

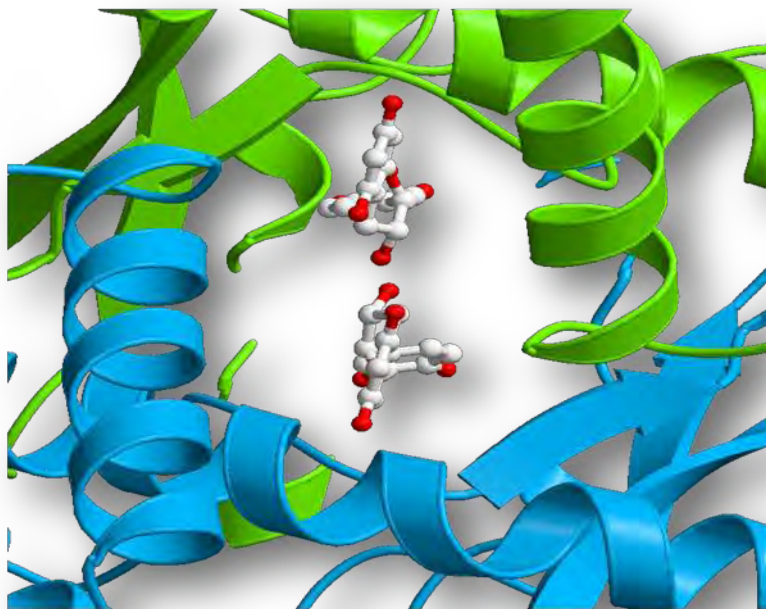


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ-ΣΤΟΧΟΣ
ΓΙΑ ΤΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΝΕΩΝ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ-
ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**



ΣΑΒΒΙΔΟΥ ΜΑΡΘΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

**Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ-ΣΤΟΧΟΣ
ΓΙΑ ΤΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΝΕΩΝ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ-
ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**

Υπεύθυνος Καθηγητής

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

Στους γονείς μου

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο πρόσωπο του κ. Δημητρίου Λεωνίδα, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., για την ευκαιρία που μου παρείχε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριό του, την προθυμία του να μοιραστεί τις γνώσεις του και την εμπειρία του, τη συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση καθώς και την υποστήριξή του καθόλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος.

Ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να γίνει στην κ. Μαρία Κοντού, Λέκτορα Κλινικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., για τη βοήθεια που μου παρείχε ανά πάσα στιγμή, το ενδιαφέρον και τη στήριξή της στον εργαστηριακό χώρο.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., που μου εμπιστεύθηκε το εκχύλισμα από οίνο για την εκπόνηση της εργασίας μου.

Εν συνεχεία, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον Δρ. Ιωάννη Κανάκη, συμβασιούχο Λέκτορα Π.Δ. 407/80, για την παροχή υποδείξεων στον τρόπο εργασίας και στη χρήση του εργαστηριακού εξοπλισμού, βοήθεια, που κατέστη απαραίτητη για την ολοκλήρωση της εργασίας μου, σε τομείς καθόλα αγνώστους προς εμένα.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη από το Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για τη συλλογή κι επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων του συμπλόκου φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με εκχύλισμα οίνου.

Για το ιδιαίτερα ευχάριστο και φιλικό κλίμα εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ερευνητική ομάδα του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και πιο συγκεκριμένα τις κ.κ. Ζωή Καρούλια, Γεωργία Μπάτρα, Ιωάννα Μύρτζιου και Χριστίνα Σιούτα κι ιδιαίτερα τον κ. Κωνσταντίνο Δελή, συμβασιούχο Λέκτορα Π.Δ. 407/80, Βιοτεχνολογίας- Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών.

Τέλος, θα επιθυμούσα να τονίσω ότι η εργασία μου δε θα είχε έλθει εις πέρας δίχως τη συναισθηματική υποστήριξη και την οικονομική αρωγή της οικογενείας μου, στην οποία κι αφιερώνω την παρούσα εργασία, καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 ΔΙΑΒΗΤΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ	12
1.2 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1	14
1.3 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2	17
1.4 Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	22
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
2.1 ΓΛΥΚΟΖΗ.....	24
2.2 ΓΛΥΚΟΓΟΝΟ.....	26
2.2.1 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου	27
2.2.2. Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	30
2.2.3 Ο ρόλος της γλυκόζης	31
2.3 ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	32
2.3.1 Ρύθμιση της δραστικότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	35
2.3.2 Κρυσταλλική δομή της GP.....	41
2.3.3 Κέντρα σύνδεσης της GP.....	43
2.4 ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΜΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	46
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ b ΑΠΟ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΜΥΣ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ	48
3.2 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ b ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	54
3.2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστικότητας της GPb.....	54
3.2.2 Προσδιορισμός Km της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου	57

