη συνεργασία και για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Δε θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια και τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους υποψήφιους διδάκτορες Ευθύμιο Κυριάκη και Γεώργιο Στραβοδήμο για την απεριόριστη στήριξη και βοήθεια που παρείχαν, αλλά και για την υπομονή και τη διάθεση τους, καθώς ήταν πάντοτε πρόθυμοι να με καθοδηγήσουν. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την υποστήριξη τους, τη βοήθεια, την ηθική στήριξη και την πολύτιμη συμβολή τους όλα αυτά τα χρόνια.

## I. Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών που το κύριο χαρακτηριστικό της είναι η χρόνια υπεργλυκαιμία, αυτό που ο κόσμος αποκαλεί «έχω ζάχαρο». Ο τρόπος που ζούμε, η κακή διατροφή, η σωματική αδράνεια είναι τα αίτια για το σακχαρώδη διαβήτη, αποτελώντας τη σημαντικότερη μεταβολική διαταραχή του αιώνα μας. Εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα της γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δε διατηρούνται σταθερά. Ένζυμα που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για την εύρεση ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τα ένζυμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπογλυκαιμικά φάρμακα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase, GPEC 2.4.1.1) καταλύει το πρώτο βήμα καταβολισμού του γλυκογόνου για παράγωγη 1-φωσφορικής γλυκόζης και αποτελεί μοριακό στόχο για την εύρεση νέων αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων. Υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπομενες μορφές: τη φωσφορυλιωμένη GP<sub>a</sub> (βρίσκεται στην R στεροδιαμόρφωση και εμφανίζει υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα) και την απόφωσφορυλιωμένη GP<sub>b</sub> (βρίσκεται στην T στεροδιαμόρφωση και έχει χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα). Οι φυσικές ενώσεις αποτελούν εδώ και χρόνια εναρκτήρια μόρια τα οποία μπορούν να τροποποιηθούν έτσι ώστε μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού ενώσεων να βρεθούν νέα μόρια που θα αναστέλλουν την GP.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε της GP από σκελετικούς μύες κόνικλων (rmGP). Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ικανότητα 80 ενώσεων (ανάλογα κουμαρίνης) να αναστέλλουν την GP με κινητικές μεθόδους. Η σύνθεση των ενώσεων αυτών έγινε από το καθηγητή *Goutam Brahmachari* από το πανεπιστήμιο του *Bharati* της Ινδίας. Οι πιο βιοδραστικές από αυτές (**GB-P3-4bc**, **GB-P3-7b'a**, **GB-P3-7ea**) μελετήθηκαν περαιτέρω προσδιορίζοντας τις IC<sub>50</sub> έναντι της rmGP<sub>b</sub>

## II. Abstract

*Diabetes mellitus is a multifactorial disease of the metabolism of carbohydrates, fats and proteins whose main feature is chronic hyperglycemia, what Greeks call "I have sugar." The way we live, poor diet, physical inactivity are some of the causes for diabetes, which constitutes the most important metabolic disorder of our century. It occurs when the levels of glucose (sugar) in the blood are not maintained at a constant level. Enzymes involved in regulating blood glucose levels are used as molecular targets to find compounds with high affinity with the potential to be antihyperglycaemic drugs. Glycogen phosphorylase (GP EC 2.4.1.1) catalyses the first step of glycogen metabolism to produce glucose 1-phosphate and is a molecular target for new anti-hyperglycemic drugs. It exists in two mutually interchangeable forms: phosphorylated GP<sub>a</sub> (found in R conformation with high affinity for substrate) and dephosphorylated GP<sub>b</sub> (found in T conformation with low affinity for substrate). Natural compounds have been used in the last years as the starting molecules to develop through the structure-driven design method, new GP inhibitors.*

*In the present study, we purified GP from rabbit skeletal muscle (rmGP) and we screened a library of 80 compounds (coumarin analogs) to discover new GP inhibitors by kinetic methods. The compounds were synthesized by Professor Goutam Brahmachari from the University of Bharati, India. The most potent compounds (GB-P3-4bc, GB-P3-7b'a, GB-P3-7ea) were further studied by kinetic analysis.*



### **III. ΣΚΟΠΟΣ**

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί έναν έγκυρο φαρμακευτικό στόχο για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η αξιολόγηση μιας βιβλιοθήκης 80 ετεροκυκλικών ενώσεων (ανάλογα κουμαρίνης) ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Αρχικά, έγινε απομόνωση και καθαρισμός της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων και προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου που απομονώθηκε. Στη συνέχεια, έγινε σάρωση της βιβλιοθήκης σε μια συγκέντρωση για όλους τους εν δυνάμει αναστολείς και προσδιορίστηκε η επίτις εκατό αναστολή ως προς ένα δείγμα ελέγχου. Οι ενώσεις που εμφάνισαν αναστολή πάνω από 15 % αξιολογήθηκαν περαιτέρω μέσω προσδιορισμού της IC50. Τα αποτελέσματα αυτά θα συνδράμουν στην σύνθεση νέων βιοδραστικών ενώσεων μέσω της μεθοδολογίας του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού αναστολέων.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), μία χρόνια μεταβολική διαταραχή, είναι ένα ταχέως αναπτυσσόμενο παγκόσμιο πρόβλημα με τεράστιες κοινωνικές, υγειονομικές και οικονομικές συνέπειες [1]. Ο αριθμός των ασθενών που νοσούσε από ΣΔ ανήλθε σε 382 εκατομμύρια το 2013 σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για τον Διαβήτη (*International Diabetes Federation, IDF*) [4]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι σχεδόν το 50% των διαβητικών δεν διαγιγνώσκονται μέχρι 10 χρόνια μετά την εμφάνιση της νόσου [1].



**Εικόνα 1.1** Προτεινόμενες αυξήσεις του επιπολασμού του διαβήτη σε διάφορες περιοχές του κόσμου. Πηγή: Διεθνής Ομοσπονδία Διαβήτη.

Ο ΣΔ χαρακτηρίζεται ως μια κατάσταση υπεργλυκαιμίας η οποία προκύπτει από ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης, ανοχή στη δράση της ινσουλίνης ή και τα δύο. Η χρόνια υπεργλυκαιμία του ΣΔ συνδέεται με την μακροχρόνια δυσλειτουργία και καταστροφή πολλών οργάνων και ιστών συμπεριλαμβανομένων του αμφιβληστροειδούς στα μάτια, των νεφρών, της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων [3].

Αρκετές παθογόνες διαδικασίες εμπλέκονται στην ανάπτυξη του διαβήτη. Σε αυτές συγκαταλέγονται η αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια ινσουλίνης, καθώς και ανωμαλίες που καταλήγουν στην ανοχή στην δράση της ινσουλίνης. Η βάση των ανωμαλιών στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών σε διαβητικά άτομα είναι η ανεπαρκής δράση της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους. Η προβληματική έκκριση ινσουλίνης αλλά και η ανοχή στη δράση της συχνά συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή και είναι ασαφές ποια ανωμαλία είναι η αιτία της υπεργλυκαιμίας.

Η πολυουρία, η πολυδιψία, η απώλεια βάρους, η πολυφαγία και η θολή όραση αποτελούν τα συνήθη συμπτώματα του σακχαρώδους διαβήτη. Οι μακροχρόνιες διαταραχές του διαβήτη περιλαμβάνουν υπέρταση, ανωμαλίες στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών, εμφάνιση της περιοδοντικής νόσου, αμφιβληστροειδοπάθεια με πιθανή απώλεια της όρασης, νεφροπάθεια που οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια, περιφερική νεφροπάθεια με κίνδυνο πρόκλησης έλκους του ποδιού καθώς και ακρωτηριασμούς, νευροπάθειες που μπορούν να οδηγήσουν σε

γαστρεντερικά, καρδιαγγειακά προβλήματα αλλά και σε σεξουαλική δυσλειτουργία. Επιπλέον, η υπεργλυκαιμία με κετοξέωση ή το μη κετοξικό υπεροσμωτικό σύνδρομο έχουν υψηλή συχνότητα εμφάνισης σε διαβητικούς ασθενείς [2]. Ο ΣΔ διακρίνεται σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και το σακχαρώδη διαβήτη της κύησης. Οι δύο πρώτοι είναι οι πιο συνηθισμένοι σε ασθενείς. Εκτός από αυτές τις κατηγορίες διαβήτη υπάρχουν και κάποιες ειδικές κατηγορίες οι οποίες οφείλονται σε γενετικές ανωμαλίες των β-παγκρεατικών κυττάρων, σε γενετικές ανωμαλίες στη δράση της ινσουλίνης, ασθένειες του εξωκρινικού παγκρέατος, μολύνσεις, ενδοκρινοπάθειες, διαβήτη επαγόμενος από φάρμακα ή χημικά κ.α [2][5].

### **1.1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου I**

Στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (ΣΔ1) ή αλλιώς ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη παρατηρείται αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος που οδηγεί σε απόλυτη ανεπάρκεια της έκκρισης ινσουλίνης με αποτέλεσμα την πλήρη εξάρτηση των ασθενών στην ινσουλίνη. Στον ΣΔ1 τα β-παγκρεατικά κύτταρα καταστρέφονται άλλοτε με ταχύ ρυθμό (κυρίως στα παιδιά) έχοντας ως αποτέλεσμα την οξεία καταστροφή των κυττάρων και άλλοτε με πολύ αργό (κυρίως σε ενήλικες). Οι περισσότεροι ασθενείς καταλήγουν στην χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης για να επιβιώσουν εξαιτίας της ύπαρξης αυτό-αντισωμάτων που δρουν έναντι των β-κυττάρων καθώς και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σύνθεση της ινσουλίνης στο αίμα τους [2]. Ορισμένοι ασθενείς, ιδιαίτερα τα παιδιά και οι έφηβοι, εμφανίζουν κετοξέωση στο πρώτο στάδιο εκδήλωσης της νόσου, ενώ άλλοι έχουν υπεργλυκαιμία που μπορεί γρήγορα να μετατραπεί σε σοβαρή υπεργλυκαιμία και κετοξέωση. Στη διαβητική κετοξέωση παρατηρείται ενεργοποίηση της ορμονο-ευαίσθητης λιπάσης λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης ινσουλίνης σε συνδυασμό με την αύξηση των επιπέδων των κατεχολαμινών, της κορτιζόλης και της αυξητικής ορμόνης. Η ορμονο-ευαίσθητη λιπάση προκαλεί διάσπαση του λιπώδους ιστού που παράγει ελεύθερα λιπαρά οξέα. Αυτά τα συστατικά μετατρέπονται σε ακετυλο-συνένζυμο Α μέρος του οποίου εισέρχεται στον κύκλο του Krebs για παραγωγή ενέργειας. Το υπόλοιπο διασπάται σε κετόνες (ακετόνη, ακετοξικό, υδροξυβουτηρικό οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ενέργεια. Παράλληλα, επειδή το σώμα δε δύναται της χρήσης της γλυκόζης, το γλυκογόνο και οι πρωτεΐνες καταβολίζονται για να σχηματίσουν γλυκόζη. Αυτοί οι παράγοντες προάγουν την υπεργλυκαιμία, η οποία προκαλεί ωσμωτική διούρηση η οποία οδηγεί σε αφυδάτωση, μεταβολική οξέωση και υπεροσμωτική κατάσταση [6]. Ο αυτοάνοσος διαβήτης εμφανίζεται συνήθως κατά την παιδική ηλικία και την εφηβεία αλλά μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε ηλικία, ακόμα και στην όγδοη και ένατη δεκαετία της ζωής. Η αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων έχει γενετική προδιάθεση και σχετίζεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι ακόμα δεν έχουν διευκρινιστεί. Τέλος, υπάρχει μια μικρή κατηγορία ασθενών (Αφρική & Ασία) αγνώστων αιτιών που δεν εμφανίζουν αυτοάνοσα χαρακτηριστικά αλλά είναι επιρρεπείς σε κετοξέωση και εμφανίζουν μόνιμα ινσουλινοπενία. Αυτή η μορφή διαβήτη τύπου I είναι έντονα κληρονομούμενη [2].

### **1.1.2 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II**

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II (ΣΔ2) ή αλλιώς μη ινσουλινοεξαρτώμενος, οφείλεται στην ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης. Η μειωμένη ευαισθησία προς την ινσουλίνη αναφέρεται συχνά ως ανοχή στην ινσουλίνη ( μεταβολικό σύνδρομο). Στο ΣΔ2 λόγω της αντίστασης στην ινσουλίνη και της υπερπαραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ παρατηρείται μειωμένη διαθεσιμότητα της γλυκόζης στους περιφερικούς ιστούς, ελαττωματική λειτουργία των παγκρεατικών β – κυττάρων καθώς και μειωμένη β-κυτταρική μάζα. Παράλληλα, η παχυσαρκία, η μειωμένη σωματική άσκηση και η κατανάλωση τροφίμων με υψηλό γλυκαιμικό δείκτη αποτελούν μείζονα προδιάθεση για την ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 2 [7]. Στο μεταβολικό σύνδρομο, η παχυσαρκία και η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτελούντον πυρήνα των περισσότερων περιπτώσεων μεταβολικού συνδρόμου, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να κατανοηθεί η παθοφυσιολογία πίσω από το σύνδρομο και τις αλληλεπιδράσεις γονιδίου-περιβάλλοντος που αυξάνουν την ευαισθησία [8]. Η βάση για την βελτίωση της νόσου αποτελεί η αλλαγή του τρόπου ζωής με άσκηση και διατροφή για να προκληθεί απώλεια βάρους καθώς και ηφαρμακολογική παρέμβαση για τη θεραπεία της υπέρτασης και της υπεργλυκαιμίας. Παρά την απλότητα της θεραπείας, η μακροχρόνια επιτυχία μεταξύ των ασθενών παρατηρείται σπάνια, διότι είναι πολύ δύσκολο να τηρηθούν αυστηροί κανόνες.Σήμερα, θεωρείται ότι τα συμπληρώματα διατροφής που περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικά, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τα ανόργανα στοιχεία βοηθούν στη θεραπεία του μεταβολικού συνδρόμου λόγω τωναντιοξειδωτικών και των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους [9].

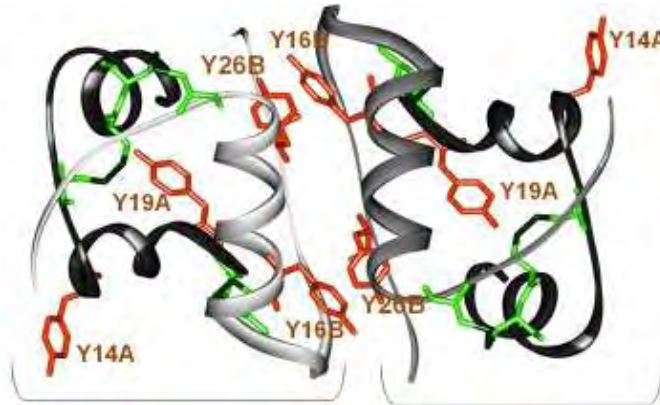
## **1.2 Ομοίωση της γλυκόζης**

### **1.2.1 Ινσουλίνη - Ρόλος και Μεταβολικές επιδράσεις**

Η ινσουλίνη είναι μια μικρή και σημαντική πεπτιδική ορμόνη που εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η διαφοροποίηση των κυττάρων, η μεμβρανική μεταφορά των θρεπτικών ουσιών και ο μεταβολισμός [32]. Η ινσουλίνη αλληλεπιδρά τον υποδοχέα της στα μυϊκά κύτταρα, στο ήπαρ και στον λιπώδη ιστό. Το μόριο της ανθρώπινης ινσουλίνης αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μία αλυσίδα Α και μία αλυσίδα Β, που περιέχουν 21 και 30 κατάλοιπα αμινοξέων, αντίστοιχα. Σε όλα σχεδόν τα είδη, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, η ινσουλίνη έχει 51 αμινοξέα, μοριακό βάρος ~ 6000 Da και συντίθεται στα β-κύτταρα του παγκρέατος των νησιδίων του Langerhans. Η ινσουλίνη συντίθεται πρώτα ως ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο την προΐνσουλίνη, η οποία μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου σχηματίζονται ανώριμα κοκκία β παγκρεατικών κυττάρων, στα οποία και αποθηκεύεται. Έπειτα, υφίσταται ωρίμανση σε ενεργό ινσουλίνη μέσω πρωτεολυτικής διάσπασης από τις ενδοπεπτιδάσες, οι οποίες προκαλούν απομάκρυνση του πεπτιδίου C, αφήνοντας 2 πεπτιδικές αλυσίδες, Α και Β, συνδεδεμένες με 2 δισουλφιδικούς δεσμούς, με

αποτέλεσμα το σχηματισμό της ώριμης ινσουλίνης[10]. Αν και η ινσουλίνη δεσμεύεται στον υποδοχέα της ως μονομερές, παίρνει διάφορες μορφές τόσο φυσιολογικά όσο και σε διαλύματα. Δημιουργεί διμερή, διπλά διμερή (ή τετραμερή), τριπλά διμερή (ή εξαμερή) καθώς και συσσωματώματα ανώτερης τάξης [9].

Εικόνα 1.2: Διμερές μόριο ινσουλίνης



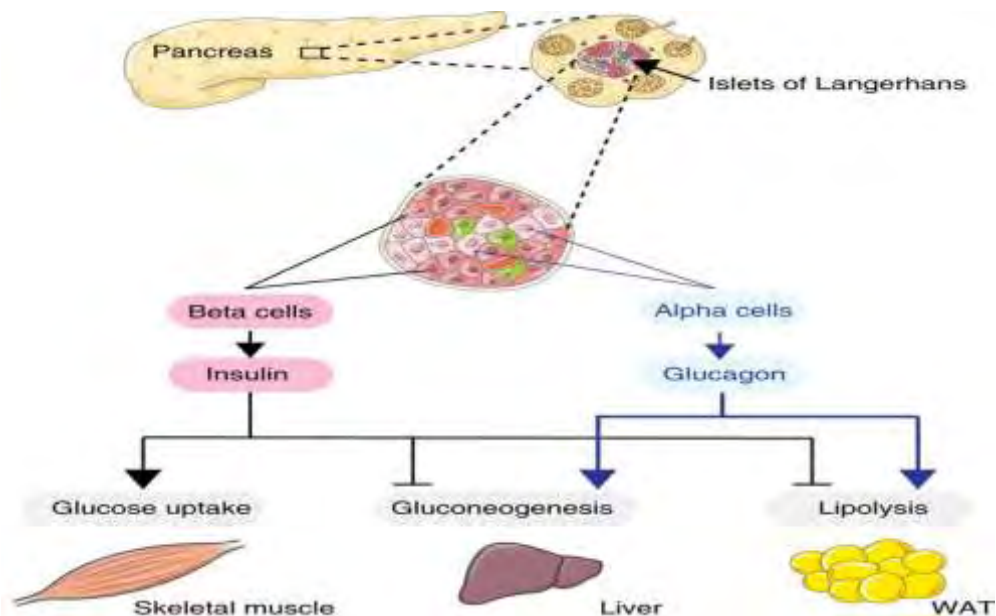
Η ινσουλίνη ευνοεί αναβολικές διεργασίες οι οποίες λειτουργούν στην κατεύθυνση της πρόσληψης της γλυκόζης και της αποθήκευσης ενέργειας, πρωτεϊνών και λίπους.

Κατά τη διάρκεια της νηστείας η ινσουλίνη του πλάσματος είναι χαμηλή και αυξάνεται κατά τη μεταγευματική κατάσταση. Μετά από την κατανάλωση ενός γεύματος η γλυκόζη, τα λιπαρά οξέα και τα αμινοξέα εισέρχονται στο ήπαρ. Η ινσουλίνη απελευθερώνεται από το πάγκρεας ως απόκριση της υψηλής συγκέντρωσης της γλυκόζης που κυκλοφορεί στο αίμα και σε μικρότερο βαθμό από άλλες ουσίες (πρωτεΐνες και λίπη). Η ινσουλίνη διεγείρει τη σύνθεση γλυκογόνου τόσο στο ήπαρ όσο και στους μύες. Ωστόσο, η απελευθέρωσή της στην κυκλοφορία του αίματος έχει ως αποτέλεσμα κατά κύριο λόγο, την αύξηση της μεταφοράς γλυκόζης σε γλυκοζοεξαρτώμενους ιστούς όπως στον εγκέφαλο, στο μυϊκό ιστό, στο λιπώδη ιστό και στο ήπαρ. Σε απάντηση στην ινσουλίνη, οι GLUT4 υποδοχείς που βρίσκονται στα κύτταρα, κινούνται στη μεμβράνη των κυττάρων για να διευκολύνουν την πρόσληψη της γλυκόζης. Εν συντομία, η γλυκόζη δε μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα χωρίς την παρουσία της ορμόνης ινσουλίνης. Αν δεν υπάρχει η ινσουλίνη, τα κύτταρα δε λαμβάνουν γλυκόζη και άρα ενέργεια, παρά το γεγονός ότι αυτή μπορεί να βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο αίμα. Έτσι, η θεραπευτική προσέγγιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου I περιλαμβάνει τη χορήγηση αρκετής ινσουλίνης ώστε ο ασθενής να έχει όσο το δυνατόν πιο φυσιολογικό μεταβολισμό υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών. Στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, συνιστάται η μείωση του σωματικού βάρους και η καθημερινή άσκηση, ώστε να αναστραφεί η ιστική αντίσταση προς την ινσουλίνη. Αν τα μέτρα αυτά αποτυγχάνουν, τότε πρέπει να χορηγηθούν φάρμακα που αυξάνουν την ιστική ευαισθησία προς την ινσουλίνη ή που διεγείρουν την αυξημένη σύνθεση ινσουλίνης από το πάγκρεας, Παρ' όλα αυτά, σε

πολλούς ασθενείς απαιτείται η εξωγενής χορήγηση ινσουλίνης, για τη ρύθμιση της γλυκόζης του αίματος [11].