3.2.3 Προσδιορισμός IC50 του εκχυλίσματος οίνου b10 ως προς την κατεχίνη	60
3.2.4. Προσδιορισμός K _i του αναστολέα.....	61
3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΡΟΥ.....	62
3.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-Grafit.....	63
3.4.1 Υπολογισμός των αρχικών ταχυτήτων (v) και των τυπικών αποκλίσεων (σ ₂).....	63
3.4.2 Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων V _{max} και K _m και των τυπικών αποκλίσεων (σ ₂)	64
3.4.3 Υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K _i	65
3.5 ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ b ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ.....	68
3.6 ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	71
3.6.1. Επιλογή κρυστάλλων και διαλύματος εργασίας	71
3.6.2 Τοποθέτηση του κρυστάλλου στους τριχοειδείς σωλήνες.....	73
3.6.3 Έκθεση του κρυστάλλου στις ακτίνες X	75
3.6.4 Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων	78
3.6.5. Βελτιστοποίηση του πρωτεϊνικού μοντέλου	79
3.6.6 Έλεγχος αξιοπιστίας του πρωτεϊνικού μοντέλου	80
3.6.7. Δομική ανάλυση των συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα	84
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	86
4.1 ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	87
4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ b ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	89
4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ.....	90
4.3.1.Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου	90
4.3.2 Κινητική μελέτη του εκχυλίσματος οίνου b10.....	93
4.3.3 Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής K _i της κατεχίνης	94
4.3.4 Κρυσταλλογραφική μελέτη	97
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	103
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	105

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές, εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δε διατηρούνται σταθερά. Με σκοπό τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακός στόχος για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για κάποιο κέντρο σύνδεσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενδυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Προς αυτήν την κατεύθυνση, το ένζυμο της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, απομονώσαμε το ένζυμο φωσφορυλάση β του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μυς κουνελιού και μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση εκχυλίσματος οίνου στην ενζυμική του δραστηριότητα. Τα πειράματα έδειξαν πως το εκχύλισμα προκαλεί ισχυρή αναστολή της δράσης του ενζύμου. Με στόχο την ανίχνευση του ενεργού συστατικού του εκχυλίσματος διεξήχθη κρυσταλλογραφική μελέτη με εμπότισμό κρυστάλλων της GPb με διάλυμα του εκχυλίσματος η οποία αποκάλυψε πως το ενεργό συστατικό είναι η κατεχίνη η οποία συνδέεται στο νέο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Κινητικές μελέτες με κατεχίνη έδειξαν πως η ένωση αποτελεί ισχυρό μη συναγωνιστικό αναστολέα του ενζύμου με σταθερά αναστολής K_i 13.9 μ M. Ανάλυση της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου GPb-κατεχίνης αποκάλυψε τη μοριακή βάση της αναστολής. Η κατεχίνη κατά τη σύνδεση της στο νέο αλλοστερικό κέντρο της GPb σχηματίζει 2 δεσμούς υδρογόνου και συμμετέχει σε 76 αλληλεπιδράσεις van der Waals με αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης και ο δακτύλιος του ναφθυλίου προσανατολίζεται προς τις υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες των γειτονικών αμινοξέων. Η παρούσα μελέτη μπορεί να αποτελέσει την αφετηρία για το σχεδιασμό νέων ενώσεων, χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο ένωση την κατεχίνη, οι οποίες θα συνδέονται στο νέο αλλοστερικό κέντρο. Μελέτες μοντελισμού προς αυτήν την κατεύθυνση είναι σε εξέλιξη.

ABSTRACT

Diabetes mellitus, one of the more serious hormonal imbalance diseases is characterised by elevated blood glucose levels. With the aim of treating this pathological state, enzymes and substrates involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets for the rational structure-based design of potential hypoglycaemic drugs. Previous studies have shown that hepatic glycogen phosphorylase represents an important molecular target for the design of novel hypoglycaemic drugs.