### 1.2.2 Γλυκαγόνη

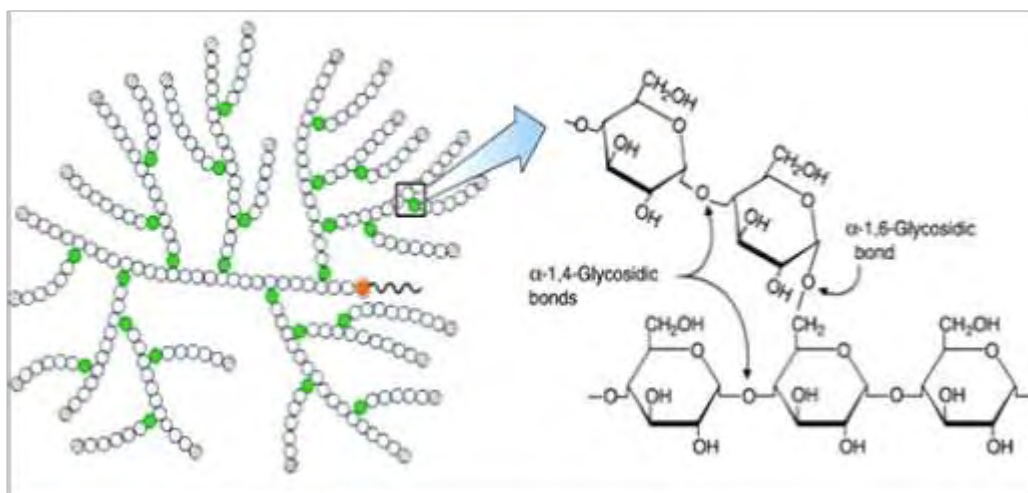
Η γλυκαγόνη είναι ένα γραμμικό πολυπεπτίδιο που αποτελείται από 29 αμινοξέα, εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans. Το βασικό ερέθισμα για την έκκριση της γλυκαγόνης είναι μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Με την δράση της εξασφαλίζονται φυσιολογικές τιμές σακχάρου αίματος στη νηστεία και στα ενδιάμεσα των γευμάτων. Αντίθετα, η υπεργλυκαιμία καταστέλλει την έκκριση της γλυκαγόνης είτε με απευθείας δράση στη λειτουργία των κυττάρων είτε έμμεσα αυξάνοντας την συγκέντρωση της ινσουλίνης. Οι κύριες επιδράσεις της γλυκαγόνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης είναι (1) η διάσπαση του γλυκογόνου του ήπατος (γλυκογονόλυση) και (2) η αύξηση της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ. Η γλυκαγόνη προάγει τη γλυκογονόλυση και αυξάνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Αυτό γίνεται με το ακόλουθο σύμπλεγμα αλυσιδωτών αντιδράσεων. Η γλυκαγόνη ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση στη μεμβράνη των ηπατικών κυττάρων και σχηματίζεται κυκλική AMP. Έτσι, ενεργοποιείται η πρωτεϊνική κινάση A η οποία ενεργοποιεί φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης (PhK) που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) η οποία προάγει τη διάσπαση του γλυκογόνου. [11]



Εικόνα 1.3: Ρυθμιστικοί ρόλοι των παγκρεατικών ορμονών ινσουλίνης και γλυκαγόνης [12]

### 1.2.3 Γλυκογόνο – Μεταβολισμός του Γλυκογόνου

Το γλυκογόνο, ένας διαλυτός πολυ-διακλαδισμένος ομοπολυσακχαρίτης γλυκόζης, είναι μια κοινή μορφή αποθήκευσης ενέργειας στους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς [13] και αποτελεί αποθήκη ενέργειας στα κύτταρα σε περιόδους διατροφικής αφθονίας. Το γλυκογόνο υπάρχει σε οργανισμούς όπως τα βακτήρια, τα αρχαία και ο άνθρωπος. Τα φυτά συνθέτουν συναφή πολυμερή γλυκόζης με τη μορφή αμύλου το οποίο αποτελείται από αμυλοπεκτίνη, που είναι ένας πολυσακχαρίτης χημικά παρόμοιος με το γλυκογόνο και την αμυλόζη, που είναι ένα μη διακλαδισμένο γραμμικό πολυμερές γλυκόζης [14]. Το γλυκογόνο είναι ένα έντονα διακλαδισμένο πολυμερές α-D-γλυκόζης που αποτελείται από κατάλοιπα γλυκόζης στις γραμμικές αλυσίδες που συνδέονται με  $1 \rightarrow 4$  γλυκοζιτικούς -δεσμούς (~ 93% του συνολικού αριθμού δεσμών) και έχει και διακλαδώσεις μετά από κάθε 4-8 υπολείμματα, οι οποίες σχηματίζονται από  $1 \rightarrow 6$ -γλυκοσιδικούς δεσμούς (~ 7% του συνολικού αριθμού των δεσμών). Σήμερα, θεωρείται ότι ένα πλήρως σχηματισμένο μόριο γλυκογόνου με την έχει ένα σφαιρικό σχήμα με διάμετρο ~ 42 nm και περιέχει περίπου 55.000 υπολείμματα γλυκόζης. Το μόριο γλυκογόνου περιλαμβάνει επίσης πολλές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σύνθεσή του και στην αποικοδόμησή του [15].



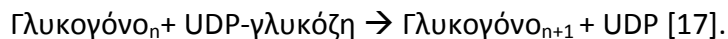
**Εικ.1.4** Δεξιά φαίνονται οι α-1,4 και α-1,6 γλυκοζιτικοί δεσμοί και αριστερά φαίνεται η οργάνωση του γλυκογόνου. Κατάλοιπα γλυκόζης συνδεδεμένα με α-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς, Κατάλοιπα γλυκόζης συνδεδεμένα με α-1,6γλυκοζιδικούς δεσμούς, θέση γλυκογονίνης

Το γλυκογόνο αποτελεί μία κινητοποιούμενη πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης αλλά δεν είναι τόσο πλούσιο σε ενέργεια όσο είναι τα λιπαρά οξέα διότι δεν είναι τόσο ανηγμένο. Η αποικοδόμησή του και η επακόλουθη απελευθέρωση γλυκόζης έχει ως αποτέλεσμα την

άμεση απόδοση ενέργειας στα κύτταρα. Επομένως, είναι ιδιαίτερα σημαντικό μόριο για τη ρύθμιση και τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, μέσα από τις διαδικασίες της σύνθεσης και της αποικοδόμησής του στο ήπαρ. Το γλυκογόνο αποθηκεύεται είτε στους σκελετικούς μύες, είτε στο ήπαρ και παρόλο που η συγκέντρωσή του στο ήπαρ είναι αρκετά υψηλότερη, περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους μύες διότι έχουν πολύ μεγαλύτερη μάζα [14].

### 1.2.3.1 Σύνθεση-Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου είναι μια πολύ σημαντική βιολογική διαδικασία που χρησιμοποιείται από όλους τους ευκαρυώτες για την αποθήκευση ενέργειας σε μια εύκολα κινητοποιούμενη μορφή. Το πολυμερές του γλυκογόνου συντίθεται από μόρια γλυκόζης και σχηματίζει σωματίδια που κυμαίνονται σε μέγεθος από 10 έως 290 nm [16]. Η σύνθεση του γλυκογόνου απαιτεί την είσοδο στο εσωτερικό των κυττάρων μορίων γλυκόζης, η οποία επιτυγχάνεται μέσω των μεταφορέων γλυκόζης (GLUT). Η πορεία που ακολουθείται χρειάζεται μία ενεργή μορφή γλυκόζης, την ουρινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη). Η σύνθεσή της ξεκινά με την μετατροπή της εισερχόμενης στα κύτταρα γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη από το ένζυμο της εξοκινάσης, και στη συνέχεια σε 1-φωσφορική γλυκόζη, που μαζί με τη τριφωσφορική ουριδίνη (UTP) αποτελούν το υπόστρωμα για την παραγωγή UDP-γλυκόζης μέσω μια αντίδρασης που καταλύεται από την πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης. Η κύρια αντίδραση της σύνθεσης του γλυκογόνου είναι η εξής:

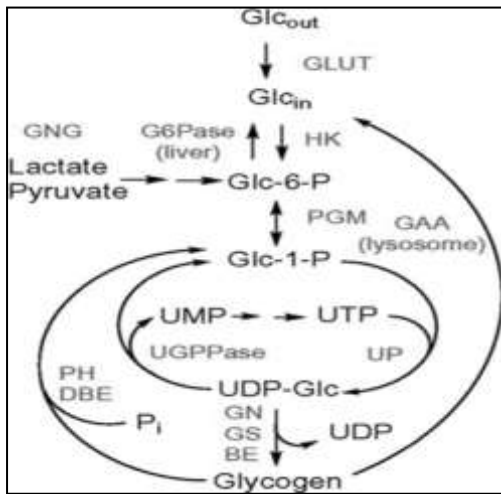


Στους ευκαρυώτες, το γλυκογόνο συντίθεται μέσω της δράσης τριών ενζύμων, δηλαδή της συνθάσης του γλυκογόνου (GS), της γλυκογενίνης (GN) και του ενζύμου διακλάδωσης γλυκογόνου (GBE) (1). Ένα διμερές γλυκογενίνης εκκινεί το σχηματισμό ενός πολυμερούς γλυκογόνου με αυτογλυκοσυλίωση, σχηματίζοντας αλυσίδα με 8-12 μονομερών γλυκόζης που συνδέονται με  $\alpha 1 \rightarrow 4$  γλυκοζιτικούς -δεσμούς. Αυτός ο ολιγοσακχαρίτης παραμένει συνδεδεμένος με τη γλυκογενίνη και σχηματίζει έναν εκκινητή ο οποίος μετατρέπεται σε γλυκογόνο πλήρους μεγέθους με τις δράσεις των ενζύμων GS και GBE. Μόλις ολοκληρωθεί η επεξεργασία, ένα σωματίδιο γλυκογόνου μπορεί να περιλαμβάνει έως και 55.000 υπολείμματα γλυκόζης με κατανομή μεγέθους στο μυϊκό ιστό διαμέτρου 10-44 nm (σωματίδια  $\beta$ ). Στο ήπαρ σχηματίζονται σωματίδια γλυκογόνου διαμέτρου 110-290 nm (σωματίδια  $\alpha$ ) με τη συναρμολόγηση πολλών σωματιδίων  $\beta$ , πιθανώς μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης.

Η δραστηριότητα της συνθάσης του γλυκογόνου ρυθμίζεται στενά μέσω της δράσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης που αποτελεί έναν αλλοστερικό ενεργοποιητή, μέσω πολλαπλών ανασταλτικών γεγονότων φωσφορυλίωσης και μέσω των αλληλεπιδράσεων της με τη γλυκογενίνη [17]. Στα θηλαστικά υπάρχουν δύο ισομορφές του ενζύμου : η μυϊκή συνθάση του γλυκογόνου, η οποία εκφράζεται άφθονα στους σκελετικούς και καρδιακούς μύες και η ηπατική ισομορφή της οποίας η έκφραση είναι πιο περιορισμένη [18]. Στην αντίστροφη

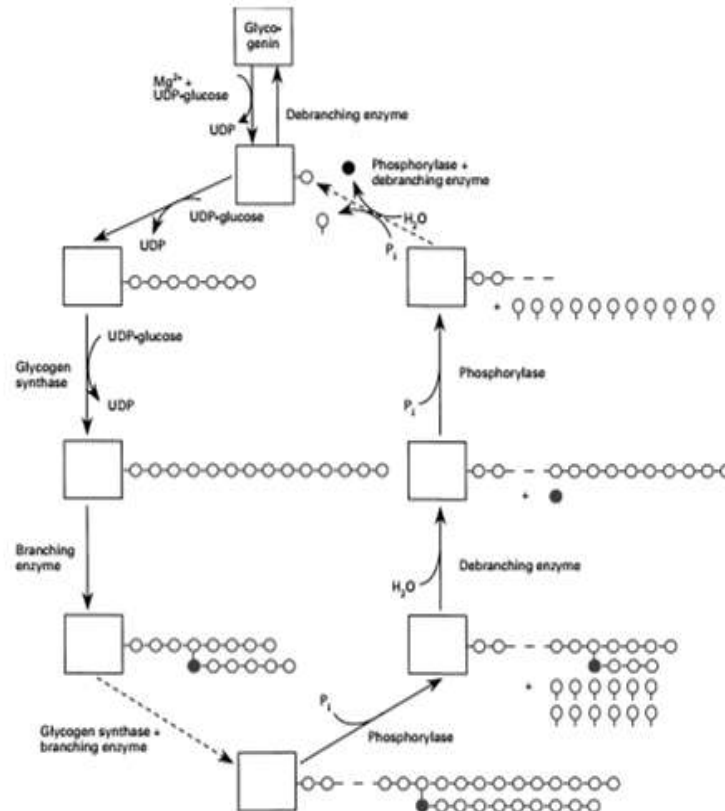


πορεία, δηλαδή κατά τη διάσπαση του γλυκογόνου, αρχικά έχουμε τη δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και του ενζύμου αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου που οδηγούν στην παραγωγή 1- φωσφορικής γλυκόζης



**Εικόνα 1.5** Επισκόπηση του μεταβολισμού του γλυκογόνου Glc<sub>out</sub> εξωκυτταρική γλυκόζη, Glc<sub>in</sub> ενδοκυτταρική γλυκόζη, HK εξοκινάση, G6Pase φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, PGM φωσφογλυκομουτάση, UP φωσφορυλάση της UDP γλυκόζης, UGPPase φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, GN γλυκογονίνη, GS συνθάση του γλυκογόνου, BE ένζυμο διακλάδωσης, PH φωσφορυλάση του γλυκογόνου, DBE ένζυμο αποδιακλάδωσης, GAA λυσοσωμική α-γλυκοσιδάση, GNG γλυκονεογένεση, [19]

Παρακάτω απεικονίζονται ένζυμα που είναι απαραίτητα για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πολυμερούς του γλυκογόνου αλλά και της διάσπασής προκειμένου να παραχθεί γλυκόζη:



Εικόνα: στάδια της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου.

### Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase, GP)



Εικόνα

1.6Η διάσπαση του γλυκογόνου περιλαμβάνει τη δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου GP, η οποία καταλύει την φωσφορόλυση των συνδέσεων α-1,4 γλυκόζης,[20]

Η αντίδραση που καταλύει το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ονομάζεται φωσφορόλυση. Πιο συγκεκριμένα προκαλεί τη διάσπαση του γλυκογόνου (με  $n$  κατάλοιπα) με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος ( $P_i$ ) σε 1-φωσφορική γλυκόζη και γλυκογόνο (με  $n-1$  κατάλοιπα) όπως φαίνεται και στην εικόνα 16. Αυτή η αντίδραση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Η φωσφορυλάση δεν μπορεί να διασπάσει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6 με αποτέλεσμα να σταματά τη δράση της όταν φτάσει σε απόσταση 4 καταλοίπων από το σημείο της διακλάδωσης. Επίσης αυτό το ένζυμο έχει ένα μεγάλο ενεργειακό πλεονέκτημα,

το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι το απελευθερούμενο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο, [21].

### **Φωσφογλυκομουτάση**

Η μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη καταλύεται από την φωσφομουτάση. Συγκεκριμένα, το ένζυμο αυτό περιέχει στο καταλυτικό της κέντρο ένα φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο σερίνης. Για τον σχηματισμό της 6-φωσφορικής γλυκόζης υπάρχει ένα ενδιάμεσο στάδιο όπου η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται από το κατάλοιπο της σερίνης προς την υδροξυλική ομάδα του C-6 της 1 φωσφορικής γλυκόζης με αποτέλεσμα το σχηματισμό της 1,6-φωσφορικής γλυκόζης. Στη συνέχεια η φωσφορική ομάδα του C1 της 1,6 διφωσφορικής γλυκόζης μεταφέρεται στο κατάλοιπο σερίνης του καταλυτικού κέντρου της φωσφογλυκομουτάσης, με αποτέλεσμα την δημιουργία 6-φωσφορικής γλυκόζης και την αναγέννηση του ενζύμου, [22].

### **Ένζυμα αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου**

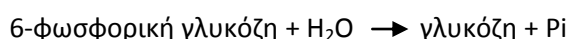
Επειδή η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διασπά γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4 στο μόριο του γλυκογόνου αλλά είναι ανίκανη να διασπάσει α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, τα ένζυμα: *μεταφοράση* & α-1,6- *γλυκοζιτάση* είναι υπεύθυνα για την ανακατασκευή του γλυκογόνου για να μπορεί να συνεχίσει την αποικοδόμηση η φωσφορυλάση.

Μεταφοράση: μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη αφήνοντας εκτεθειμένο ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με α-1,6 γλυκοζιτικό δεσμό.

Γλυκοζιτάση α-1,6: γνωστή επίσης ως το ένζυμο αποδιακλάδωσης, υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης. Αυτό το ελεύθερο μόριο γλυκόζης φωσφορυλιώνεται με το γλυκολυτικό ένζυμο εξοκινάση, [22]

### **1.3 Φωσφατάση 6- φωσφορικής γλυκόζης**

Η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6Pase) αποτελεί ένα βασικό ένζυμο ομοιόστασης της γλυκόζης το οποίο καταλύει την υδρόλυση 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6P) σε γλυκόζη και ανόργανο φωσφορικό άλας (Pi), [23] και βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης του λείου ενδοπλασματικού δικτύου.

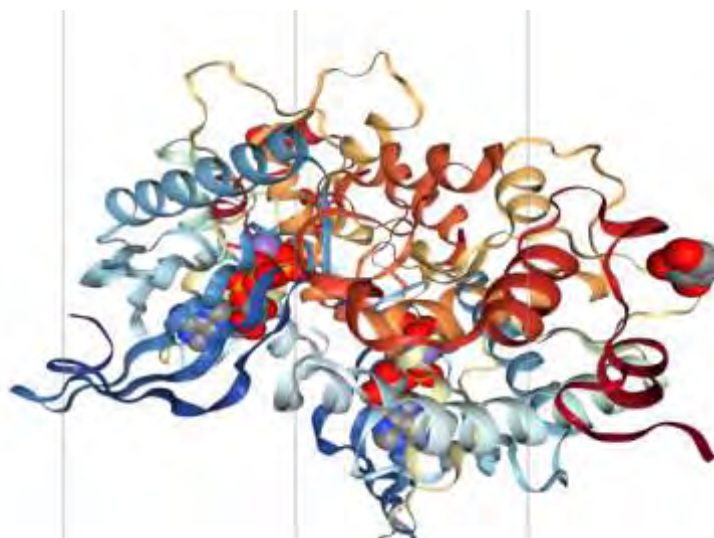


Αυτή η λειτουργία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης είναι πολύ σημαντική διότι καθιστά την γλυκόζη που παράγεται από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου ικανή να εγκαταλείψει το ήπαρ και να ελευθερωθεί στο αίμα (ενώ άμα ήταν φωσφορυλιωμένη δεν θα μπορούσε να διαχυθεί έξω από τα κύτταρα του ήπατος). Η γλυκόζη που απελευθερώνεται

στην κυκλοφορία του αίματος προσλαμβάνεται κυρίως από τον εγκέφαλο και άλλους ιστούς για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του οργανισμού. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι το ένζυμο αυτό απουσιάζει από τους περισσότερους άλλους ιστούς, [22].

#### 1.4 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών που απαρτίζουν μία από τις μεγαλύτερες γνωστές οικογένειες πρωτεϊνών, με περισσότερα από 100 ομόλογα ένζυμα στη ζύμη και περισσότερα από 55 στον άνθρωπο. Τα ένζυμα αυτά μεταφέρουν φωσφορικές ομάδες από την ATP σε εξειδικευμένα κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης των πρωτεϊνών στόχων τους. Η κινάση της φωσφορυλάσης είναι ένα ένζυμο το οποίο τροποποιεί ομοιοπολικά τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου μετατρέποντας την από την GPb στην GPaμορφή, ως απόκριση σε ορμονικά ερεθίσματα. Είναι ένα δεκαεξαμερές που αποτελείται από τέσσερις διαφορετικές υπομονάδες (αβγδ)<sub>4</sub> με μια συνολική μάζα 1300 kDa. Εικόνες από κρυο ηλεκτρονιακής μικροσκοπία υποδηλώνουν ότι οι υπομονάδες του ενζύμου είναι διατεταγμένες σε μια διηλεκτρική δομή «πεταλούδας». Η υπομονάδα δ είναι ταυτόσημη με την καλμοδουλίνη και προσδίδει ενεργοποίηση της κινάσης από Ca<sup>2+</sup>. Η κινάση της φωσφορυλάσης διατηρεί την υπομονάδα δ ακόμη και απουσία Ca<sup>2+</sup>, σε αντίθεση με άλλα ένζυμα που η δράση τους ρυθμίζεται από την καλμοδουλίνη. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στη γ-υπομονάδα (45kDa) που περιέχει μια περιοχή κινάσης και μια καρβοξυτελική περιοχή δέσμευσης της καλμοδουλίνης. Η α-υπομονάδα (138 kDa) και η β-υπομονάδα (125 KDa) είναι πολύ παρόμοιες στη δομή τους, με μοναδική διαφορά να αποτελούν οι αλληλουχίες που περιβάλλουν τις θέσεις φωσφορυλίωσης. Επίσης, η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί ένα ένζυμο που βρίσκεται κάτω από διπλό έλεγχο: ενεργοποιείται αφενός με φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση A και αφετέρου από την αύξηση των επιπέδων του Ca<sup>2+</sup>. [23]



Εικόνα1.: A) 3D δομή της *PhK-g-trunc*(PDBID: 2PHK)

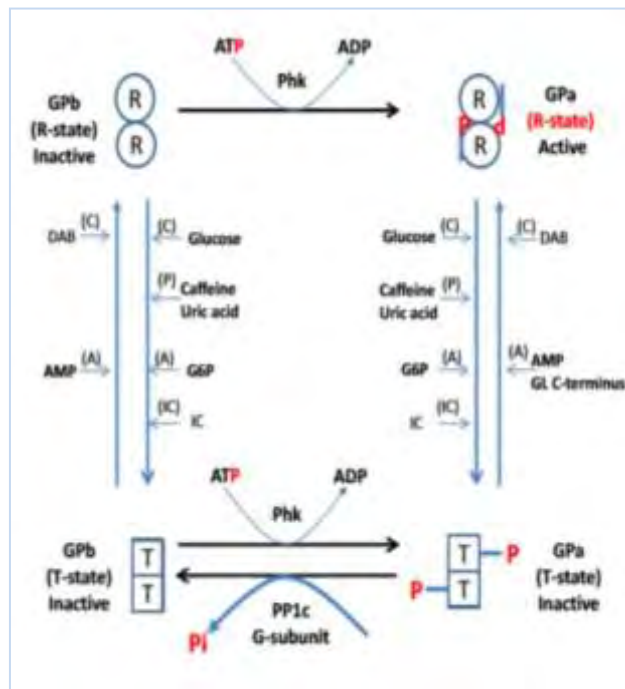
### 1.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο και αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη.



Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *invitro* και ο λόγος ισορροπίας της 1-φωσφορικής γλυκόζης προς ταορθοφωσφορικά ιόντα είναι 0.28 σε pH 6.8. Ωστόσο, το ένζυμο *in vivo* δρα μόνο προς την κατεύθυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης του γλυκογόνου, επειδή στο κύτταρο η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου είναι σημαντικά περισσότερη από την συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης[24]. Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, τις αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου. Επίσης, κάθε καταλυτικό κέντρο, σε κάθε υπομονάδα, περιέχει μια ομάδα φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), συνδεδεμένη με τη λυσίνη (Lys) 680 του ενζύμου [21]. Υπάρχουν 3 ισομορφές της φωσφορυλάσης οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια PYGL, PYGM και PYGB και εκφράζονται στο ήπαρ, στους μύες και στον εγκέφαλο αντίστοιχα. Στον άνθρωπο, η ηπατική και η μυϊκή φωσφορυλάση είναι κατά προσέγγιση 90% παρόμοιες στην αμινοξική αλληλουχία. Και οι τρεις ισομορφές της φωσφορυλάσης ρυθμίζονται αλλοστερικά με δέσμευση μεταβολιτών και με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση στησερίνης 14. Η φωσφορυλάση ήταν το πρώτο ένζυμο που φάνηκε να ρυθμίζεται με ομοιοπολική φωσφορυλίωση. Η μυϊκή φωσφορυλάση από κονίκλους (rmGb) έχει 97 % ομολογία με την ανθρώπινη μυϊκή φωσφορυλάση (hmGP) με βάση την αμινοξική αλληλουχία. Επιπλέον, τα τρία ισοένζυμα που υπάρχουν στον άνθρωπο μοιράζονται μεταξύ τους 80-83 % ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία ενώ μεταξύ της rmGP και της ηπατικής φωσφορυλάσης (hlGP) δεν υπάρχουν δομικές διαφορές στο καταλυτικό και στα αλλοστερικά κέντρα,[25]. Φυσιολογικά η δραστηριότητα της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο PhK (ενότητα 1.4). Η κινάση μετά από έναν ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP<sub>a</sub>. Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G<sub>1</sub>(PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP<sub>b</sub>. Η φωσφορυλιωμένη και η από-φωσφορυλιωμένη μορφή, ορίζονται αντίστοιχως ως GP<sub>a</sub> και GP<sub>b</sub>. Η GP, ως αλλοστερικό ένζυμο, βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργούς χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T. Η φωσφορυλίωση από την κινάση της φωσφορυλάσης (PhK) και η πρόσδεση ποικίλων αλλοστερικών ενεργοποιητών, όπως η AMP, μετατοπίζουν την ισορροπία στην κατάσταση R. Αντίθετα, η

αποφωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) και η πρόσδεση αναστολέων, όπως η γλυκόζη, προωθούν την μετάβαση από την κατάσταση R στην κατάσταση T,[26].



**Εικόνα1.8** Έλεγχος της φωσφορυλάσης με φωσφορυλίωση και αλλοστερικές τροποποιήσεις [27].

### 1.5.1 Ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου βρίσκεται συνήθως στη μορφή α διότι πρέπει να παράγει γλυκόζη η οποία θα απελευθερώνεται στην κυκλοφορία για χρήση από άλλους ιστούς όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλά. Η δέσμευση της γλυκόζης μετατοπίζει την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την ενεργό κατάσταση R στη λιγότερο ενεργό κατάσταση T. Η ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης διαφέρει από εκείνη των μυών. Συγκεκριμένα, στο ήπαρ το ένζυμο δεν είναι ευαίσθητο σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται σημαντικές αλλαγές στο ενεργειακό του φορτίο,[21].

### 1.5.2 Μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου

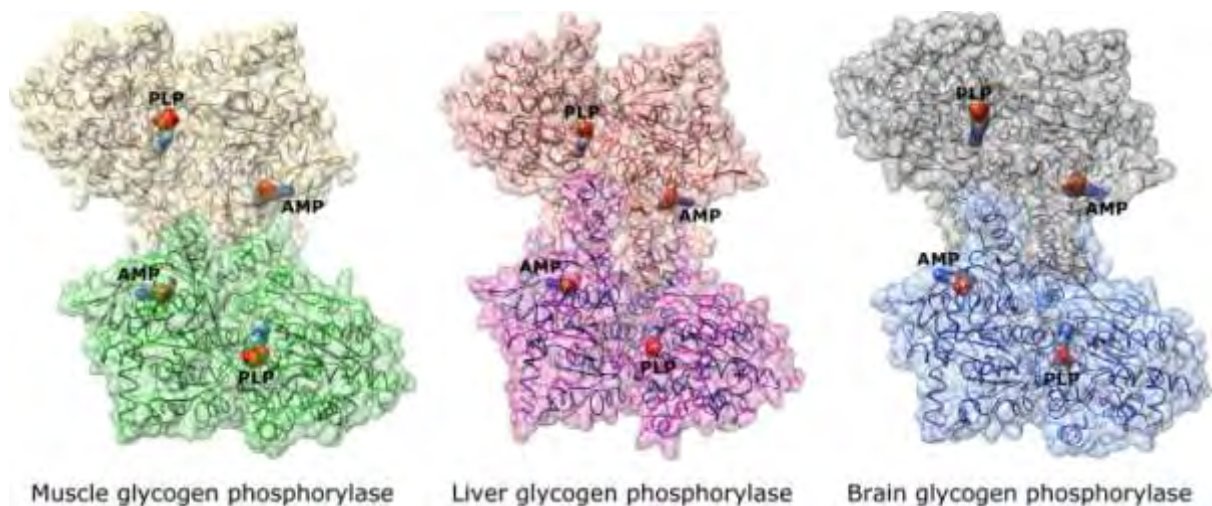
Η συνήθης κατάσταση της φωσφορυλάσης των μυών είναι η μορφή b. Η μυϊκή φωσφορυλάση b ενεργοποιείται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων της AMP, η οποία δεσμεύεται σε στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην ενεργό κατάσταση R. Έτσι, όταν ο μυς συσπάται και η ATP μετατρέπεται σε AMP, η φωσφορυλάση δέχεται το σήμα να αποικοδομήσει το γλυκογόνο (σε υψηλές συγκεντρώσεις της AMP). Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής,



ανταγωνιζόμενος την AMP. Επομένως, η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Συνήθως, η φωσφορυλάση b είναι ανενεργός λόγω της δράσης της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση α είναι πλήρως ενεργή, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP, της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Στους μυς που βρίσκονται σε ηρεμία, σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή b. Όταν αρχίζει η άσκηση, τα αυξημένα επίπεδα της AMP οδηγούν στην ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης b [21].

### 1.5.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου στον εγκέφαλο

Στον εγκέφαλο, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου εντοπίζεται κυρίως στα αστροκύτταρα, τα οποία περιέχουν το μεγαλύτερο μέρος του αποθέματος γλυκογόνου και σε μικρότερο βαθμό στους νευρώνες. Ωστόσο, ενώ οι νευρώνες εκφράζουν μόνο την εγκεφαλική μορφή της φωσφορυλάσης, τα αστροκύτταρα εκφράζουν ταυτόχρονα τόσο την μυϊκή όσο και την φωσφορυλάση του εγκεφάλου. Η φωσφορυλάση στον εγκέφαλο είναι ευαίσθητη στην δράση της AMP και έτσι επιτρέπει τη χρήση του αποθέματος γλυκογόνου σε απόκριση της τοπικής ενεργειακής ανάγκης. Στους νευρώνες, το γλυκογόνο τροφοδοτεί κυρίως την οδό των φωσφορικών πεντοζών και παρέχει προστασία από το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, η 1-φωσφορική γλυκόζη που προέρχεται από το γλυκογόνο μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω σε 6-φωσφορική γλυκόζη και να τροφοδοτήσει τόσο την οδό των φωσφορικών πεντοζών όσο και αυτή της γλυκόλυσης στα αστροκύτταρα. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου υπάρχει επίσης στην καρδιά, σε επίπεδα παρόμοια με αυτά που βρίσκεται στον εγκέφαλο, υποδηλώνοντας ότι η δράση της πρέπει να είναι σημαντική για την καρδιακή λειτουργία. Επίσης, είναι προφανές ότι η παρουσία της φωσφορυλάσης στον εγκέφαλο σχετίζεται με μια τοπική χρήση του αποθέματος του γλυκογόνου για να παρέχεται γλυκόζη για το ίδιο το κύτταρο, [28].

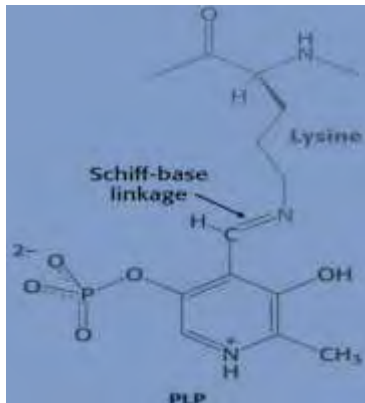


**Εικόνα 1.9** Οι τρεις ισομορφές της ανθρώπινης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Αναπαράσταση του μυϊκού (κίτρινο και πράσινο), ηπατικού (πορτοκαλί και ροζ) και του ισοενζύμου του εγκεφάλου (γκρι και μπλε) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Τα τρία ισοένζυμα σχηματίζουν ομοδιμερή και

παρουσιάζουν παρόμοιες δομές. Ο συμπαράγοντας PLP υπάρχει στην καταλυτική θέση κάθε μονομερούς. Η θέση δέσμευσης AMP βρίσκεται στη διεπαφή του κάθε διμερούς,[28].

#### 1.5.4 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης

Η 5-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) είναι η βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης Β6 που δρα ως συνένζυμο για τα ένζυμα που μεταβολίζουν τις αμίνες, τα αμινοξέα και τα κετο-οξέα. Το βασικό χαρακτηριστικό των εξαρτώμενων από την PLP ενζύμων είναι η



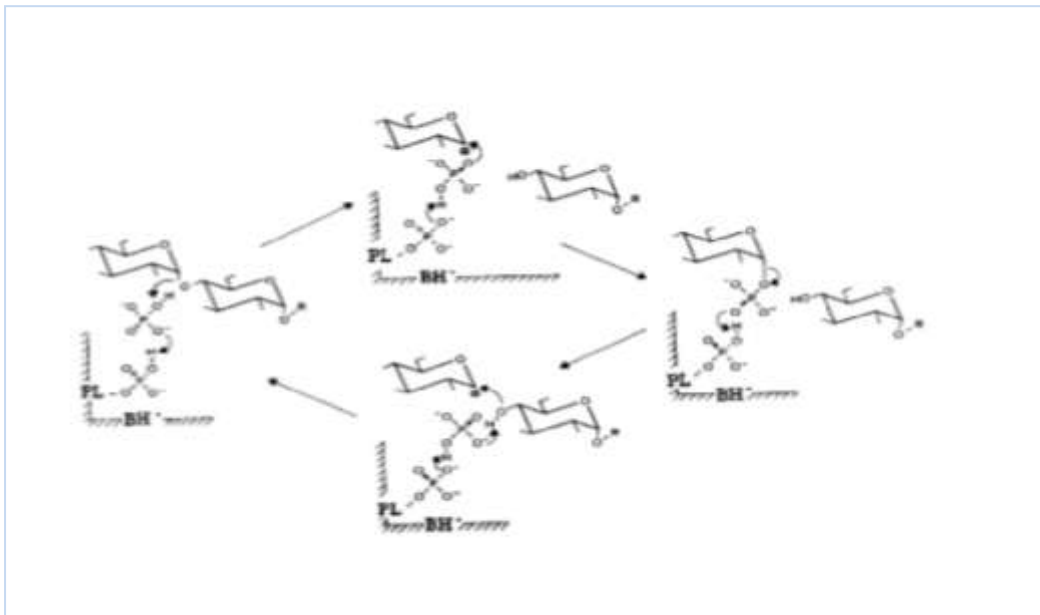
**Εικόνα 1.10** Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP(κόκκινο) σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (μπλε) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης

καταλυτική ευελιξία, [29]. Η ιδιαίτερη 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. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό νερού από το ενεργό κέντρο. Διάφορες ενδείξεις παρέχουν πληροφορίες γύρω από το μηχανισμό με τον οποίο η φωσφορυλάση επιτυγχάνει τον αποκλεισμό νερού. Πρώτον, τόσο το γλυκογόνου όσο και η παραγόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. 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,[21]. Σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης της PLP, το βασικό ενδιάμεσο βήμα σε αυτού του τύπου αντιδράσεις, είναι ο σχηματισμός μιας βάσης Schiff μεταξύ της φωσφορικής πυριδοξάλης και του κατάλληλου αμινοξέος. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου η αλδεϋδική ομάδα της PLP σχηματίζει μία βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης 680 του ενζύμου. Η παρουσία αυτού του δεσμού είναι απαραίτητη για την εμφάνιση καταλυτικής δραστηριότητας. Η χρήση διαφορετικών χημικών αναλόγων της PLP με τροποποιήσεις σε κάθε θέση γύρω από τον δακτύλιο πυριδίνης έδειξε ότι η PLP υποστηρίζει την φυσική δομή του ενζύμου και συμμετέχει και στην κατάλυση,[24].

Τα αποτελέσματα δομικών μελετών υποδηλώνουν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μια θέση μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό λειτουργώντας ως δότης πρωτονίων και στη συνέχεια ως δέκτης πρωτονίων (δηλαδή σαν ένας οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό ιόν ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) δίνει ένα πρωτόνιο στο



οξυγόνο, του άνθρακα 4 της αποχωρούσας αλυσίδας του γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν, που σχηματίζεται στο βήμα αυτό, προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό προς σχηματισμό φωσφορικής γλυκόζης δεσμού α-1, με την επακόλουθη επιστροφή ενός ατόμου υδρογόνου στη φωσφορική πυριδοξάλη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης [21].



Εικόνα 1.11 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 ιόντος (πάνω μισό) και την σύνθεση παρουσία 1-φωσφορικής γλυκόζης (κάτω μισό). PL = πυριδοξάλη, BH<sup>+</sup> = πρωτονιωμένη γενική βάση που προσφέρεται από το πρωτεϊνικό ένζυμο, [24].

### 1.5.5 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου-Δομή

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ομοδιμερές το οποίο αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες (842 κατάλοιπα), [21]. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.12 η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διαθέτει 6 κέντρα σύνδεσης : το καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής, το αλλοστερικό κέντρο, το νέο αλλοστερικό κέντρο, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου και το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης που ανακαλύφθηκε πρόσφατα [30].



**Εικόνα 1.12** Η κρυσταλλική δομή της GPb με τα έξι κέντρα πρόσδεσης: **καταλυτικό κέντρο** (G6P), **κέντρο αναστολής** (3EB0), **κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου** (1P29), **νέο αλλοστερικό κέντρο** (1H5U), **κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης** (4MRA), **αλλοστερικό κέντρο** (1GPY), **βρόχος 280s** και η Ser14.

### 1.5.5. 1 Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου περιλαμβάνει το συμπράγοντα PLP και είναι προσβάσιμο στο διαλύτη μέσω ενός καναλιού μήκους 15 Å. Οι αναστολείς που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s (κατάλοιπα 282-287) και επιπλέον παρεμποδίζουν την πρόσβαση του υποστρώματος προωθώντας την ανενεργό κατάσταση T. Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε φωσφορυλάση του γλυκογόνου που προέρχεται από μύες κονίκλων, εξαιτίας της διαθεσιμότητας και της ικανότητας να παράγονται υψηλής ποιότητας κρύσταλλοι. Οι αναστολείς που προσδένονται πιο ισχυρά στο καταλυτικό κέντρο είναι ανάλογα γλυκόζης και έχει δειχθεί ότι μειώνουν τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα διαβητικών ποντικών [30]. Πρόσφατα οι Nagy και συν., έδειξαν ότι αναστολείς της GP μπορούν να βελτιώσουν την εκκριτική λειτουργία των β-παγκρεατικών κυττάρων προτείνοντας ότι αυτές οι ενώσεις μπορούν να στοχεύουν ταυτόχρονα το ήπαρ και το πάγκρεας.

### **1.5.5.2 Το κέντρο αναστολής**

Το κέντρο αναστολής, που είναι επίσης γνωστό ως κέντρο πρόσδεσης της καφεΐνης, βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση προσδετών σε αυτό το κέντρο γίνεται κυρίως μέσω της παρεμβολής των αρωματικών αλυσίδων των καταλοίπων Phe285 και Tyr613 μέσω σχηματισμού αλληλεπιδράσεων π-π. Οι προσδέτες είναι πιο ισχυροί παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης. Έτσι, η ανασταλτική δράση μπορεί να ρυθμιστεί από τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και να μειωθεί όταν τα επίπεδα γλυκόζης πλησιάσουν στο κανονικό, μειώνοντας τον κίνδυνο για υπεργλυκαιμία[30].

### **1.5.5.3 Αλλοστερικό κέντρο**

Το αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου συντίθεται από δομικά στοιχεία που προέρχονται και από τις δύο υπομονάδες του λειτουργικού διμερούς και βρίσκεται σε αντίθετες πλευρές του μορίου του ενζύμου. Δύο α-έλικες (κατάλοιπα 47-78 και 289-314 αντίστοιχα) και κλώνοι (κατάλοιπα 153-160, 191-193, 222-232 και 237-247) δημιουργούν μια κοιλότητα σχήματος V. Το κέντρο αυτό αναγνωρίζει μεγάλη ποικιλία φωσφορυλιωμένων συστατικών όπως AMP, IMP, ATP, UDP γλυκόζη, 6-φωσφορική γλυκόζη, β-γλυκεροφωσφορικό και ανόργανο φωσφόρο. Η 6-φωσφορική γλυκόζη είναι ο ισχυρότερος φυσικός αναστολέας της GPb που προσδέεται στο αλλοστερικό κέντρο ( $K_d=20-70 \mu M$  για την GPb,  $K_d=1700 \mu M$  για την GPa). Η σύνδεση των προσδετών σε αυτό το κέντρο αναστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, είτε ανταγωνίζοντας την AMP, που είναι φυσιολογικός ενεργοποιητής, είτε σταθεροποιώντας την ανενεργό διαμόρφωση T του ενζύμου [30]. Ο 1,4-διυδροπυριδινό-2,3-δικαρβοξυλικός εστέρας έχει αποδειχθεί ως ένας από τους ισχυρότερους αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που ταιριάζει απόλυτα στην αλλοστερική θέση του ενζύμου. Η υψηλή συγγένεια αυτού του αναστολέα προς την GPb φαίνεται να προκύπτει κυρίως από τις μη πολικές αλληλεπιδράσεις με το ένζυμο, ιδιαίτερα εκείνες μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων. Επίσης τα πεντακυκλικά τερπένια αποτελούν φυσικά προϊόντα που στοχεύουν στο αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, [30]

### **1.5.5.4 Νέο αλλοστερικό κέντρο**

Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στο κέντρο της κοιλότητας του διμερούς ενζύμου που σχηματίζεται από τις δύο υπομονάδες. Το νέο αλλοστερικό κέντρο απέχει 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολέα. Ο ισχυρότερος φυσικός αναστολέας του νέου αλλοστερικού κέντρου είναι το ινδόλιο. Οι αναστολείς που προσδέονται λειτουργούν σαν κλασικοί αλλοστερικοί αναστολείς σταθεροποιώντας την κατάσταση T (ανενεργός) και εμφανίζουν συνέργεια με άλλους αναστολείς, όπως η γλυκόζη[30].

### **1.5.5.5 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου**

Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και είναι η περιοχή

του ενζύμου που συνδέεται το γλυκογόνο. Αποτελείται από 2 έλικες (κατάλοιπα 396-418 και 420-439) και ένα βρόχο που συνδέει 2 αντιπαράλληλους κλώνους (κατάλοιπα 430-432 και 437-411). Για την πρόσδεση  $\alpha$ - ( $K_i=47,1$  mM),  $\beta$ - ( $K_i=14,1$  mM) και  $\gamma$ - ( $K_i=7,4$  mM) κυκλοδεξτρινών στην gmGPb έχουν γίνει κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες. Άλλοι αναστολείς που προσδένονται σε αυτή τη θέση είναι η ακαρβόζη ( $K_i=26$  mM για την gmGPa), μαλτοπενταόζη (G5) και μαλτοεπταόζη (G7) ( $K_i=1$  mM για την gmGPb). Η δομική βάση της πρόσδεσης αυτών των μελετημένων προσδετών (κυκλικών και γραμμικών) είναι παρόμοια και περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα Ser429, Lys473 και Asn407, καθώς και αλληλεπιδράσεις με μόρια νερού με τα κατάλοιπα Gln401, Arg426, Val431 και Gln433, [30].

#### **1.5.5.6 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης**

Πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από το Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας βρέθηκε ότι ενώ η χρυσίνη και η φλαβοπυριδόλη δεσμεύονται αποκλειστικά στο αλλοστερικό κέντρο, η κερσετίνη προσδένεται σε ένα νέο κέντρο. Αυτό το κέντρο απέχει 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Επίσης βρέθηκε ότι η κερσετίνη είναι το πιο βιοδραστικό συστατικό ανάμεσα σε 13 πολυφαινολικά εκχυλίσματα που προέρχονταν από υποπροϊόντα οινοποίησης της ελληνικής ποικιλίας *Vitisvinifera*. Η πρόσδεση της κερσετίνης σε αυτό το κέντρο ευνοεί την λιγότερο ενεργό κατάσταση T, μέσω σταθεροποίησης της διαμόρφωσης του βρόχου (κατάλοιπα 548-556) στην κατάσταση T [30].