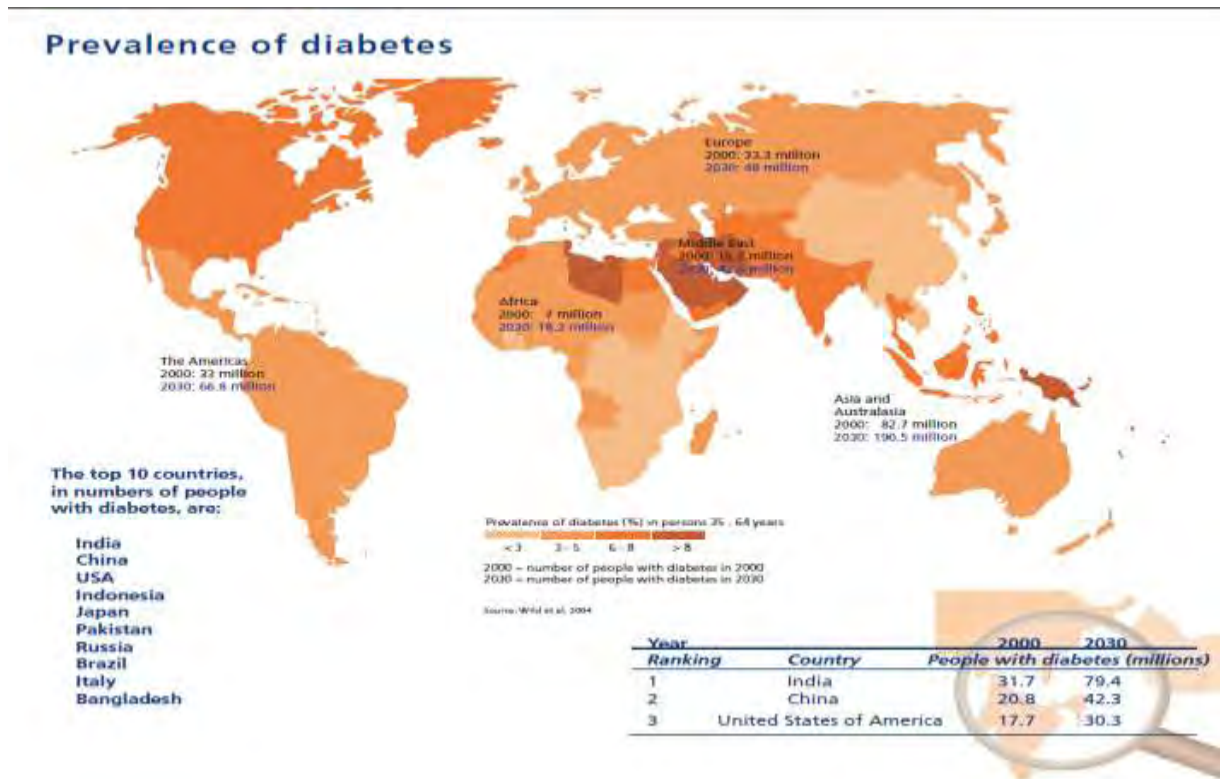
In this study, we isolated the enzyme glycogen phosphorylase b (GPb) from rabbit skeletal muscles and examined with kinetic experiments the effect of a wine extract in its enzymatic activity. It was found that this wine extract was a potent inhibitor of the enzyme. In order to identify the active ingredient of the extract we perform crystallographic experiments with GPb crystals soaked with the wine extract. These experiments identified catechin as the active ingredient since it was found bound at the new allosteric site of the enzyme. A kinetic study of GPb with pure catechin showed that this compound is a potent non-competitive inhibitor of the enzyme with a K_i value of $13.9 \mu\text{M}$. Structural analysis of the GPb-catechin complex revealed the molecular basis of the catechin inhibition. Catechin upon binding to the new allosteric site forms 2 hydrogen bonds and participates in 76 van der Waals interactions with protein residues while the naphthalene ring is directed towards a hydrophobic pocket of the binding site. This study has showed that catechin can be the starting point for the design of new more potent compounds, for the new allosteric binding site and modeling studies are currently underway.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο διαβήτης αποτελεί ασθένεια γνωστή από την αρχαιότητα. Ως πρώτη περιγραφή του διαβήτη θεωρείται εκείνη που βρέθηκε σε χειρόγραφο της αρχαίας Αιγύπτου, γνωστό μέχρι σήμερα ως „πάπυρος Ebers“ (1500 π.Χ.). Ο πρώτος όμως που ονόμασε τη νόσο „Διαβήτη“ είναι ο μεγάλος Έλληνας ιατρός της αρχαιότητας Αρεταίος ο Καππαδόκης (περίπου 120-200 μ.Χ.). Ο Αρεταίος δίνει στη νοσηρά αυτή κατάσταση το όνομα „Διαβήτης“ από το ρήμα „διαβαίνω“. Έτσι, με τον όρο αυτό αναφέρεται σε ένα από τα κυριότερα συμπτώματα της νόσου, δηλαδή την πολυουρία, καθώς ο όρος διαβήτης σημαίνει πως το νερό που ακατάπαυστα πίνει ο άρρωστος για να κατασιγάσει το έντονο αίσθημα δίψας του „διαβαίνει“ σαν μέσα από σιφώνιο αναλλοίωτο. Το 1675 ο Thomas Willis πρόσθεσε τη λέξη „mellitus“, από την ελληνική λέξη „μέλι“, όταν διαπίστωσε πως τα ούρα και το αίμα ενός διαβητικού έχουν γλυκιά γεύση. Αρκετά χρόνια αργότερα (1922), ήρθε στο φως η ινσουλίνη, η οποία βρέθηκε ότι είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Όταν αυτά τα επίπεδα απορρυθμίζονται, εκδηλώνεται το λεγόμενο Διαβητικό Σύνδρομο που περιλαμβάνει διάφορες μορφές του Σακχαρώδους Διαβήτη, μια από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές.