#### **1.5.6 Φωσφορυλάση του Γλυκογόνου ως Στόχος Υπογλυκαιμικών Φαρμάκων**

Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για την σύνθεση αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες [33]. Ωστόσο η ύπαρξη των τριών ισομορφών (της ηπατικής, της μυϊκής και του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Συγκεκριμένα για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο άλλες ισομορφές [34]. Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ [35]. Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το

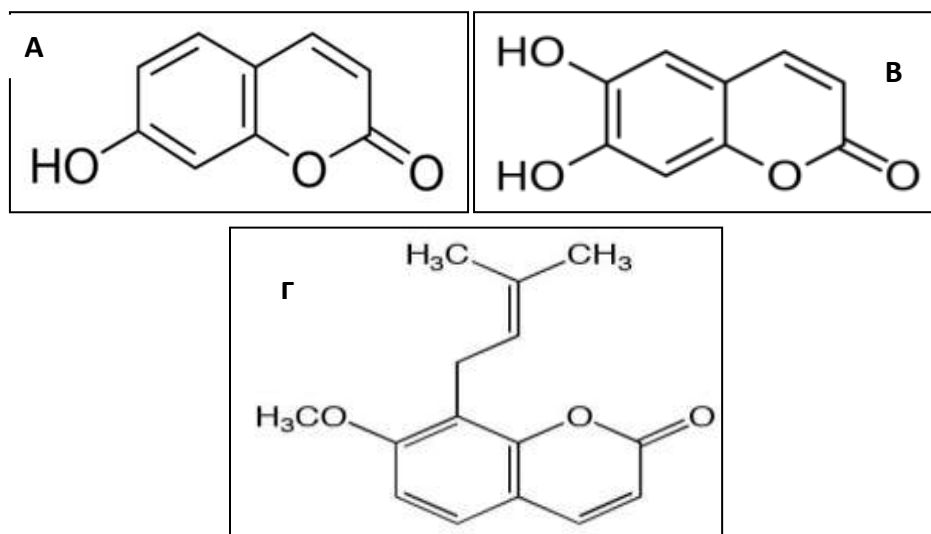
σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιοριστεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως εναρκτήριο σημείο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP,[36]. Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP.

## 1.6 Κουμαρίνες

Οι κουμαρίνες είναι ετεροκυκλικά μόρια που έχουν αναφερθεί για τα ευεργετικά τους αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία, όπως είναι η μείωση κινδύνου του καρκίνου, του διαβήτη, των καρδιαγγειακών παθήσεων και των εγκεφαλικών ασθενειών [α]. Ανακαλύφθηκαν τυχαία τη χρονική περίοδο 1920-1922 στον Καναδά και βόρειες Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής σε αγελάδες που υπέστησαν αιμορραγία και τελικά θάνατο επειδή είχαν καταναλώσει χορτάρι το οποίο είχε σαπίσει. Μετά από μελέτες, ο *Frank W. Schofield* παθολόγος της κτηνιατρικής σχολής του Οντάριο στον Καναδά διαπίστωσε ότι η ουσία που ευθύνεται για την αιμορραγική ασθένεια των ζώων είναι η κουμαρίνη η οποία είχε χαρακτηριστική οσμή και ήταν γενικά ακίνδυνη. Ωστόσο, στο χαλασμένο τριφύλλι η κουμαρίνη ήταν δηλητηριώδης. Έτσι, το 1939 η τοξική μορφή της κουμαρίνης μετά την απομόνωση των κρυστάλλων της και την εύρεση της χημικής της δομής πήρε την ονομασία "βαρβαρίνη",[37].

### 1.6.1 Οι κουμαρίνες ως πιθανοί αντιδιαβητικοί παράγοντες

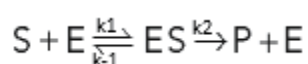
Οι κουμαρίνες είναι δευτερεύοντες μεταβολίτες που βρίσκονται ευρέως σε φυτά και χρησιμοποιούνται κυρίως στην αντιθρομβωτική θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων. Δεδομένης της συχνής συσχέτισης μεταξύ του διαβήτη και των καρδιαγγειακών επιπλοκών, οι κουμαρίνες θα ήταν ακόμη πιο πολύτιμες εάν ήταν επίσης αποτελεσματικές κατά του διαβήτη. Υποθετικά, αυτά τα φάρμακα δεν θα μειώσουν μόνο τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, αλλά ταυτόχρονα θα βελτιώσουν τα αποτελέσματα από καρδιαγγειακές δυσκολίες παρουσιάζουν οι διαβητικοί ασθενείς. Οι ερευνητές έχουν ανακαλύψει φυτικά εκχυλίσματα που περιέχουν κουμαρίνες και εμφανίζουν αντιδιαβητική δράση. Συγκεκριμένα, έχουν αναφερθεί φυσικές κουμαρίνες, όπως η *umbelliferone*, η *esculentin* και η *osthole* καθώς και παράγωγα κουμαρίνης υποσχόμενες για την ελπιδοφόρα θεραπευτική τους δράση έναντι στον διαβήτη οδηγώντας σε αποκατάσταση της βλάβης των β-παγκρεατικών κυττάρων, βελτίωσης της σηματοδότησης της ινσουλίνης, την αντιοξειδωτική τους προστασία[38] και την μείωση της αυξημένης γλυκογονόλυσης.



Εικόνα 1.13 Χημικές δομές μορίων κουμαρίνης. *Aumbelliferone, Esculetin, Fosthole*. [38]

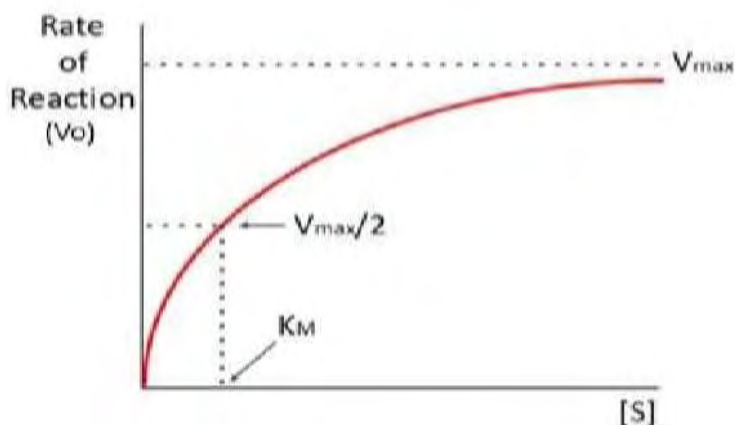
### 1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

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. Πριν από περίπου 100 χρόνια οι Michaelis και Menten δημοσίευσαν την, κλασική πλέον δημοσίευση, μέσα από την οποία έδειξαν ότι ο ρυθμός μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten, είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, όπως δείχνεται και από την εξίσωση Michaelis-Menten, χρησιμοποιώντας την ιμπερτάση ως ένζυμο για τις μελέτες τους [39]. Σύμφωνα με το μοντέλο των Michaelis-Menten το ένζυμο (E) αντιδρά με το υπόστρωμα (S) και σχηματίζουν το ενδιάμεσο σύμπλοκο ES. Το ES είτε θα ξαναδώσει E και S είτε θα σχηματίσει το ένζυμο και το προϊόν (P).



Όπου  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ , οι σταθερές των αντίστοιχων αντιδράσεων [40]

Η γραφική παράσταση της εξίσωσης Michaelis-Menten είναι μία υπερβολή (εικόνα 1.14).



**Εικόνα 1.14** 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, όπου δείχνεται ότι η μέγιστη ταχύτητα  $V_{max}$  προσεγγίζεται ασυμπτωτικά. Η σταθερά  $K_M$  είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας  $V_{max}/2$ .

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος  $[S]$  η αρχική ταχύτητα ( $V_0$ ) αυξάνεται γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Σε υψηλές συγκεντρώσεις  $S$  όλα τα μόρια του ενζύμου είναι με τη μορφή συμπλόκου (κορεσμός) και η ταχύτητα τείνει στη μέγιστη τιμή ( $V_{max}$ ). Η μαθηματική σχέση που εξηγεί την κινητική των ενζύμων είναι η εξής:

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

Η  $K_M$  ονομάζεται **σταθερά Michaelis-Menten** και ισούται με:

$$K_M = \frac{k_3 + k_2}{k_1}$$

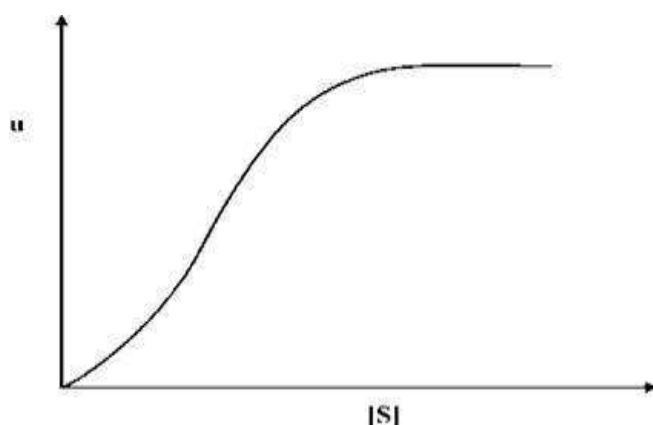
Η  $K_M$  αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά για κάθε ένζυμο. Είναι μέτρο της σταθερότητας του συμπλόκου  $ES$  και εκφράζει τον βαθμό συγγένειας ενζύμου – υποστρώματος. Χαμηλές τιμές  $K_M$  φανερώνουν μεγάλη συγγένεια, ενώ υψηλές τιμές  $K_M$  μικρή συγγένεια ενζύμου – υποστρώματος, χαμηλή συγγένεια. Μετράται με μονάδες συγκέντρωσης ( $\text{mol/L}$ ). Η τιμή της ισούται αριθμητικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος για την οποία έχουμε το μισό της μέγιστης ταχύτητας ( $K_M = V_{max}/2$ ), [21].

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  $K_M$ ,  $V_0 = (V_{max}/K_M)/[S]$ , δηλαδή η ταχύτητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η  $[S]$  είναι πολύ μεγαλύτερη από την  $K_M$ ,  $V_0 = V_{max}$ , δηλαδή η ταχύτητα είναι μέγιστη, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, [21].

### 1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα και κινητικές μελέτες

Οι κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων δεν μπορούν να εξηγηθούν με το μοντέλο Michaelis-Menten. Μια σημαντική ομάδα ενζύμων τα οποία δεν υπακούουν στην κινητική Michaelis-Menten περιλαμβάνει τα αλλοστερικά ένζυμα. Τα αλλοστερικά ένζυμα αποτελούνται από δύο ή περισσότερες πεπτιδικές αλυσίδες με ένα ή περισσότερα ενεργά κέντρα η καθεμία. Έχουν τουλάχιστον δύο θέσεις δέσμευσης, το ενεργό κέντρο που δεσμεύεται το υπόστρωμα και μία τουλάχιστον περιοχή στην οποία δεσμεύεται το μόριο ρυθμιστής. Τα αλλοστερικά κέντρα εμφανίζουν συχνά σιγμοειδείς γραφικές παραστάσεις της ταχύτητας της αντίδρασης και  $V_0$  σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , παρά ορθογώνιες υπερβολές που προβλέπονται από την εξίσωση Michaelis-Menten.



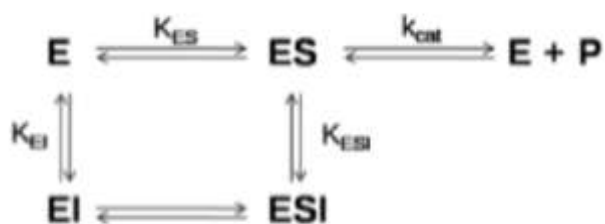
**Εικόνα 1.15** Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου. Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν σιγμοειδή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, [21]

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. 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, [21].



### 1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Μερικοί μη αντιστρεπτοί αναστολείς είναι γνωστά φάρμακα. Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από ένα ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδέσει υπόστρωμα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI) αλλά όχι και τα δύο (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ως εκ τούτου, το υπόστρωμα εμποδίζεται από το να προσδεθεί στο ίδιο ενεργό κέντρο. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Σε μια οποιαδήποτε συγκέντρωση του αναστολέα, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το υπόστρωμα συναγωνίζεται τον αναστολέα για το ενεργό κέντρο. Στη συναγωνιστική αναστολή η  $V_{max}$  παραμένει ανεπηρέαστη, αλλά η φαινομενική  $K_M$  αυξάνεται. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδέονται ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου σε διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Στην περίπτωση αυτή η  $K_M$  παραμένει σταθερή ενώ η  $V_{max}$  μειώνεται.



**Εικόνα 1.16 :** Διάγραμμα αναστολής ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Τα  $K_{ES}$ ,  $K_{EI}$ ,  $K_{ESI}$ , αποτελούν τις σταθερές διάστασης. Το ESI θεωρείται ότι είναι ανενεργό. [41]

Η εξίσωση Michaelis-Menten δίνεται από τη σχέση:  $V_o = V_{max}[S]/[s] + K_M$

Αν γραφεί με τη μέθοδο του διπλού αντιστρόφου τότε προκύπτει:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

Η σταθερά Michaelis-Menten  $K_M$  προσδιορίζεται συνήθως με τη μέθοδο των Lineweaver και Burk. 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 σταθερά αναστολής  $K_i$ , δηλαδή η σταθερά ισορροπίας μεταξύ του ενζύμου και ενός συναγωνιστικού αναστολέα που συνδέεται με αντιστρεπτό τρόπο, υπολογίζεται βασιζόμενοι στις εξίσωση των Michaelis-Menten για ένα συναγωνιστικό σύστημα:

$$1 + \frac{V S}{K_M (1 + \frac{I}{K_I}) + S}$$

Όπου [i] η συγκέντρωση του αναστολέα, [35].

### 1.6.3 Υπολογισμός IC50

Για ένα φάρμακο, η IC50 αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός φαρμάκου που απαιτείται για να προκληθεί 50% αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας του στοχευόμενου ενζύμου *in vitro* [42].

## 2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Αντιδραστήρια

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Εταιρεία</b>
Acetic acid (CH <sub>3</sub> 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
BES Sigma Bis acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	New Englan Biolabs

Bradford protein assay 5x	Biorad
Bromophenole blue	Researc 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 <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Imidazole 99%	Sigma
Inosine Monophosphate (IMP)	Sigma
KHCO <sub>3</sub> Merck L-Ascorbic acid	Sigma
NaOH	Merck
Potassium chloride (KCl)	Merck
SDS	Serva
Sodium carbonate anhydrous	sds
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra Pure	Applichem
Zinc acetate	Sigma
α-D-glucose-1-Phosphate	Sigma
β-GP	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Πυκνό διάλυμα αμμωνίας	Fluka

## 2.2 Οργανολογία

<b>Όργανο</b>	<b>Εταιρεία</b>
Φυγόκεντρος - Z36HK	HermLe
Πεχάμετρο	Metrohm
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρηση (mini gel)	BioRad
Υδατόλουτρο, WiseBath	Wisd
Φωτόμετρο	VWR
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.45 μM	Sartorius Stedim
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.2 μM	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 30000 cut-off	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 10000 cut-off	Sartorius Stedim
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma

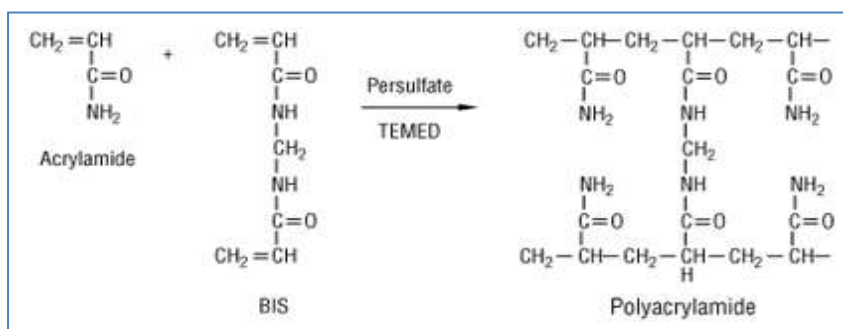
## 2.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών-Πηκτώματα

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία απλή τεχνική η οποία σχετίζεται με τη μελέτη και τον καθαρισμό πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, παρέχει πληροφορίες για το μοριακό βάρος, το φορτίο, τον ολιγομερισμό και την καθαρότητα μια πρωτεΐνης. Η τεχνική αυτή μπορεί να διαχωρίσει πολυπεπτίδια που διαφέρουν κατά λίγες εκατοντάδες *daltons* στο μοριακό τους βάρος και κατά 0.1 μονάδα του pH στο ισοηλεκτρικό τους σημείο αφού παρέχει την υψηλότερη ανάλυση από όλες τις διαθέσιμες μεθόδους διαχωρισμού. Η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει πολλές τεχνικές με την ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*) να αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο. Η μέθοδος *SDS-PAGE* είναι απλή και αξιόπιστη και εφαρμόζεται συχνά στα κλάσματα που προέρχονται από τη χρωματογραφία πρωτεϊνών ή από άλλες διαδικασίες καθαρισμού. Για την εφαρμογή της μεθόδου απαιτείται η αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις επιμέρους τους πολυπεπτιδικές αλυσίδες έτσι ώστε κάθε συστατικό να διατρέξει στο πήκτωμα και να διαχωριστεί με βάση το μοριακό του βάρος. Βέβαια, σε αυτή την περίπτωση επειδή δεν διατηρείται η βιολογική δραστηριότητα των πρωτεϊνών περιορίζεται και η πληροφορία που μπορεί να προσφέρει η μέθοδος. Γι' αυτό το λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε μη αποδιατακτικές συνθήκες (*native page*). Άλλες τεχνικές ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικής εστίασης (*IEF*) στην οποία οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το φορτίο τους και η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (*2D*) η οποία προσδιορίζει σε μεγάλο βαθμό την καθαρότητα ενός πρωτεϊνικού δείγματος συνδυάζοντας τόσο την *SDS-PAGE* όσο και την *IEF* μέθοδο. Η αρχή της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην ελεγχόμενη κίνηση των σωματιδίων σε ηλεκτρικά πεδία. Οι πρωτεΐνες είναι φορτισμένα μόρια και μετακινούνται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικών πεδίων. Οι πιο σημαντικές φυσικές τους ιδιότητες είναι οι ηλεκτροφορητικές τους κινητικές ικανότητες και τα ισοηλεκτρικά τους σημεία. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα, ενώ το ισοηλεκτρικό σημείο εξαρτάται μόνο από το φορτίο. Οι πρωτεΐνες ως επαμφοτερικά μόρια μπορούν να φέρουν θετικό, αρνητικό ή καθόλου φορτίο ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται. Για κάθε πρωτεΐνη υπάρχει ένα συγκεκριμένο pH στο οποίο το φορτίο της είναι μηδενικό. Αυτό το pH ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο ή *pI*. Μία πρωτεΐνη είναι θετικά φορτισμένη σε διαλύματα με pH χαμηλότερο του *pI* της και αρνητικά φορτισμένη σε διαλύματα με pH υψηλότερο του *pI* της. Αυτή η εξάρτηση του φορτίου από το pH επηρεάζει την κινητικότητα των πρωτεϊνών και την κατεύθυνση της μετακίνησης τους στο πήκτωμα. Το βασικό στοιχείο της ηλεκτροφόρησης είναι το πήκτωμα, μιας και αυτό είναι που καθορίζει κυρίως την ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εκτός από το φορτίο τους και τις σταθεροποιεί στη συγκεκριμένη θέση μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ώστε να οπτικοποιηθεί στη συνέχεια με χρώση του πηκτώματος. Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται κυρίως πολυακρυλαμίδη αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η αγαρόζη για πρωτεΐνες με μέγεθος μεγαλύτερο από 500 kDa. Τα

πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι ιδανικά για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών επειδή φέρουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- i. Είναι δυνατόν να παρασκευαστεί πήκτωμα με διαφορετικό μέγεθος πόρων, για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών.
- ii. Η αντίδραση πολυμερισμού είναι εύκολη.
- iii. Το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από τις συνθήκες πολυμερισμού και μπορεί εύκολα να μεταβληθεί αλλάζοντας τη συγκέντρωση του μονομερούς.
- iv. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι υδρόφιλα και ηλεκτρικά ουδέτερα τη στιγμή που παρασκευάζονται.
- v. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι διάφανα στο φως σε μήκη κύματος πάνω από 250 nm και δεν προσδέχουν χρωστικές των πρωτεϊνών

Για τον σχηματισμό του πηκτώματος, αναμιγνύονται το ακρυλαμίδιο με το *N'-N'methylbisacrylamide (bis)* τα οποία ξεκινούν να συν-πολυμερίζονται παρουσία ελευθέρων ριζών. Τα μονομερή του ακρυλαμιδίου πολυμερίζονται σε μακριές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με το μόριο *bis* ακρυλαμιδίου. Έτσι προκύπτει μια δομή η οποία έχει τόσο στερεά όσο και υγρά συστατικά. Αποτελείται από μία μάζα άκαμπτων ινών που δημιουργούν ένα δίκτυο με χώρους, που είναι βυθισμένα σε υγρό (διαλύτης). Οι ίνες αυτές συγκρατούν τον διαλύτη στο εσωτερικό του πηκτώματος ενώ ο διαλύτης διατηρεί το τρισδιάστατο σχήμα του πηκτώματος. Απουσία του υγρού το πήκτωμα θα στεγνώσει σε μια λεπτή μεμβράνη.