Παρά τις φιλόδοξες όμως προσπάθειες για εύρεση ικανοποιητικής θεραπείας έναντι του διαβήτη, η μεταβολική τούτη νόσος συνεχίζει να μαστίζει στις μέρες μας περισσότερο από κάθε άλλη φορά, καθώς τα ποσοστά στα οποία απαντάται της επιτρέπουν να θεωρείται ως «η επιδημία της εποχής μας». Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το Διαβήτη (IDF), 194 εκ. άνθρωποι υποφέρουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως και αυτός ο αριθμός προβλέπεται να αυξηθεί σε 333 εκ. το 2025. Στην Ευρώπη, σύμφωνα με τα στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, το 2000 υπήρχαν 33 εκ. άτομα με διαβήτη, ενώ προβλέπεται ότι το 2030 ο αριθμός αυτός θα φτάσει τα 48 εκ. Ινδία, Κίνα, ΗΠΑ, Ινδονησία, Ιαπωνία, Πακιστάν, Ρωσία, Βραζιλία, Ιταλία και Μπαγκλαντές είναι οι πρώτες δέκα χώρες σε αριθμό ασθενών με διαβήτη (Σχήμα 1).

Στην Ελλάδα το ποσοστό του πληθυσμού που φαίνεται να πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη είναι περίπου 10% και η χώρα μας βρίσκεται στις πρώτες θέσεις στην ΕΕ κατανάλωσης φαρμάκων έναντι του σακχαρώδη διαβήτη [Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας, <http://www.ifet.gr/diabetes2005IFET.pdf>].



Σχήμα 1. Οι πρώτες δέκα χώρες σε αριθμό ασθενών με διαβήτη και τα αναμενόμενα ποσοστά τους έως το 2030. (Σύμφωνα με το International Diabetes Federation).

Η αυξανόμενη απειλή του διαβήτη οφείλεται σε ένα συνδυασμό παραγόντων που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής: ανθυγιεινή διατροφή, έλλειψη σωματικής άσκησης, επιβλαβής χρήση του αλκοόλ και του καπνού, καθώς και παχυσαρκία. Η κατάσταση είναι εξαιρετικά κρίσιμη, διότι ο διαβήτης συνδέεται στενά με τις καρδιαγγειακές παθήσεις.