Το πιο διαδεδομένο σύστημα ηλεκτροφόρησης είναι η μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής που ανακαλύφθηκε από το Laemmli (1970) όπου το SDS αποτελεί το κύριο συστατικό της πηκτής. Η κατασκευή όπου θα δημιουργηθεί η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου είναι μια κάθετη διάταξη 2 τζαμιώντα οποία στην συγκεκριμέναπέχουν μεταξύ τους 1 mm. Οι θέσεις υποδοχής του δείγματος (ή πηγάδια) δημιουργούνται με την προσθήκη μιας χτένας που δημιουργεί τα πηγάδια κατά την πήξη της πηκτής επιστοίβαξης. Ο διαχωρισμός στην πηκτή SDS βασίζεται στο μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο

πήκτωμα αυξάνεται γραμμικά από πάνω προς τα κάτω με αποτέλεσμα το μέγεθος των πόρων να μειώνεται όσο μεγαλώνει η απόσταση στο πήκτωμα. Έτσι οι μικρότερες πρωτεΐνες κινούνται γρηγορότερα και περισσότερο, ενώ οι μεγαλύτερες κινούνται πιο αργά, καθώς το μεγαλύτερο μέγεθος αυξάνει την τριβή και μειώνει την κινητικότητα

Μόλις παρασκευαστεί η πηκτή τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (runningbuffer: 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS) το οποίο πρέπει να είναι σε επαφή με την πηκτή σε όλο της το μήκος και πλάτος. Τα δείγματα προετοιμάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4x έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραίωση των δειγμάτων να είναι 1x (10 % (v/v) glycerol, 154 mM Tris-HCl, 2 % w/v SDS, 0.01 % w/v bromophenolblue, 1.25 % v/v  $\beta$ -Mercaptoethanol). Στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5 min σε θερμοκρασία 95-98 °C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια, ενώ παράλληλα σε ένα από αυτά φορτώνεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. 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 1 φαίνεται η σύσταση για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης σε διαφορετικές πυκνότητες.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ (% πυκνότητα)			
		10%	12%
	ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ (3mL)	ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (5mL)	
dH <sub>2</sub> O	2,1	1,9	1,6
30% Acrylamide- mix	0,5	1,7	2.0
Tris 1.5 M, pH8.8	-	1,3	1,3
Tris 1.0 M, pH 8.8	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 1:** Αναλογία συστατικών για την παρασκευή πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου διαφορετικής πυκνότητας

Σε ένα εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο οι πρωτεΐνες, οι οποίες είναι πια αρνητικά φορτισμένες λόγω και του SDS, κινούνται προς τη θετική άνοδο με διαφορετικούς ρυθμούς ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Συνήθως, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω,

χρησιμοποιείται η μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής του Laemmli, όπου το ρυθμιστικό διάλυμα στο πήκτωμα και στη δεξαμενή είναι διαφορετικά. Το σύστημα αποτελείται από το πήκτωμα επιστοιβάξης που έχει pH 6.8 (Tris-HCl, pH 6.8) το πήκτωμα διαχωρισμού με pH 8.8 (Tris-HCl, pH 8.8) και το διάλυμα ηλεκτροδίου με pH 8.3 (Tris-Glycine pH 8.3). Πρέπει να επισημανθεί ότι η γλυκίνη μπορεί να είναι θετικά, ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένη, ανάλογα με το pH. Όταν η ισχύς είναι ενεργοποιημένη, τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα γλυκίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων pH 8.3 αναγκάζονται να εισέλθουν στο πήκτωμα, όπου το pH είναι 6.8. Σε αυτό το περιβάλλον, η γλυκίνη μεταβαίνει κυρίως στην ουδέτερα φορτισμένη κατάσταση. Αυτή η απώλεια φορτίου τους αναγκάζει να μετακινούνται πολύ αργά στο ηλεκτρικό πεδίο. Τα ιόντα Cl<sup>-</sup> (από το Tris-HCl), από την άλλη, κινούνται πολύ πιο γρήγορα στο ηλεκτρικό πεδίο και σχηματίζουν ένα μέτωπο ιόντων που μεταναστεύει μπροστά από τη γλυκίνη. Ο διαχωρισμός του Cl<sup>-</sup> από το ιόν Tris (που κινείται τώρα προς την άνοδο) δημιουργεί μια στενή ζώνη που τραβάει τη γλυκίνη πίσω από αυτό, με αποτέλεσμα δύο στενά διαχωρισμένα μέτωπα μεταναστευτικών ιόντων, τα οποία είναι το εξαιρετικά κινητικό μέτωπο Cl<sup>-</sup>, ακολουθούμενο από το πιο αργό, κυρίως ουδέτερο μέτωπο γλυκίνης. Όλες οι πρωτεΐνες στο δείγμα πηκτώματος έχουν ηλεκτροφορητική κινητικότητα που είναι ενδιάμεση της κινητικότητας της γλυκίνης και του Cl<sup>-</sup>, και έτσι οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται στη στενή ζώνη μεταξύ του Cl<sup>-</sup> και γλυκίνης. Αυτό συνεχίζεται μέχρι να φτάσουν στο σημείο του πηκτώματος, όπου το pH είναι 8.8. Σε αυτό το pH τα μόρια γλυκίνης είναι ως επί το πλείστον αρνητικά φορτισμένα και μπορούν να μεταναστεύσουν πολύ γρηγορότερα από τις πρωτεΐνες. Έτσι, το μέτωπο γλυκίνης επιταχύνει αφήνοντας πίσω του τις πρωτεΐνες. Το αποτέλεσμα είναι ότι οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε μία πολύ στενή ζώνη ανάμεσα στο πήκτωμα επιστοιβάξης και στο πήκτωμα διαχωρισμού και δεδομένου ότι η πηκτή διαχωρισμού έχει αυξημένη συγκέντρωση ακρυλαμίδιου, η οποία επιβραδύνει την κίνηση των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους, αρχίζει ο διαχωρισμός[43].

### 2.3.1 Χρώση πηκτώματος

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε 10% v/v διάλυμα οξικού οξέος μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 λεπτό. Το διάλυμα οξικού οξέος αποχύνεται και προστίθεται το διάλυμα χρώσης το οποίο περιέχει 0.1 % w/vCoomassieBlueR250, 10 % v/vοξικό οξύ και 50 % v/vμεθανόλη. Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται και πάλι στο φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό και αφήνεται να αναδευτεί για 10 λεπτά. Μετά το πέρας των 10 λεπτών αποχύνεται το διάλυμα χρώσης και προστίθεται ξανά διάλυμα οξικού οξέος 10% v/v. Ακολουθεί ξανά βράσιμο σε φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό και το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται 3-5 φορές. Τέλος το πήκτωμα μένει με διάλυμαοξικού οξέος 10 % v/v μέχρι να απομακρυνθεί εντελώς ο θόρυβος που προκαλεί η χρώση με CoomassieBlue.

## 2.4 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών-Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για να μετρήσει την ολική ποσότητα πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Αρχή αυτής της μεθόδου είναι η δέσμευση των μορίων της πρωτεΐνης στη χρωστική Coomassie κάτω από όξινες συνθήκες κάτι το οποίο οδηγεί σε αλλαγή του χρώματος από καφέ σε μπλε. Αυτή η μέθοδος ουσιαστικά μετράει την παρουσία των αμινοξέων αργινίνη, λυσίνη και ιστιδίνη τα οποία συμβάλλουν στο σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής Coomassie, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση 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. Στη συνέχεια τα διαλύματα αναδεύονται και αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολούθως αναδεύονται και γίνεται φασματοφωτομέτρηση σε μήκος κύματος 595 nm, ενώ τέλος υπολογίζεται η συγκέντρωση τους με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης.

## 2.5 Καθαρισμός γλυκογόνου από νουκλεοτίδια

Με χρήση πλαστικών σωλήνων τύπου falcon διαλυτοποιήθηκαν 22.5 g γλυκογόνου σε όγκο 450 mL απιονισμένου ύδατος υπό ανάδευση με γυάλινη ράβδο. Στο διάλυμα προσθέσαμε 1 g ζωάνθρακα και ακολούθησε ανάδευση για 10 min με γυάλινη ράβδο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση του διαλύματος στις 4225 g σε θερμοκρασία 8 °C για 10 min. Η διαδικασία επεξεργασίας με ζωάνθρακα επαναλήφθηκε δύο φορές. Μετά τις φυγοκεντρήσεις φιλτράραμε το υπερκείμενο διάλυμα με συσκευή διήθησης υπό κενό. Το διήθημα αφού τοποθετήθηκε σε πάγο και προστέθηκε 1.5 όγκος απόλυτης αιθανόλης (όγκος αιθανόλης = όγκος διαλύματος γλυκογόνου × 1.5) έμεινε σε πάγο για 15 min. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 4225 g, σε θερμοκρασία 4 °C για 10 min. Το υπερκείμενο αποχύθηκε, φιλτράραμε το ίζημα υπό κενό και στη συνέχεια το ξεπλύναμε με απόλυτη αιθανόλη. Το ίζημα λυοφιλοποιήθηκε (16 ώρες περίπου), ζυγίσαμε το γλυκογόνου και προσθέσαμε ανάλογο όγκο απιονισμένου ύδατος ώστε να προκύψει διάλυμα 10 % w/v. Η αποθήκευση του διαλύματος γλυκογόνου έγινε στους -20 °C.



## 2.6 Απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου **rmGPb**

Η απομόνωση του ενζύμου **rmGPb** (**rabbit muscle Glycogen Phosphorylase b**) από σκελετικούς μύες αρσενικών κονίκλων πραγματοποιήθηκε με τροποποίηση της μεθόδου Fisher & Krebs (Methods in Enzymology Vol V, p. 369-373, 1962). Έτσι, σε όλα τα στάδια καθαρισμού χρησιμοποιήσαμε β-μερκαπτο-αιθανόλη αντί L-κυστεΐνης.

### ΥΛΙΚΑ

- ✓ 3 αρσενικοί κόνικλοι
- ✓ Διάλυμα οξικού οξέος  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1 N
- ✓ Κεκορεσμένο διάλυμα  $\text{KHCO}_3$
- ✓ Διάλυμα 90 % w/v  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 6.8
- ✓ Διάλυμα Tris 2.0 M
- ✓ Μεμβράνες διαπίδυσης (οιοποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% w/v  $\text{NaCO}_3$  και 10mMEDTA στους 100°C, συνεχίσει εκπλύσεις με απιονισμένου δωρπριναπό τη χρήση τους και φυλάσσονται σε καθαρό ή αλκοόλη στους 4°C )
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα Tris [τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου]/HCl 0.001 M] (pH 7.5)
- ✓ Διάλυμα 0.3 M 2-μερκαπτο-αιθανόλης pH 7.0
- ✓ Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1 M, pH 7.0
- ✓ Διάλυμα οξικού οξέος  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1 N
- ✓ Διάλυμα AMP (5'-φωσφορική αδενοσίνης) 0.1 M, pH 7.0
- ✓ Διάλυμα  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ , 1.0 M pH 7.0
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου **50:50:1**, pH 6.8 (**50mM β-φωσφογλυκερόλης, 50mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 1mMEDTA**)
- ✓ Γλυκερόλη 100 %

### ΟΡΓΑΝΑ

- ✓ Φυγόκεντρος
- ✓ Πεχάμετρο
- ✓ Φασματοφωτόμετρο
- ✓ Συσκευή διήθησης
- ✓ Χρονόμετρο
- ✓ Αναλυτικός ζυγός

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### 1ο Βήμα

---

#### Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος

---

Αφαιρέθηκε μυϊκός ιστός από τα πίσω πόδια καθώς και από τους ραχιαίους μυς κοντά στη σπονδυλική στήλη από 3 αρσενικούς κονίκλους και ο μυϊκός ιστός τοποθετήθηκε αμέσως σε πάγο. Ο μυϊκός ιστός ομογενοποιήθηκε σε κρεατομηχανή, ζυγίστηκε και επανατοποθετήθηκε σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η άλεση όλου του ιστού. Ακολούθησαν 3 εκχυλίσεις του ομογενοποιημένου με απιονισμένο ύδωρ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία. Ο συνολικός χρόνος εκχύλισης δεν ξεπέρασε τα 30 min. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για να "σπάσουν" τα ζωικά μυϊκά κύτταρα και έτσι να βγει η rmGPb απ' αυτά καθώς και για την απομάκρυνση λίπους, στερεών ουσιών κ.λ.π

#### 1<sup>η</sup> Εκχύλιση (10 min)

- Μυϊκό ομογενοποιημένο + ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος (2173,2 mL απιονισμένο ύδωρ) επί **8 min**
- Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

#### 2<sup>η</sup> Εκχύλιση (10 min)

- Κιμάς από την 1η εκχύλιση + ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος (2173,2 mL απιονισμένο ύδωρ) επί **8 min**
- Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

#### 3<sup>η</sup> Εκχύλιση (10 min)

- Ομογενοποιημένο από την 2η εκχύλιση + μίσος όγκος απιονισμένου ύδατος (1086,6 mL απιονισμένο ύδωρ) επί **8 min**
- Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

Ακολούθως το εκχύλισμα που παραλήφθηκε διηθήθηκε (στον πάγο) με υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών.

### 2ο Βήμα

---

## Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον

---

Ρυθμίστηκε το pH του ψυχρού εκχυλίσματος σε τιμή 5.15 με προσθήκη 1 N CH<sub>3</sub>COOH υπό ελαφρά ανάδευση (το εκχύλισμα δεν χρειάζεται να βρίσκεται σε πάγο κατά τη ρύθμιση του pH). Σε αυτό το σημείο η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνει κατά τη ρύθμιση του pH εξαιτίας της κατακρήμνισης διάφορων πρωτεϊνών. Αφήσαμε το εκχύλισμα σε πάγο για 5 min. Ύστερα το εκχύλισμα τοποθετήθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρησης, ισοζυγίστηκε και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 - 4 °C σε 4.225 rcf (ή 5000 rpm) επί 30 min για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που καταβυθίστηκαν. Έπειτα το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί Buchner εν ψυχρώ για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Η συσκευή διήθησης αποτελείται από χωνί Buchner, κωνική φιάλη δύο λίτρων η οποία πρέπει να βρίσκεται μέσα σε μία λεκάνη με πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της διήθησης, λαστιχάκι συνδεδεμένο με την αντλία κενού και χάρτινα φίλτρα διαμέτρου 18.5 cm. Η διαδικασία ξεκινά με την τοποθέτηση δύο χάρτινων φίλτρων στο χωνί Buchner και τη δημιουργία κενού με την λειτουργία της αντλίας κενού. Σταδιακά μικροί όγκοι εκχύνονται από τα δοχεία της φυγοκέντρου στο χωνί Buchner. Τα χάρτινα φίλτρα αλλάζουν μετά την απόχυση του περιεχομένου δύο δοχείων της φυγοκέντρου στο χωνί Buchner. Όταν ο όγκος του διαλύματος μέσα στην φιάλη γίνει περίπου 1.5 L αφαιρείται πρώτα το λάστιχο που συνδέει την κωνική φιάλη με την αντλία κενού ώστε να αποφευχθεί αναρρόφηση και ο όγκος του υγρού μετράται με ογκομετρικό κύλινδρο και φυλάσσεται σε δοχείο των 20 L εν ψυχρώ. Η διήθηση με τη χρήση της συσκευής Buchner συνεχίζεται για το συνολικό όγκο του πρωτεϊνικού διαλύματος. Το pH του διηθήματος ρυθμίστηκε στη τιμή 6.8 (ισοηλεκτρικό σημείο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου) με τη χρήση του κεκορεσμένου διαλύματος KHCO<sub>3</sub> και το διήθημα ογκομετρήθηκε. **(ΔΕΙΓΜΑ Α για SDS – PAGE)**

## 3ο Βήμα

---

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

---

Ογκομετρήθηκε ο απαιτούμενος όγκος θειικού αμμωνίου (=0.837 X όγκος εκχυλίσματος ο οποίος ήταν 4910 mL) προκειμένου να πραγματοποιηθεί η καταβύθιση του ενζύμου rmGP. Έπειτα ρυθμίστηκε το pH του διαλύματος θειικού αμμωνίου σε 6.8 με την προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνής αμμωνίας (NH<sub>4</sub>OH, 78 mL). Ο έλεγχος του pH γίνεται με πεχαμετρικό χαρτί και η ρύθμιση στον απαγωγό. Το διάλυμα του θειικού αμμωνίου (4175 mL) προστέθηκε στο πρωτεϊνικό διάλυμα αργά και με συνεχή ανάδευση και το διάλυμα παρέμεινε στον ψυκτικό θάλαμο, 4°C για 24 hrs. Παράλληλα 20 λίτρα απιονισμένου ύδατος ψύχονται στο ψυκτικό θάλαμο για την παρασκευή του διαλύματος διαπίδυσης την επόμενη ημέρα. Έπειτα ακολούθησε η προετοιμασία των μεμβρανών διαπίδυσης.

- ◆ Κόψαμε το απαιτούμενο μήκος μεμβράνης. Έπειτα ζυγίσαμε 6.5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 2.44 g EDTA για την προετοιμασία 650 mL διαλύματος και τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετήθηκαν στο παραπάνω διάλυμα. Ακολούθησε βρασμός για 30 min και τα σακουλάκια ξεπλύθηκαν πολύ καλά με απιονισμένο ύδωρ. Στη συνέχεια τοποθετήσαμε τα σακουλάκια διαπίδυσης σε απιονισμένο ύδωρ και τα αφήσαμε να βράσουν για 30 min. Αφού ξεπλύθηκαν πολύ καλά φυλάχθηκαν σε διάλυμα (20 % v/v) αιθανόλης στους 4°C

Μετά το πέρας των 24 ωρών παρατηρήσαμε ότι το πρωτεϊνικό διάλυμα έγινε διφασικό (2 φάσεις: υπερκείμενο-ίζημα) και έτσι το υπερκείμενο διάλυμα αποχύθηκε με τη χρήση αντλίας και συλλέχθηκε το ίζημα με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 5110 rcf επί 40 min με τη χρήση της μεγάλης κεφαλής. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα αποχύθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου. **(ΔΕΙΓΜΑ Βγια SDS – PAGE)**

Ακολούθησε προετοιμασία ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001 M pH 7.5 όγκου 2 λίτρων

- ◆ 10 ml διαλύματος Tris 2 M αραιώθηκαν με απιονισμένο ύδωρ σε όγκο 400 mL(συγκέντρωση περίπου 50 mM). Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στη τιμή 7.5 με τη χρήση διαλύματος 1 N HCl. Το διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται σε τελικό όγκο 20 L με τη χρήση του απιονισμένου ύδατος που έχει ψυχθεί.

Οι μεμβράνες διαπίδυσης ξεπλύθηκαν με απιονισμένο ύδωρ για την απομάκρυνση του αιθανολικού διαλύματος στο οποίο φυλάσσονται. Ύστερα το διαλυτοποιημένο ένζυμο τοποθετήθηκε στις μεμβράνες διαπίδυσης οι οποίες εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001 M, pH 7.5 στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα (υπό ανάδευση).

#### **4ο Βήμα**

---

##### **Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH**

---

Μετά τη διαπίδυση το πρωτεϊνικό διάλυμα συλλέχθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο και ακολούθησε διαύγαση με φυγοκέντρηση στις 34540 g για 15 min σε θερμοκρασία 0-4 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα ογκομετρήθηκε. Έπειτα προστέθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

-Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M, pH 7.0, όγκου ίσου με το 3/27 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος →  $95 \text{ mL} \times \frac{3}{27} = 10,56 \text{ mL}$

$10,56 \text{ mL} + 95 \text{ mL} = 105,6 \text{ mL}$  πρωτεϊνικού διαλύματος συνολικά

-EDTA 0.1 M, pH 7.0 με όγκο ίσο με  $5 \cdot 10^{-3}$  του πρωτεϊνικού διαλύματος μετά την προσθήκη της β-μερκαπτοαιθανόλης  $\rightarrow 105,6 \text{ mL} \times 5 \cdot 10^{-3} = 0,527 \text{ mL}$  ή 527  $\mu\text{L}$

-Διάλυμα *Tris* 2 M ώστε το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος να γίνει 8.8. Η προσθήκη γίνεται αργά και υπό ανάδευση και το pH μετρήθηκε με πεχάμετρο. **(ΔΕΙΓΜΑ ΓΙΑ SDS – PAGE)**

Στη συνέχεια το μίγμα επώαστηκε στους 37 °C επί 1 hr με ταυτόχρονη ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα (ήπια ανακίνηση και όχι με ράβδο) και το αφήσαμε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου (~ 10 – 15 min). Έπειτα ρυθμίστηκε το pH σε τιμή 7.0 με τη χρήση διαλύματος  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1 N. Ακολούθησε διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 34.540 rcf επί 10 min (25-30 °C) με τη χρήση της μικρής κεφαλής. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο ογκομετρήθηκε. **(ΔΕΙΓΜΑ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ SDS – PAGE)**

## 5ο Βήμα

---

### Κρυστάλλωση & Ανακρυστάλλωση της gmGPb

---

Για την κρυστάλλωση του ενζύμου προστέθηκαν τα εξής διαλύματα:

-Διάλυμα *AMP* 0.1 M, pH 7.0 στο υπερκείμενο με όγκο ίσο με  $10^{-2}$  του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος  $\rightarrow 10^{-2} \times$

-Διάλυμα  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ , pH 7.0 στο υπερκείμενο με όγκο ίσο με  $10^{-2}$  του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος  $\rightarrow 10^{-2} \times$

{Το *AMP* και το  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$  βοηθούν στη κρυστάλλωση του ενζύμου}

Στη συνέχεια τοποθετήσαμε το διάλυμα σε μικρούς σωλήνες φυγοκέντρησης, ισοζυγίσαμε και τους τοποθετήσαμε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα για να γίνει η κρυστάλλωση (οι κρύσταλλοι αρχίζουν να φαίνονται σε 1-2 h). Την επόμενη ημέρα οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf σε θερμοκρασία 0 – 4 °C επί 10 min με τη χρήση της μικρής κεφαλής. Η θερμοκρασία της φυγοκέντρου ρυθμίστηκε στους 25-30 °C. Έπειτα το κρυσταλλικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 pH 6.8 σε θερμοκρασία 30 °C εντός του υδατόλουτρου. Ακολούθησε διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf επί 10 min (25-30°C) με τη χρήση της μικρής κεφαλής και το υπερκείμενο ενζυμικό υγρό ογκομετρήθηκε. Στη συνέχεια προστέθηκαν τα εξής διαλύματα:

-Διάλυμα AMP 0.1 M, pH 7.0 στο υπερκείμενο με όγκο ίσο με  $10^{-2}$  του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος  $\rightarrow 10^{-2} \times$

-Διάλυμα  $(CH_3COO)_2Mg$ , pH 7.0 στο υπερκείμενο με όγκο ίσο με  $10^{-2}$  του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος  $\rightarrow 10^{-2} \times$

Το διάλυμα που προέκυψε τοποθετήθηκε σε μικρά tubes φυγοκέντρωσης, ισοζυγίστηκε και το τοποθετήθηκε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 hrs. **ΔΕΙΓΜΑ Ε για SDS – PAGE** Πραγματοποιήθηκε επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας (1η ανακρυστάλλωση) ακριβώς με ίδιο τρόπο ύστερα από 3-4 ώρες και έτσι έλαβε χώρα η 2η ανακρυστάλλωση και το μίγμα τοποθετήθηκε για μία νύκτα στον ψυκτικό θάλαμο. **ΔΕΙΓΜΑ ΣΤ για SDS – PAGE** Η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης που περιγράφηκε προηγουμένως επαναλήφθηκε (1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση) και έτσι έλαβε χώρα η 3<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση **ΔΕΙΓΜΑ Ζ για SDS – PAGE**. Ακολούθησε επανάληψη της προηγούμενης διαδικασίας (1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση) για δύο ακόμα φορές χωρίς όμως την προσθήκη AMP και  $(CH_3COO)_2Mg$ . **ΔΕΙΓΜΑ Η & Θ για SDS – PAGE**. Στο τελικό ενζυμικό διάλυμα έγινε φωτομετρικά ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης β ως ακολούθως:

5 μL ενζυμικού δείγματος + 1300μL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 και φωτομέτρηση σε μήκη κύματος 280 nm και 260 nm. Η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίστηκε από τη σχέση:

$$(OD_{280}/1.32) \times (1305/5) = [GPb], \text{ mg/mL}$$

Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ( $\epsilon$ ) για την rmGPb ισούται με 1.32.

$$C_{GPb} = 136.4 \text{ mg/ml ή } 1.06 \text{ g}$$

Το ενζυμικό διάλυμα ογκομετρήθηκε, προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης (100%) και το αποθηκεύσαμε στους  $-20^\circ\text{C}$ .