1.1 ΔΙΑΒΗΤΙΚΟ ΣΥΝΔΡΟΜΟ

Μέσα στον όρο διαβητικό σύνδρομο περιλαμβάνονται περίπλοκες μεταβολικές διαταραχές, ποικίλης αιτιολογίας και με διαφορετική κλινική έκφραση. Στην ενότητα του συμπλέγματος των συνδρόμων που απαρτίζουν το σακχαρώδη διαβήτη περιέχονται νοσολογικές οντότητες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών. Κεντρική κοινή διαταραχή σε όλες τις μορφές του σακχαρώδη διαβήτη αποτελεί η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος και η διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης. Επιπλέον, όλες οι μορφές διαβήτη συνδέονται παθολογοανατομικά με μικροαγγειοπάθεια, μακροαγγειοπάθεια και διάφορες άλλες επιπλοκές μικτής αιτιολογίας, συμπεριλαμβανόμενων της νεφροπάθειας, επιπλοκών στην κύηση και αυξημένη ευαισθησία στις λοιμώξεις [Σ. Α. Ράπτης 2006].

Στον παρακάτω πίνακα (Σχήμα 2) εμφανίζεται η ταξινόμηση για το σακχαρώδη διαβήτη με βάση την αιτιολογία, όπως είχε προταθεί από την Ομάδα Εργασίας της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ) το 1985, και την οποία αποδεχόταν μέχρι πρόσφατα η διεθνής διαβητολογική κοινότητα.

I. Τύπος 1 ΣΔ (βλάβη των β-κυττάρων, η οποία οδηγεί σε απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης)	7. Άλδοστερόνομα
A. Αυτοάνοκος	8. Άλλοι
B. Ιδιοπαθής	E. Φάρμακα-χημικοί παράγοντες
II. Τύπος 2 (με επικράτηση της ινσουλινοαντίστασης και σχετικής έλλειψης ινσουλίνης ή με επικράτηση της έλλειψης ινσουλίνης και σχετικής ινσουλινοαντίστασης)	1. Vasog
III. Άλλοι ειδικοί τύποι.	2. Πενταμιδόνη
A. Γενετικές ανωμαλίες της λειτουργίας των β-κυττάρων	3. Νικοτινικό οξύ
1. χρωμόσωμα 12, JMF-1a (MODY 3)	4. Γλυκοκορτικοειδή
2. χρωμόσωμα 7, γλυκοκινίαση (MODY 2)	5. Θυροειδικές ορμόνες
3. χρωμόσωμα 20, HMF-4a (MODY 1)	6. Διαζοξιδή
4. DNA μιτοχondρίων	7. β-αδρενεργικοί αγωνιστές
5. Άλλοι	8. Θειαζίδες
B. Γενετικές ανωμαλίες της δράσης της ινσουλίνης	9. Dilantin
1. Τύπος A ινσουλινοαντίστασης	10. α-Γινεραφερόνη
2. Λεπρεχονισμός	ΣΤ. Λοιμώξεις
3. Σύνδρομο Rabson-Mendenhal	1. Συγγενής ερυθρά
4. Λιποκυρωτικός διαβήτης	2. Κυταρομεγαλοϊός
5. Άλλοι	3. Άλλες
Γ. Νοσήματα της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος	Z. Σπάνιες μορφές ανοκολογικού τύπου ΣΔ
1. Παγκρεατίτι	1. Σύνδρομο "Stiff-man"
2. Τριτάριμα-παγκρεατεκτομή	2. Πενταμιδόνη
3. Νεοπλασμάτα	3. Άλλοι
4. Κυστική ίνωση	H. Άλλα γενετικά σύνδρομα που συσχετίζονται μερικές φορές με ΣΔ
5. Αιμοχρωμάτωση	1. Σύνδρομο Down
6. Ινσουλινική παγκρεατοπάθεια	2. Σύνδρομο Klinefelter
7. Άλλοι	3. Σύνδρομο Turner
Δ. Ενδοκρινολογικές	4. Σύνδρομο Wolfram
1. Ακρομεγαλία	5. Αταξία Friedreich
2. Σύνδρομο Cushing	6. Χορία Huntington
3. Γλυκαγόνομα	7. Σύνδρομο Lawrence Moon Beidel
4. Φαιοχρωμοκύττωμα	8. Μυοτονική δυστροφία
5. Υπερθυρεοειδισμός	9. Πορφυρία
6. Σωματοστατίνωμα	10. Σύνδρομο radel Willi
	11. Άλλα
	Θ. Σακχαρώδης Διαβήτης κνήσεως (GDM)

Σχήμα 2. Αιτιολογική Ταξινόμηση του Σακχαρώδη Διαβήτη.