## 2.7 Κινητικές μελέτες έναντι της Φωσφορυλάσης του γλυκογόνου GP

Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση είναι αμφίδρομη. Στις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήσαμε *in vitro* με τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου μελετήσαμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, προς τη σύνθεση του γλυκογόνου, την ενσωμάτωση, δηλαδή, της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο ώστε να προκύψει γλυκογόνο με ένα περισσότερο κατάλοιπο γλυκόζης με παράλληλη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων από τη G1P. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετρηθούν φωτομετρικά ώστε να ποσοτικοποιηθούν [43]. Οι κινητικές μελέτες έγιναν στην rmGPb.

### **2.7.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φωσφορικών ιόντων**

Η αρχή της μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων βασίζεται στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό φωσφορικών ιόντων, με τη δημιουργία χρωμοφόρου συμπλόκου ένωσης. Η μέθοδος είναι απλή και δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα με τη χρήση ενός καλού φασματοφωτόμετρου. Είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό αντιδράσεων απελευθέρωσης ορθοφωσφορικών ιόντων καθώς και για τον προσδιορισμό της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Συγκεκριμένα,

Γίνεται παρασκευή των διαλυμάτων:

- Μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100 mM οξικού ψευδαργύρου. Το pH του μίγματος ρυθμίστηκε στο 5.0 με πυκνό HCl και φυλάξαμε το διάλυμα σε αδιαφανές μπουκάλι και μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH έγινε με πυκνό NaOH και φυλάξαμε το διάλυμα σε αδιαφανές μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα ασκορβικού οξέος παρασκευάζεται κάθε φορά φρέσκο.

Αφού ετοιμάστηκαν τα δύο διαλύματα και έγινε η ρύθμιση του pH, αναμίξαμε το διάλυμα οξικού ψευδαργύρου/μολυβδαινικού αμμωνίου με το διάλυμα ασκορβικού οξέος σε αναλογία 4:1 σε ένα αδιαφανές σκούρο μπουκάλι. Αφήσαμε το μίγμα για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση (κίτρινο χρώμα). Στη συνέχεια προσθέσαμε στα δείγματα κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος και αφήσαμε να γίνει επώαση σε θερμοκρασία 30°C για άλλα 15 min σε υδατόλουτρο. Ο ανόργανος φώσφορος που υπάρχει σχηματίζει σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου (Zn<sup>2+</sup>) το οποίο λόγω της παρουσίας του ασκορβικού οξέος ανάγεται και παράγεται ένα χρωμοφόρο που έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. Απουσία ορθοφωσφορικών ιόντων το χρωμοφόρο σύμπλοκο δεν παράγεται. 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.

### **2.7.2 Ενζυμικό διάλυμα**

Έγινε παρασκευή ενζυμικού διαλύματος που είχε συγκέντρωση 5 μg/mL rmGPb σε όγκο 240 μL ώστε στον όγκο της αντίδρασης, που ήταν 180 μL, να είχαμε 1μg/mL rmGPb. Στο ενζυμικό διάλυμα που χρησιμοποιήσαμε για την σάρωση των αναστολέων προσθέσαμε GP, γλυκογόνο και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 στις εξής αναλογίες:

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Glycogen 10% (w/v):24μL	Glycogen 1% (w/v)
Ρυθμιστικό διάλυμα 50/50/1:12μL	Ρυθμιστικό διάλυμα 2.5/2.5/0.05
rmGPb 0.292 mg/ml:4.1	rmGPb 5 μg/mL
dH <sub>2</sub> O:199.9μL	
<b>Ντελ= 240 μL</b>	

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

### 2.7.3 Προσδιορισμός της $K_M$

Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου ( $K_M$  και  $V_{max}$ ) έγινε για την αξιολόγηση της ποιότητας του ενζύμου που απομονώθηκε. Η  $K_M$  προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης: 9mM, 13.5 mM, 18mM, 27mM, και 45mM ώστε τελικά σε όγκο 180 μl, όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση να έχουμε 2mM, 3 mM, 4mM, 6mM και 10mM 1-φωσφορικής γλυκόζης. Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος στα 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 για (0.5 mM β-φωσφορική γλυκερόλη, 0.5 mM β-Μερκαπτοαιθανόλη), 0.2 % (w/v) γλυκογόνο και 2 % (v/v) DMSO. Η προσθήκη του DMSO έγινε διότι η σάρωση και ο προσδιορισμός των IC50 των αναστολέων έγινε παρουσία DMSO γιατί οι ενώσεις αυτές ήταν διαλυμένες στο συγκεκριμένο διαλύτη.

<b>G1P (από πυκνό διάλυμα, mM)</b>	40 μL (9mM)	40 μL (13.5mM)	40 μL (18mM)	40 μL (27mM)	40 μL (45mM)
<b>dH<sub>2</sub>O μL</b>	93.2μL	93.2μL	93.2μL	93.2μL	9.2μL
<b>100% v/ DMSO</b>	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL
<b>AMP [25 mM]</b>	7.2μL	7.2 μL	7.2 μL	7.2 μL	7.2 μL
<b>Ντελ</b>	144μL	144μL	144μL	144μL	144μL

Η παρουσία της AMP ενεργοποιεί το ένζυμο rmGPb με αποτέλεσμα την αλλοστερική του μετάπτωση από την T στην R διαμόρφωση. Επομένως, το AMP δρα ως ένας αλλοστερικός ενεργοποιητής. Για τον προσδιορισμό της  $K_M$  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 του πειράματος, για την rmGPb, πήραμε 40 μL από το μίγμα της αντίδρασης ανά 5, 10, 15 και 20 min, και τα αποθέσαμε σε 10 μL SDS 1 %w/v. Κατόπιν κάναμε έντονη ανάδευση ώστε να σταματήσει πλήρως η αντίδραση. Αφού τελειώσαμε με όλες τις συγκεντρώσεις της G1P, τοποθετήσαμε τα δείγματα σε θερμοκρασία 4 °C.

Σε κάθε περίπτωση παρασκευάσαμε διαλύματα τα οποία είχαν ρόλο “τυφλού μάρτυρα” και περιείχαν μόνο την ένωση ή το μίγμα για το οποίο θέλαμε να μετρήσουμε την οπτική



απορρόφηση. Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάστηκαν εις διπλούν τα οποία περιείχαν όλα 10  $\mu\text{L}$  SDS 1 % (w/v):

Τυφλό $\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{L}$ SDS 1 % (w/v)+ 40 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$
Τυφλό ενζυμικού διαλύματος	10 $\mu\text{L}$ SDS 1 % (w/v)+ 32 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$ + 8 $\mu\text{L}$ ενζυμικού διαλύματος
Τυφλό G1P	10 $\mu\text{L}$ SDS 1 % (w/v)+ 31.1 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$ + 8.9 $\mu\text{L}$ από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση G1P
Τυφλό φωσφορικών	10 $\mu\text{L}$ SDS 1 % (w/v)+ 30 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$ + 10 $\mu\text{L}$ Pi 1 mM

Επομένως σε 40  $\mu\text{L}$  των τυφλών είχαμε  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  *rmGPb* (0.2 % γλυκογόνο, 1 % ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1) , 10 mM G1P και 0.25 mM Pi. Μετά το πέρας της διαδικασίας παρασκευάσαμε το διάλυμα φωτομέτρησης. Μετά τα 15 min επώασης του μίγματος του διαλύματος φωτομέτρησης, προσθέσαμε σε κάθε δείγμα, αλλά και στα τυφλά, 700  $\mu\text{L}$  διαλύματος φωτομέτρησης σε κάθε δείγμα.. Στη συνέχεια κάναμε ανάδευση και τα τοποθετήσαμε στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C για 15 min, ώστε να δημιουργηθεί το χρωμοφόρο σύμπλοκο. Τέλος μετρήσαμε τις απορροφήσεις σε μήκος κύματος 850 nm αφού πρώτα μηδενίσαμε με το τυφλό του  $\text{dH}_2\text{O}$ . 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.

#### 2.7.4 Σάρωση των αναστολέων

Το υπόστρωμα, που χρησιμοποιήθηκε ήταν η  $\alpha$ -D-1-φωσφορική γλυκόζη. Οι συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης ήταν ίδιες με τον προσδιορισμό της  $K_M$  με μικρές διαφοροποιήσεις: Για τη σάρωση των αναστολέων πραγματοποιήθηκε μελέτη στα 100  $\mu\text{M}$  αναστολέα στην αντίδραση (από πυκνό διάλυμα αναστολέα 5 mM διαλυμένο σε DMSO) και χρησιμοποιήσαμε μόνο μια συγκέντρωση υποστρώματος (2 mM). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε πολλές φορές εφόσον οι ενώσεις των αναστολέων ήταν συνολικά 80. Από τους 80 αναστολείς 3 μόνο παρουσίασαν μερική αναστολή έναντι της φωσφορυλάσης GPb: **GB-P3-4bc**, **GB-P37b'a**, **GB-P3-7ea** (Πίνακας 2).

G1P (από πυκνά διαλύματα, mM)	40 $\mu\text{L}$ (9mM)
$\text{dH}_2\text{O}$ $\mu\text{L}$	93.2 $\mu\text{L}$
[Inhibitor] 5 mM (100% DMSO)	3.6 $\mu\text{L}$
[AMP] 25 mM	7.2 $\mu\text{L}$
Ντελ	144 $\mu\text{L}$

Επίσης, σε κάθε περίπτωση κατασκευάζαμε τυφλά αναστολέων για να δούμε εάν παρουσιάζουν κάποια οπτική απορρόφηση.

Για κάθε πείραμα (πέντε διαφορετικές ενώσεις) παρασκευάσαμε και ένα δείγμα ελέγχου (Control), το οποίο δεν περιείχε αναστολέα αλλά μόνο DMSO (συνολικά έξι δείγματα ανά πείραμα).

### 2.7.6 Προσδιορισμός IC50 των ενώσεων

Οι συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης ήταν ίδιες με τον προσδιορισμό της  $K_M$  με μικρές διαφοροποιήσεις: Η συγκέντρωση του υποστρώματος ήταν σταθερή στα 2 mM και χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις από κάθε αναστολέα. Σε κάθε περίπτωση, παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα αναστολέα διαλυμένα σε DMSO έτσι ώστε κατά την διεξαγωγή της αντίδρασης να είχαμε 2% DMSO και τις επιθυμητές προς μελέτη συγκεντρώσεις αναστολέα. Για τον υπολογισμό των IC50 των τριών αναστολέων χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον 5 συγκεντρώσεις αναστολέα :

-Για τον **GB-P3-4bc** έναντι της rmGPb μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 84.7 μM, 169.4 μM, 296.4 μM, 508.2 μM, 676 μM, 847 μM .

- Για τον **GB-P3-7b'α** έναντι της rmGPb μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 95.8 μM, 268.24 μM, 430 μM, 574.8 μM, 670 μM,

- Για τον **GB-P3-7ea** έναντι της rmGPb μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 100μM, 280 μM, 350 μM, 600 μM και 700 μM

Για κάθε πείραμα παρασκευάσαμε και ένα δείγμα ελέγχου (Control), το οποίο δεν περιείχε αναστολέα αλλά μόνο DMSO.

### 2.7.7 Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων και η παραγωγή των απαραίτητων διαγραμμάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα GraFit [44]. Προκειμένου να υπολογιστούν οι κινητικές παράμετροι ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$ ) έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήσαμε. Η ειδική δραστηριότητα ορίζεται ως τα μmole υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε mg πρωτεΐνης, δηλαδή μmol/min/mg.

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

$$0.25 \text{ mM} = 0.25 \text{ mmol/L} = 0.25 \text{ μmole/mL}$$

Άρα στα 1000 μL περιέχονταν 0.25 μmol φωσφορικών ιόντων. Επομένως, στα 40 μL που ήταν ο όγκος του τυφλού των φωσφορικών ιόντων που φωτομετρήσαμε είχαμε 0.01 μmol φωσφορικών ιόντων. Αν υποθέσουμε ότι το τυφλό είχε απορρόφηση A, τότε αυτή η απορρόφηση δηλώνει την παρουσία 0.01 μmol φωσφορικών ιόντων. Με αυτό τον τρόπο υπολογίσαμε την ποσότητα σε μmol για κάθε δείγμα. Ας υποθέσουμε ότι μία μέτρηση έδωσε απορρόφηση B. Για να υπολογίσουμε μόνο τα μmol 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

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

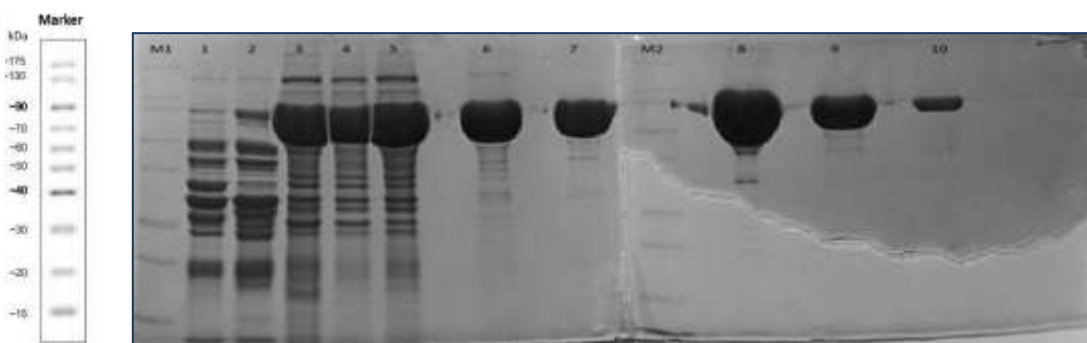
Εφόσον γνωρίζουμε ότι τα 0.01 μολι έδωσαν απορρόφηση A, τότε τα μολι των φωσφορικών ιόντων στο δείγμα ισούταν με:

$$\frac{cx \ 0.01}{A} \text{ ή } \frac{B}{A * 100} = \text{μολι φωσφορικών ιόντων στο άγνωστο δείγμα}$$

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Καθαρισμός και απομόνωση της rmGPb

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση της rmGPb από 3 κονίκλους. Στην **Εικόνα 3.1** παρουσιάζονται δείγματα από διάφορα στάδια της απομόνωσης του ενζύμου **rmGPb** τα οποία αναλύθηκαν ως προς την καθαρότητα και την ποσότητά τους με τη χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10%.



**Εικόνα 3.1:** πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10% από την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (97 kDa). Στις διαδρομές M1 παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. Έπειτα, **διαδρομή 1:** δείγμα μετά την παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος, αφού διηθηθεί μέσω υαλοβάμβακα, **διαδρομή 2:** μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο, συγκεκριμένα αφού το διάλυμα έγινε διφασικό και πραγματοποιήθηκε διαλυτοποίηση του ιζήματος, **διαδρομή 3:** μετά τη διαπίδυση και ογκομέτρηση για προσθήκη EDTA και β-μερακπτοαιθανόλης, **διαδρομή 4:** μετά από διαύγαση και ρύθμιση pH 7 με CH<sub>3</sub>COOH, **διαδρομή 5:** στάδιο κρυστάλλωσης και ανακρυστάλλωσης της GPb, ογκομέτρηση πριν την προσθήκη AMP, **διαδρομή 7:** πρώτη ανακρυστάλλωση, **διαδρομή 8:** δεύτερη ανακρυστάλλωση, **διαδρομή 9:** τρίτη ανακρυστάλλωση, **διαδρομή 10:** τέταρτη ανακρυστάλλωση

Όπως φαίνεται και στην εικόνα στα στάδια των ανακρυσταλλώσεων, κατά τα οποία κρυσταλλώνεται η **rmGPb**, ο εμπλουτισμός και η καθαρότητα της πρωτεΐνης αυξάνονται σε μεγάλο βαθμό ενώ πρωτεΐνες που δεν κρυσταλλώνονται, στις συγκεκριμένες συνθήκες, απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. Στις τελευταίες ανακρυσταλλώσεις φαίνεται πως η καθαρότητα της πρωτεΐνης είναι πολύ μεγάλη φτάνοντας το 95% στην διαδρομή 10. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την έναρξη περαιτέρω διαδικασιών έτσι ώστε να επιτευχθεί η κρυστάλλωση του ενζύμου.

Η συνολική απόδοση της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού ήταν :

**1.06g rmGPb ανά 2.2kg σκελετικών μυών κονίκλων.**

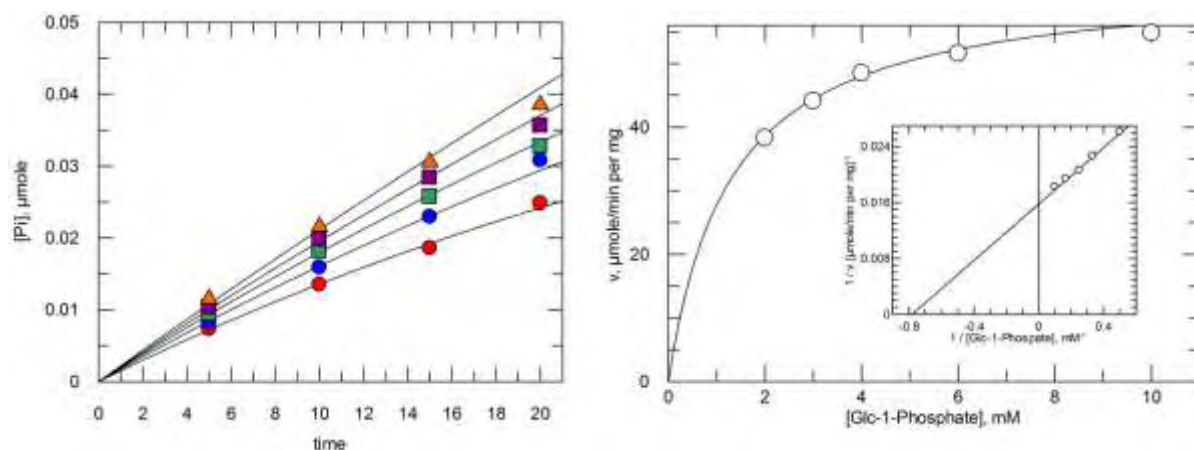
## 3.2 Κινητικές μελέτες

### 3.2.1 Προσδιορισμός της $K_M$

Οι κινητικές παράμετροι υπολογίστηκαν ως εξής (διάγραμμα 1):

$K_M$ :  $1.29 \pm 0.1147$  mM

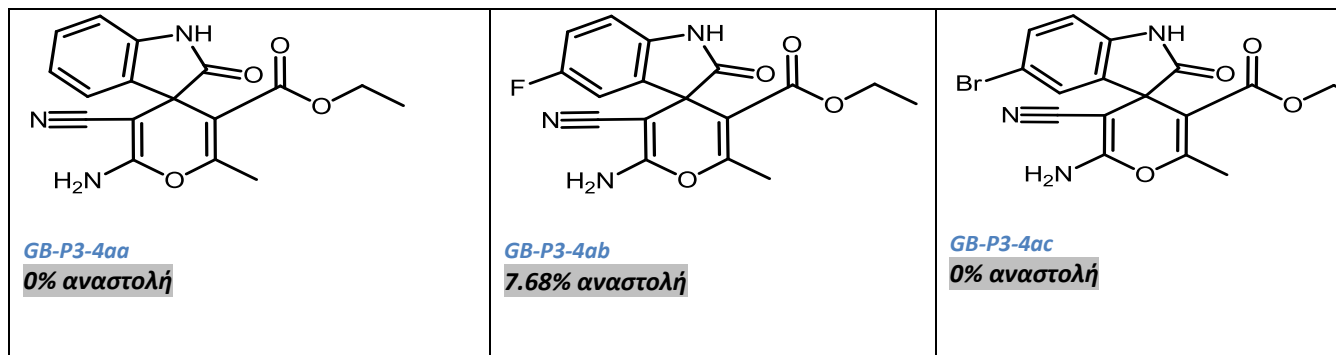
$V_{max}$ :  $63.4 \pm 1.5$   $\mu\text{mole}/\text{min}$  per mg

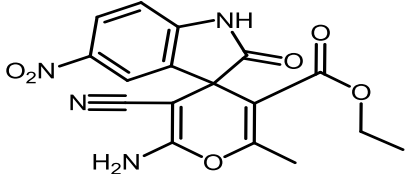
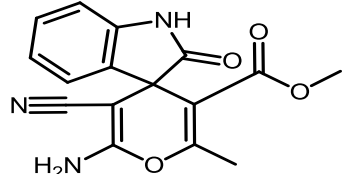
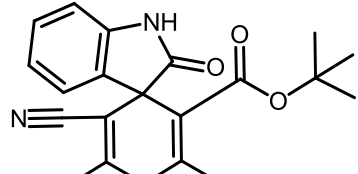
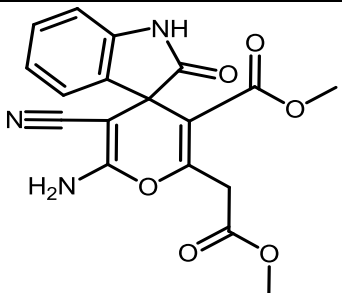
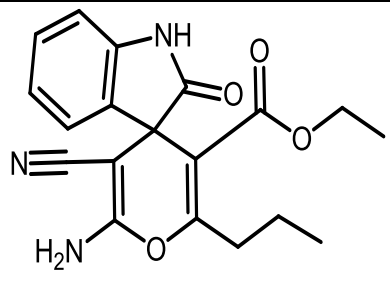
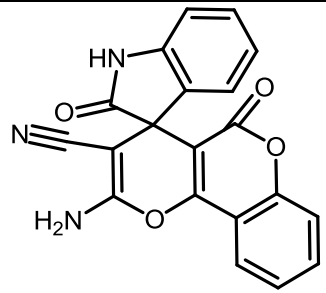
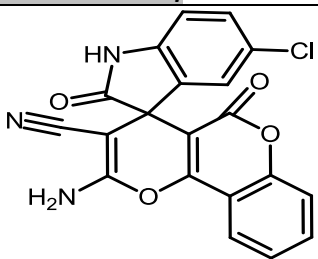
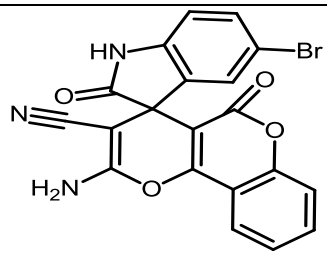
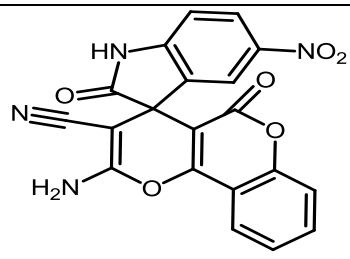
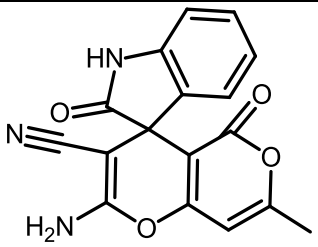
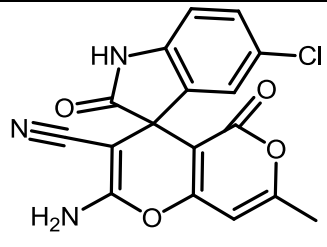
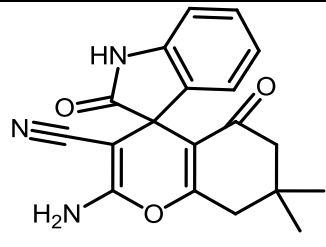
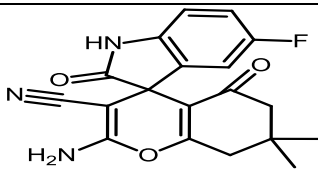
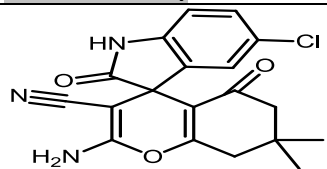
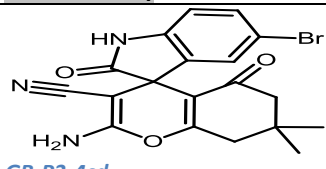
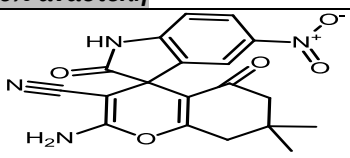
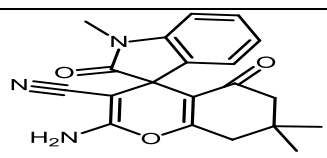
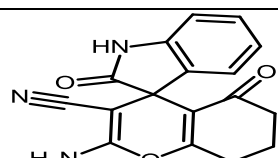


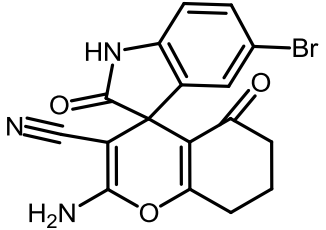
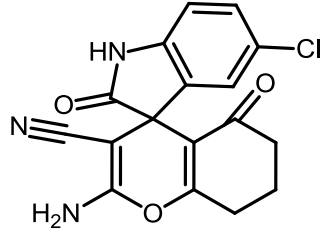
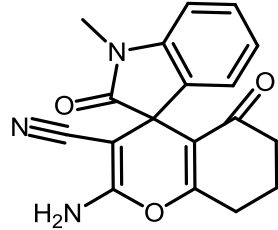
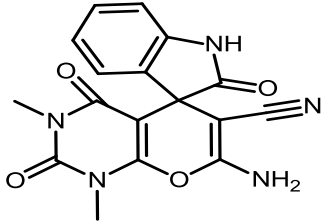
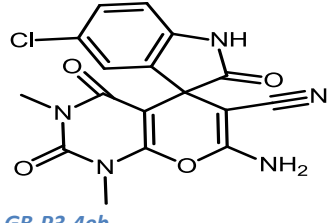
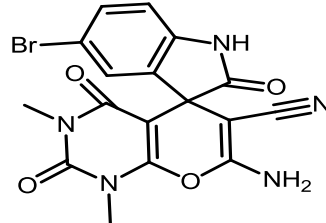
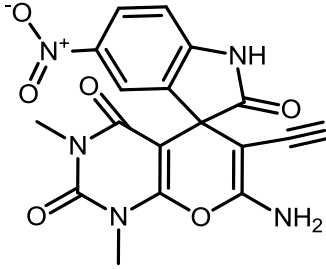
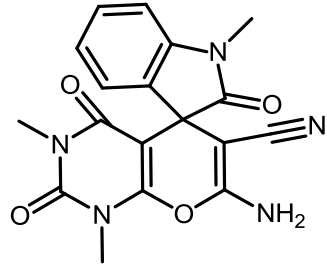
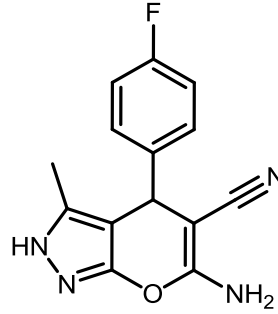
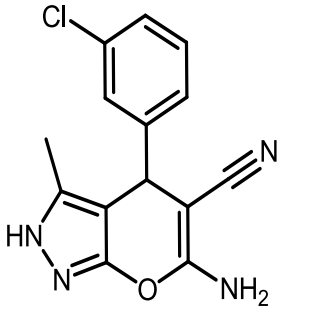
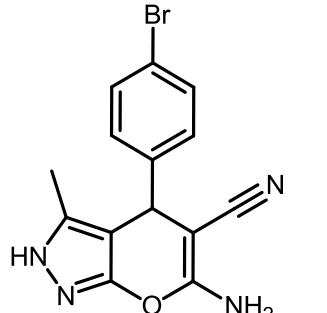
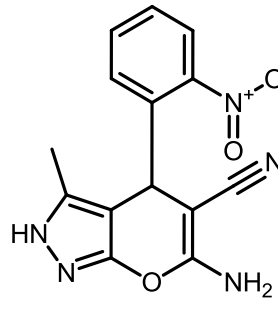
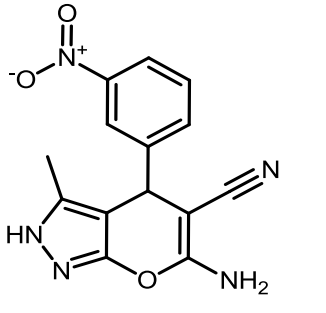
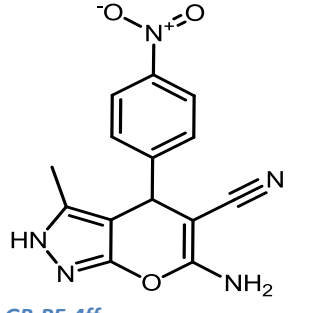
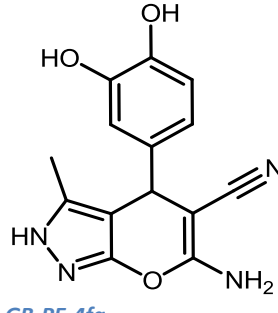
**Διάγραμμα 1:** A) Οι καμπύλες προϊόντος/χρόνου από τις οποίες προκύπτουν οι ενζυμικές δραστηριότητες για τις διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήσαμε ήταν 2 mM (●), 3 mM (●), 4 mM (■), 6 mM (■) και 10 mM (▲) 1-φωσφορικής γλυκόζης. B) Η γραφική παράσταση *Michaelis-Menten*, 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  $1/G1P$ .

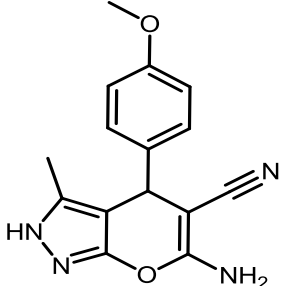
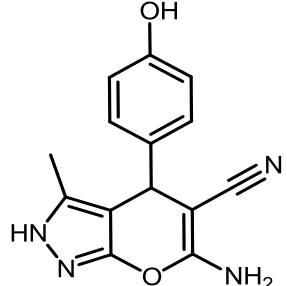
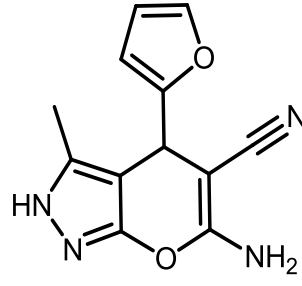
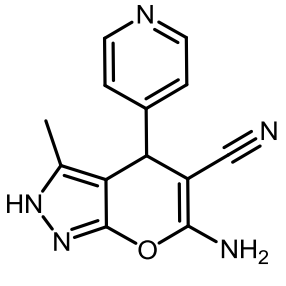
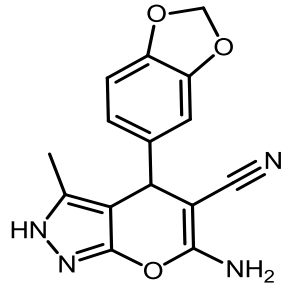
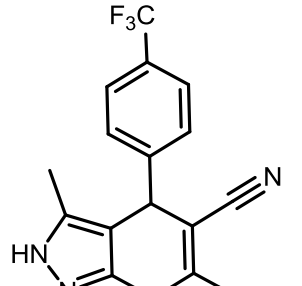
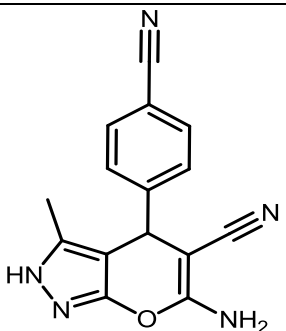
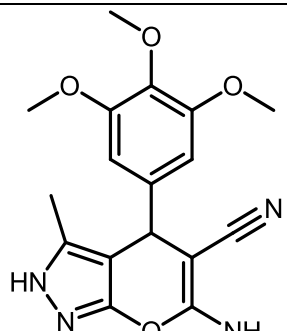
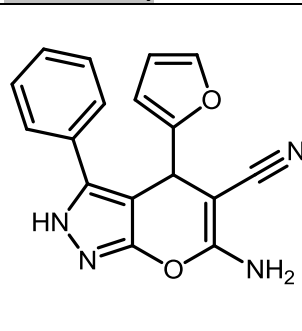
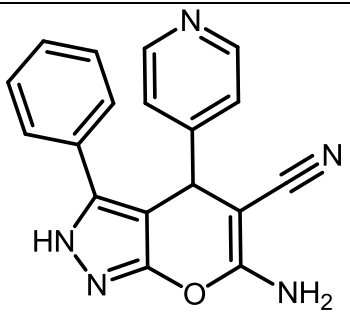
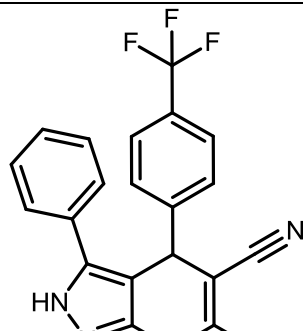
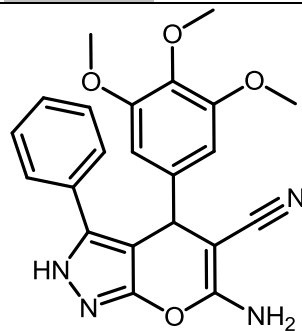
### 3.2.1 Σάρωση αναστολέων

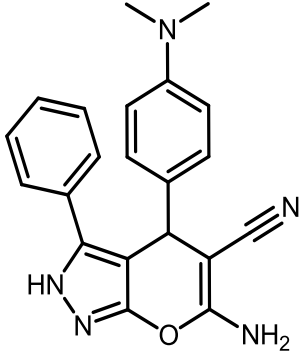
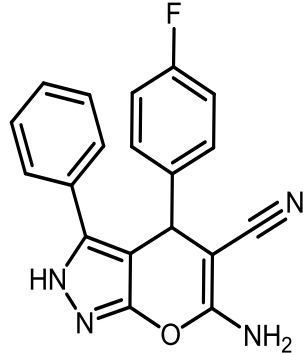
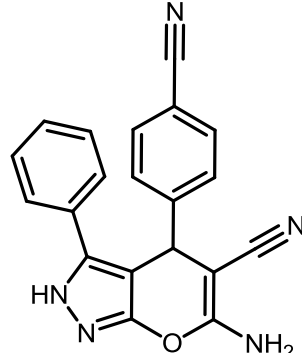
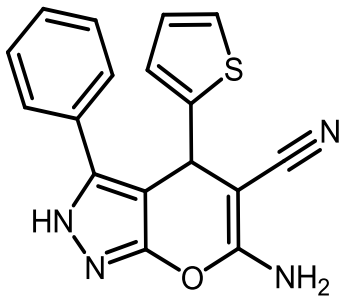
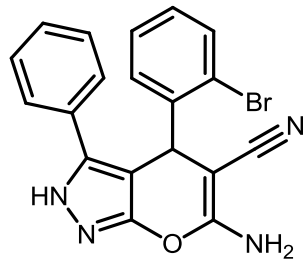
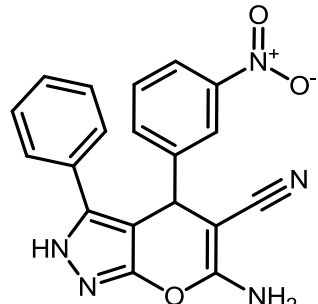
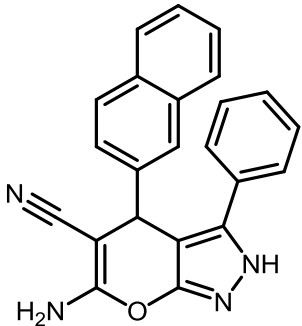
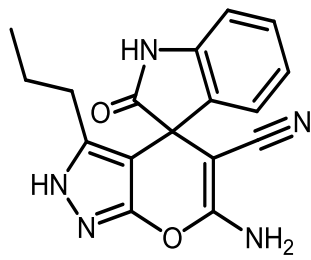
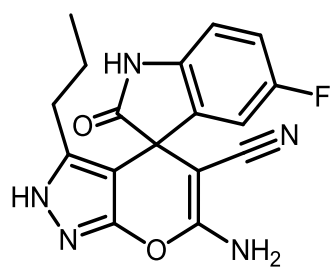
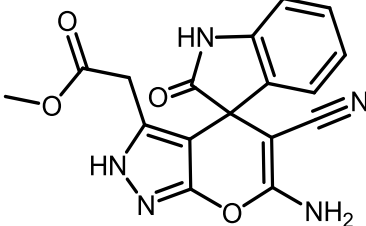
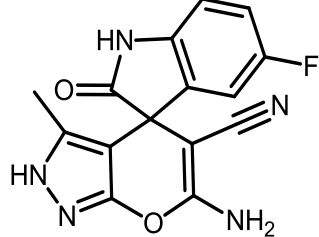
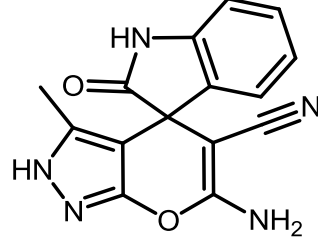
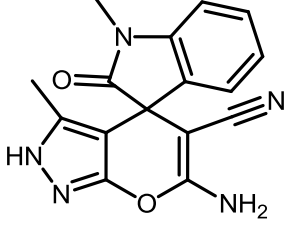
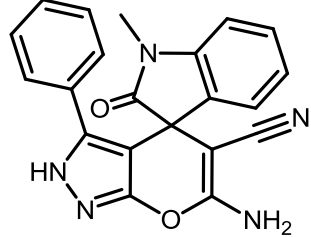
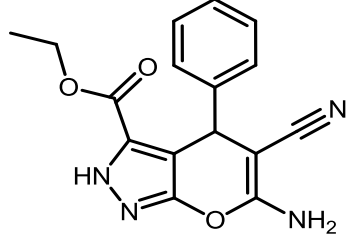
Πραγματοποιήθηκε σάρωση ετεροκυκλικών ενώσεων (κουμαρίνες) με συγκέντρωση αναστολέα 100  $\mu\text{M}$  στην αντίδραση, για να βρεθεί η % αναστολή του ενζύμου *rmGPb*. Οι ενώσεις και η αναστολή που παρουσίασαν φαίνονται παρακάτω στον Πίνακα 2:



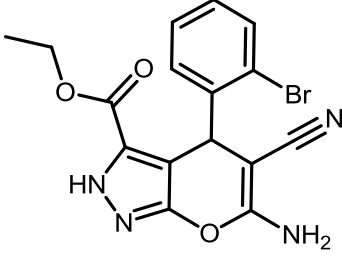
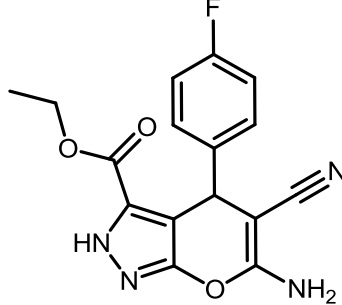
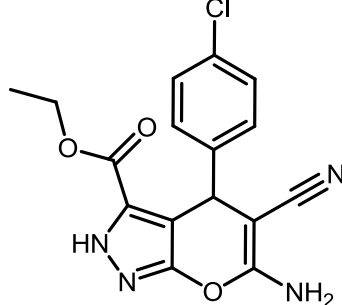
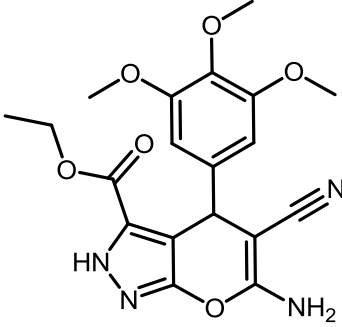
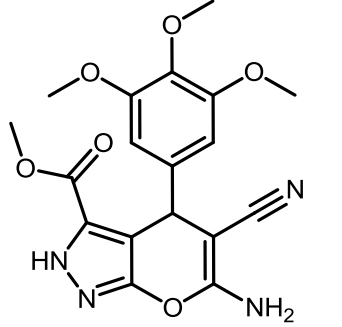
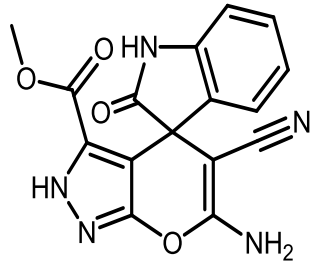
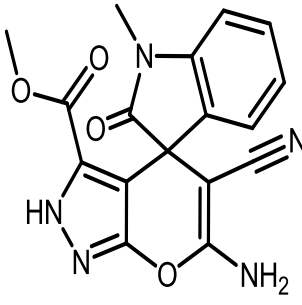
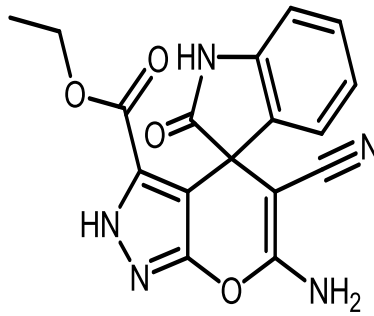
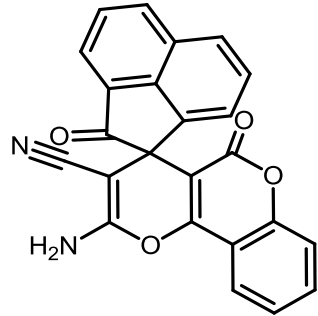
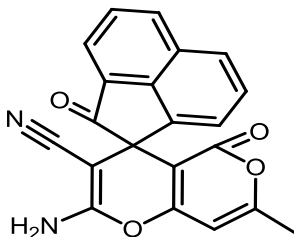
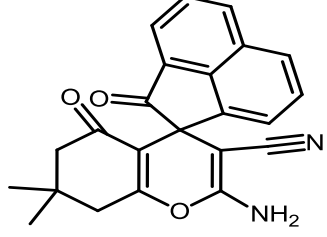
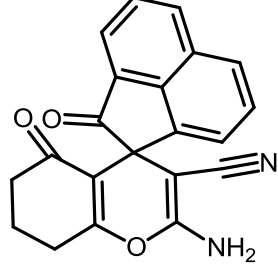
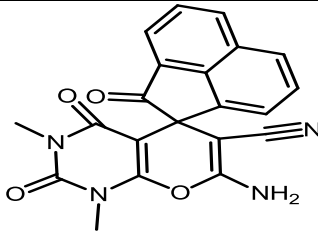
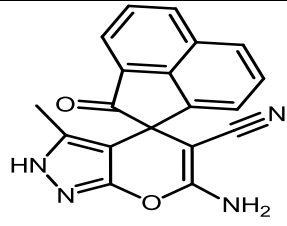
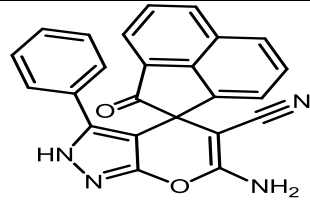
 <p><b>GB-P3-4ad</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4ae</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4af</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-P3-4ag</b> 5.75% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4ah</b> 3.55% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4ba</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-P3-4bb</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4bc</b> 15,87% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4bd</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-P3-4b'a</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4b'b</b> 5.75% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4ca</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-PE-4cb</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-PE-4cc</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4cd</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-P3-4ce</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4cfj</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4da</b> 0% αναστολή</p>

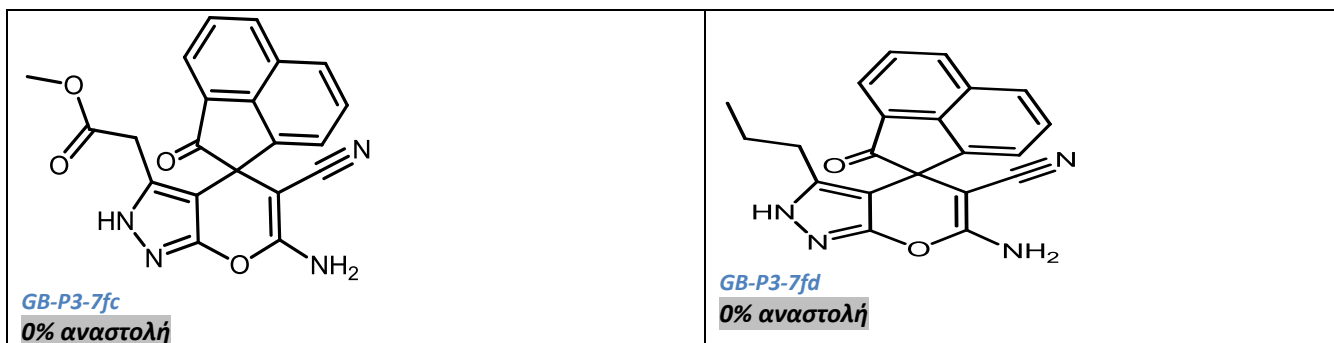
 <p><b>GB-P3-4db</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4dc</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4dd</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-P3-4ea</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4eb</b> 5.55% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4ec</b> 6.36% αναστολή</p>
 <p><b>GB-PE-4ed</b> 6.92% αναστολή</p>	 <p><b>GB-PE-4ee</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-PE-4fa</b> 4.94% αναστολή</p>
 <p><b>GB-PE-4fb</b> 5.76% αναστολή</p>	 <p><b>GB-PE-4fc</b> 4.49% αναστολή</p>	 <p><b>GB-PE-4fd</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-PE-4fe</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-PE-4ff</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-PE-4fg</b> 2.7% αναστολή</p>

 <p><b>GB-PE-4fh</b> <b>0% αναστολή</b></p>	 <p><b>GB-PE-4fi</b> <b>0% αναστολή</b></p>	 <p><b>GB-PE-4fj</b> <b>0% αναστολή</b></p>
 <p><b>GB-PE-4fk</b> <b>0% αναστολή</b></p>	 <p><b>GB-PE-4fl</b> <b>0% αναστολή</b></p>	 <p><b>GB-PE-4fm</b> <b>0% αναστολή</b></p>
 <p><b>GB-PE-4fn</b> <b>0% αναστολή</b></p>	 <p><b>GB-PE-4fo</b> <b>0% αναστολή</b></p>	 <p><b>GB-PE-4fp</b> <b>0% αναστολή</b></p>
 <p><b>GB-PE-4fq</b> <b>0% αναστολή</b></p>	 <p><b>GB-PE-4fr</b> <b>2.38% αναστολή</b></p>	 <p><b>GB-PE-4fs</b> <b>0% αναστολή</b></p>

 <p><b>GB-PE-4ft</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-PE-4fu</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-PE-4fv</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-PE-4fw</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-PE-4fx</b> 6.18% αναστολή</p>	 <p><b>GB-PE-4fy</b> 2.5% αναστολή</p>
 <p><b>GB-PE-4fz</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4ga</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4gb</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-P3-4gc</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4gd</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4ge</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-P3-4gf</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4gg</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4ha</b> 4.84% αναστολή</p>



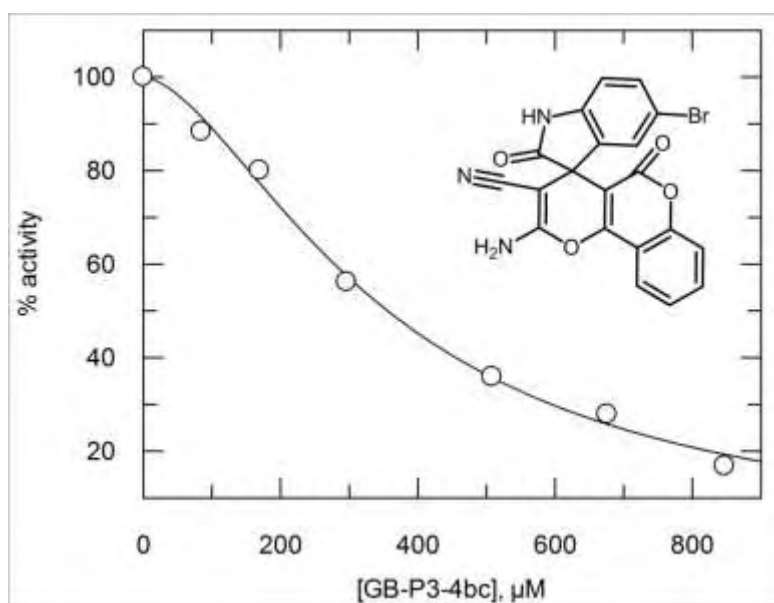
 <p><b>GB-P3-4hb</b> 4.79% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4hc</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4hd</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-P3-4he</b> 2.27% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4hf</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4ia</b> 2.7% αναστολή</p>
 <p><b>GB-P3-4ib</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-4ic</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-7ba</b> 7.11 % αναστολή</p>
 <p><b>GB-P3-7b'a</b> 17.14% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-7ca</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-47da</b> 0% αναστολή</p>
 <p><b>GB-P3-7ea</b> 17.04 % αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-7fa</b> 0% αναστολή</p>	 <p><b>GB-P3-7fb</b> 0% αναστολή</p>



Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα οι αναστολείς **GB-P3-4bc**, **GB-P3-7b'a** & **GB-P3-7ea** παρουσίασαν την μεγαλύτερη αναστολή προς το ένζυμο **rmGPb**. Για αυτές τις ενώσεις πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της **IC50**.

### 3.2.2 Υπολογισμός της IC50 του GB-P3-4bc

Ο αναστολέας **GB-P3-4bc** εμφάνισε **15.87%** αναστολή σε συγκέντρωση 100 μM έναντι της **rmGPb**. Η IC50 για τον αναστολέα **GB-P3-4bc** υπολογίστηκε στα 356.26 ± 11.54 μM.



Διάγραμμα 2: Το διάγραμμα της IC<sub>50</sub> για τον αναστολέα GB-P3-4bc

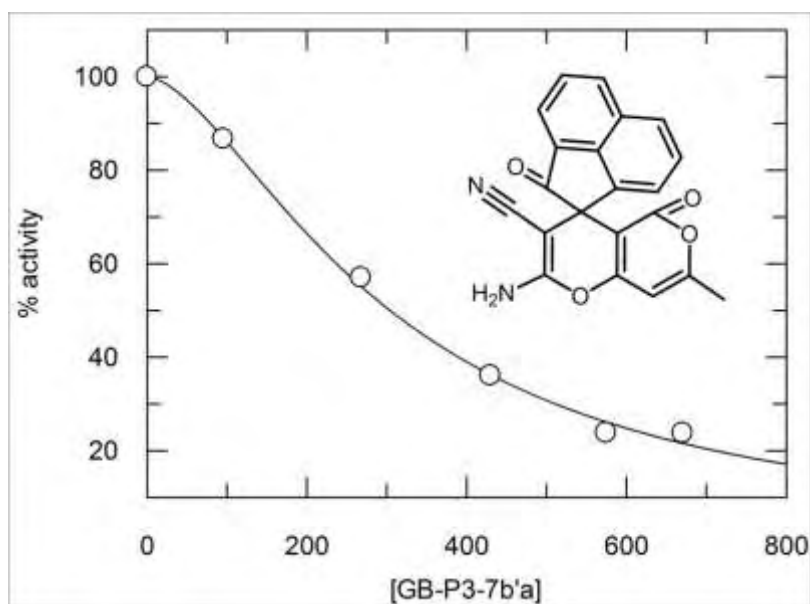
Η Ki υπολογίζεται ως εξής:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{\frac{s}{K_M} + 1}$$

Άρα  $K_i$  (**GB-P3-4bc**) = 139.7 μM

### 3.2.3 Υπολογισμός της IC50 του GB-P3-7b'a

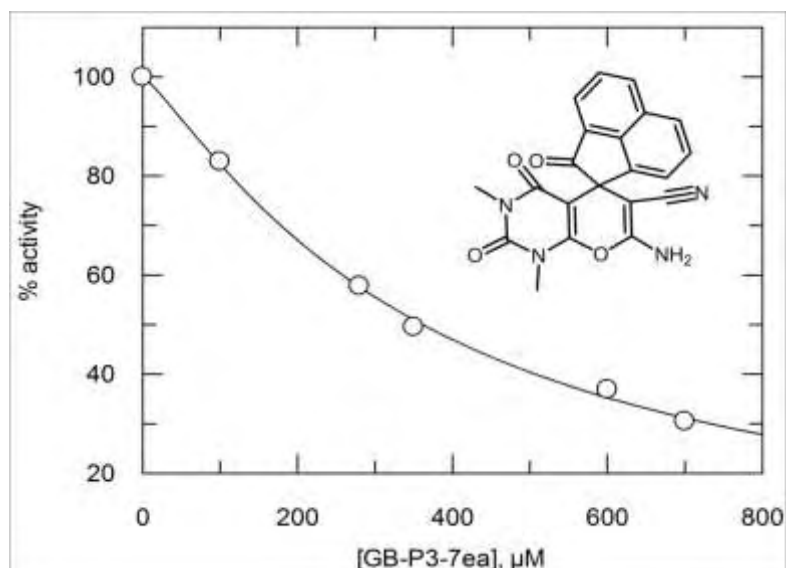
Ο Αναστολέας **GB-P3-7b'a** εμφάνισε **17.14%** αναστολή σε συγκέντρωση 100μM έναντι της rmGPb. Η IC50 για τον αναστολέα **GB-P3-7b'a** υπολογίστηκε σε  $304 \pm 18 \mu\text{M}$ .



Όμοια η  $K_i$  υπολογίστηκε σε  $119.2 \mu\text{M}$

### 3.2.4 Υπολογισμός της IC50 του GB-P3-7ea

Ο αναστολέας **GB-P3-7ea** εμφάνισε **17.04%** αναστολή σε συγκέντρωση 100μM έναντι της rmGPb. Η IC50 για τον αναστολέα **GB-P3-7ea** υπολογίστηκε στα  $361.64 \pm 7.4 \mu\text{M}$ .



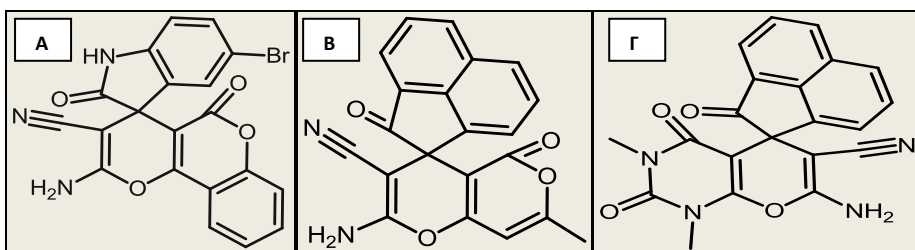
Όμοια η  $K_i$  υπολογίστηκε σε  $141.8 \mu\text{M}$

#### 4. Συζήτηση

Τα φυτικά εκχυλίσματα αποτελούν σημαντική πηγή φυσικών ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα ή να τροποποιηθούν χημικά ώστε μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού ενώσεων να οδηγηθούμε σε νέες και ισχυρές ενώσεις που θα αναστέλλουν τη δράση ενζύμων. Στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η έρευνα γύρω από τις φυσικές ενώσεις που μπορούν να αναστέλλουν την φωσφορυλάση του γλυκογόνου, έχει γίνει με επιτυχία μέσω της ανάπτυξης και εφαρμογής της κρυσταλλογραφίας συγγένειας (Kyriakiset al, 2015 Stravodimos et al, 2018). Μέχρι σήμερα, το ελλαγικό οξύ, που προσδέεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου, αποτελεί τον πιο βιοδραστικό αναστολέα για την GP. Η GP αποτελεί έναν έγκυρο φαρμακευτικό στόχο για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 με αποτέλεσμα η βιοχημική μελέτη της GP να στοχεύει στην κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό νέων αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του ΣΔ2. Σε βιοχημικές και δομικές μελέτες έχει διερευνηθεί η δέσμευση μεγάλου αριθμού προσδετών στα κέντρα πρόσδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η πλειοψηφία τους αναφέρεται σε προσδέτες που δεσμεύονται στο καταλυτικό κέντρο και είναι παράγωγα γλυκόζης. Η α-D-γλυκόζη είναι ο φυσιολογικός αναστολέας της GP με σταθερά αναστολής (Ki) 1.7 mM για την GPb και 4.9 mM για την GPa, αντίστοιχα. Η γλυκόζη σε ένα αυτορυθμιζόμενο σύστημα, αναστέλλει την αποικοδόμηση και επάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου αναστέλλοντας τη δράση της GP με αποτέλεσμα τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα να μειώνονται. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας η μελέτη του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου έχει γίνει με περισσότερα από 200 ανάλογα γλυκόζης. Ωστόσο, τα υπόλοιπα κέντρα του ενζύμου δεν είναι το ίδιο καλά μελετημένα. Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε η ανασταλτική δράση ετεροκυκλικών ενώσεων (ανάλογα κουμαρίνης) έναντι της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η σύνθεση των ενώσεων αυτών έγινε από το καθηγητή *Goutam Brahmachari* από το πανεπιστήμιο του *Bharati* της Ινδίας. Αρχικά, έγινε απομόνωση και καθαρισμός της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων και προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων για την αξιολόγηση της ποιότητας του ενζύμου που απομονώθηκε. Στη συνέχεια, έγινε σάρωση σε μια συγκέντρωση για όλους τους εν δυνάμει αναστολείς και προσδιορίστηκε η επί τοις εκατό αναστολή ως προς ένα δείγμα ελέγχου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τρεις από αυτές τις ενώσεις **GB-P3-4bc**, **GB-P3-7b'α** και **GB-P3-7εα** εμφάνισαν 15.87 %, 17.14 %, 17.04 % αναστολή, αντίστοιχα. Για την ενώσεις αυτές έγινε και προσδιορισμός των IC<sub>50</sub> που προσδιορίστηκαν στα 356.26 ± 11.54 μM, 304 ± 18 μM και 361.64 ± 7.4 μM για τους **GB-P3-4bc**, **GB-P3-7b'α** και **GB-P3-7εα**, αντίστοιχα. Η εφαρμογή πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας

ακτίνων-Χ θα διαλευκάνει το κέντρο του ενζύμου στο οποίο προσδένονται αυτές οι ενώσεις. Επιπλέον, η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων των αναστολέων με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης θα αναδείξει τις αλληλεπιδράσεις εκείνες που επιφέρουν μια αυξημένη βιοδραστικότητα αλλά θα βοηθήσει και στην καλύτερη κατανόηση του συγκεκριμένου κέντρου πρόσδεσης του ενζύμου. Τα αποτελέσματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν ώστε μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού ενώσεων θα συντεθούν και να αξιολογηθούν νέες ενώσεις μια αυξημένη συγγένεια για το ένζυμο και πιθανό φαρμακολογικό ενδιαφέρον.

**A) GB-P3-4bc, B)GB-P3-7b'a, Γ) GB-P3-7ea.**



## Βιβλιογραφία

- [1] KaulK<sup>1</sup>, TarrJM, AhmadSI, KohnerEM, ChibberR. Introduction to diabetes mellitus. *AdvExp Med Biol.* 2012
- [2] American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33Suppl 1:S62-9
- [3] UazmanAlam, Omar Asghar, Shazil A. Malik Chapter 15-General aspects of diabetes melitus
- [4] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res ClinPract.* 2014 Feb;103(2):137-49
- [5] American Diabetes Association (2014). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care.* Vol 37 (Suppl. 1): 14–80.
- [6] DYANNE P. WESTERBERG, DO Diabetic Ketoacidosis: Evaluation and Treatment. , Cooper Medical School of Rowan University, Camden, New Jersey
- [7] Susan J. Zunino, Type 2 Diabetes and Glycemic Response to Grapes or Grape Products, *The Journal of Nutrition*, Volume 139, Issue 9, 1 September 2009, Pages 1794S–1800S,
- [8] Samson SL<sup>1</sup>, Garber AJ<sup>2</sup>. Metabolic syndrome. *EndocrinolMetabClin North Am.* 2014 Mar
- [9] Paulina Sicińska, Edyta Pytel, AnetaMaćczak, Maria Koter-MichalakKatedraBiofizykiSkazeńŚrodowiska, UniwersytetŁódzki, The use of various diet supplements in metabolic syndrome, *PostepyHig Med Dosw (Online).* 2015 Jan 9;69:25-33.
- [10] Steiner D.F., Oyer P.E. (1967). The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol 57 (Suppl. 2): 473–80.
- [11] Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology.* 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006
- [12] Johan Ruud, Sophie M. Steculorum, and Jens C. Brüning, Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism, *Nat Commun.* 2017; 8: 15259. Published online 2017 May 4
- [13] Goh YJ<sup>1</sup>, Klaenhammer TR. Insights into glycogen metabolism in *Lactobacillus acidophilus*: impact on carbohydrate metabolism, stress tolerance and gut retention. *Microb Cell Fact.* 2014 Nov 20;13:94. doi: 10.1186/s12934-014-0094-3.

[14] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis

[15] N. N. Bezborodkina<sup>1,a\*</sup>, A. Yu. Chestnova<sup>1</sup>, M. L. Vorobev<sup>1</sup>, and B. N. Kudryavtsev, Spatial Structure of Glycogen Molecules in Cells, 1 Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064 St. Petersburg, Russia a email: natalia\_bezborodkina@mail.ru Received October 16, 2017 Revision received November 9, 2017

[16] Elton Zeqiraj,<sup>a</sup> XiaojingTang,<sup>a</sup> Roger W. Hunter,<sup>b,1</sup> Mar García-Rocha,<sup>c</sup> Andrew Judd,<sup>a</sup> Maria Deak,<sup>b,1</sup> Alexander von Wilamowitz-Moellendorff,<sup>b</sup> Igor Kurinov,<sup>d</sup> Joan J. Guinovart,<sup>c,e</sup> Mike Tyers,<sup>f,g,2</sup> Kei Sakamoto,<sup>b,1,2</sup> and Frank Sicheri, Structural basis for the recruitment of glycogen synthase by glycogenin, Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jul 15

[17] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis

[18] Alexander von Wilamowitz-Moellendorff,<sup>1</sup> Roger W. Hunter,<sup>1</sup> Mar García-Rocha,<sup>2</sup> Li Kang,<sup>3</sup> Iliana López-Soldado,<sup>2</sup> Louise Lantier,<sup>3</sup> Kashyap Patel,<sup>1</sup> Mark W. Pegg,<sup>1</sup> Carlos Martínez-Pons,<sup>2</sup> Martin Voss,<sup>1</sup> Joaquim Calbó,<sup>2</sup> Patricia T.W. Cohen,<sup>1</sup> David H. Wasserman,<sup>3</sup> Joan J. Guinovart,<sup>2</sup> and Kei Sakamoto<sup>1</sup>, Glucose-6-Phosphate-Mediated Activation of Liver Glycogen Synthase Plays a Key Role in Hepatic Glycogen Synthesis, Diabetes. 2013 Dec, Published online 2013 Nov 16.

[19] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. Biochem J 2012

[20] Alejandro Buschiazzi,<sup>1</sup> Juan E Ugalde,<sup>2</sup> Marcelo E Guerin,<sup>1</sup> William Shepard,<sup>3</sup> Rodolfo A Ugalde,<sup>2</sup> and Pedro M Alzari, Crystal structure of glycogen synthase: homologous enzymes catalyze glycogen synthesis and degradation, EMBO J. 2004 Aug 18

[21] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.

[22] Soty M<sup>1</sup>, Chilloux J, Casteras S, Grichine A, Mithieux G, Gautier-Stein A., New insights into the organisation and intracellular localisation of the two subunits of glucose-6-phosphatase, Biochimie. 2012 Mar;

[23] Bollen M, Keppens S, Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. Biochem J 1998

[24] 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

[25] Kantsadi AL, Bokor E, Kun S, Stravodimos GA, Chatzileontiadou DS, Leonidas DD, et al. Synthetic, enzyme kinetic, and protein crystallographic studies of C-beta-dglucopyranosyl pyrroles and imidazoles reveal and explain low nanomolar inhibition of human liver glycogen phosphorylase. *Eur J Med Chem* 2016

[26] Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinoetz A.M., McPherson R.K., Olson T.V., Treadway J.L. and Hoover D.J. (2000). Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at new allosteric site. *Chemistry and Biology*.

[27] LoranneAgiu. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. Institutes of Cellular Medicine and Ageing and Health, Medical School, Newcastle University

[28] Cécile Mathieu, Jean-Marie Dupret , Fernando Rodrigues Lima, The structure of brain glycogen phosphorylase—from allosteric regulation mechanisms to clinical perspectives, First published: 26 October 2016

[29] Nicholas M. Fleischman, Debanu Das, Abhinav Kumar, Molecular characterization of novel pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes from the human microbiome, *Protein Science*, 29 May 2014

[30] 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;13:471-98

[31] Oikonomakos N.G., Schnier J.B., Zographos S.E., Skamnaki V.T., Tsitsanou K.E., Johnson L.N. (2000a). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.* Vol 275: 34566-34573.

[32] Kantsadi A.L., Apostolou A., Theofanous S, Stravodimos G.A., Kyriakis E., Gorgogietas V.A., Chatzileontiadou D.S.M., Pegiou K., Skamnaki V.T., Stagos D., Kouretas D., Psarra A-M.G., Haroutounian S.A., Leonidas D.D., (2014). Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier

[33] h[16] Oikonomakos, N.G. (2002), Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: Inav Kumar

[34] Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.;

[35] Oikonomakos, N. G. (2008), New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983



- [36] Blundell T. L., Jhoti H. &Abell C., (2002), High-throughput crystallography for lead discovery in drug design, Nature Reviews, Drug Discovery, Volume 1
- [37] Nicholas B. Karatzas, Coumarins, a Class of Drugs with a Unique Contribution to Medicine: The Tale of Their Discovery, Second Department of Cardiology, "Hygeia" Hospital, Athens, Greece
- [38] Li H<sup>1,2</sup>, Yao Y<sup>1</sup>, Li L<sup>1</sup>., Coumarins as potential antidiabetic agents, J Pharm Pharmacol. 2017 Oct
- [39] Michaelis L, Menten ML, Johnson KA, Goody RS. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. Biochemistry 2011
- [40] ΚλώνηςΙ. Ενζυμολογία: Έμβρυο; 2007
- [41] Price NC, Stevens L. Fundamentals of enzymology : the cell and molecular biology of catalytic proteins. 3rd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 1999
- [42] Bag A<sup>1</sup>, Ghorai PK<sup>2</sup>, Development of Quantum Chemical Method to Calculate Half Maximal Inhibitory Concentration (IC<sub>50</sub> ), Mol Inform. 2016 May
- [43] Gel electrophoresis of proteins. Adapted from Chapter 7, Gel Electrophoresis of Proteins, by David E. Garfin, pages 197-268, in Essential Cell Biology, Volume 1: Cell structure, A Practical Approach, Edited by John Davey and Mike Lord, Oxford University Press, Oxford UK (2003)
- [44]Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998