1.2 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 1

Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1, παλαιότερα γνωστός ως IDDM (Insulin Dependent Diabetes Mellitus) ορίζεται το μεταβολικό εκείνο σύνδρομο, το οποίο χαρακτηρίζεται από ολική ή μερική ένδεια ινσουλίνης και ως εκ τούτου από την απόλυτη εξάρτηση χορήγησης εξωγενούς ινσουλίνης. Επιπλέον, η νόσος χαρακτηρίζεται από αιφνίδια κλινική εισβολή και τάση για ανάπτυξη κέτωσης. Ο διαβήτης τύπου 1 αποτελεί το 5-10% όλων των μορφών διαβήτη, ενώ οι περισσότερες από τις λοιπές περιπτώσεις αφορούν στον τύπου 2 διαβήτη.

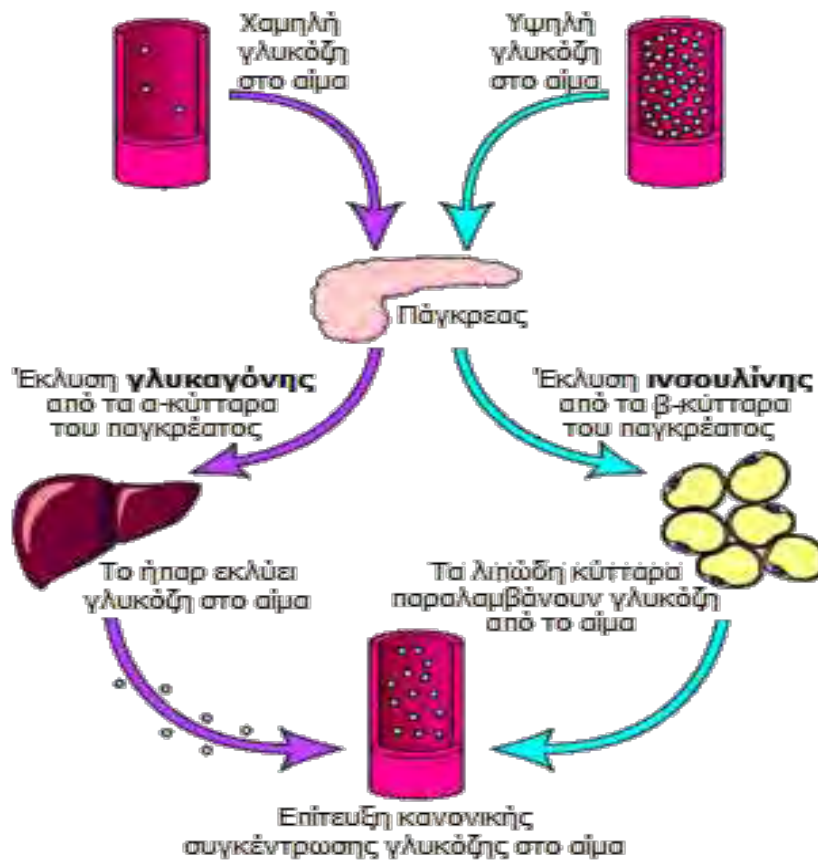
Η παθοφυσιολογία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 είναι πολυπαραγοντική. Η νόσος έχει συσχετιστεί τόσο με αυτοάνοσους και γενετικούς παράγοντες όσο και με παράγοντες από το περιβάλλον, ενώ επίσης έχει ενοχοποιηθεί η χρόνια αλληλουχία τις καταστροφής των β-κυττάρων του παγκρέατος και επομένως η ανεπάρκεια της ινσουλίνης ως απόρροια όλων των παραπάνω.

Η εισβολή της νόσου στους διαβητικούς τύπου 1 είναι συνήθως απότομη. Η διάγνωση τίθεται σχεδόν πάντα βάσει της συμπτωματολογίας και επιβεβαιώνεται από την παρουσία τιμών γλυκόζης στο πλάσμα υψηλότερων των 200mg/dl, μαζί με γλυκοζουρία και συχνά κετονουρία. Η κλασική συμπτωματολογία συνίσταται σε πολυουρία, πολυδιψία, απώλεια βάρους παρά την κανονική ή και αυξημένη πρόληψη τροφής, κόπωση και θόλωση της όρασης. Τυπικά η συμπτωματολογία προηγείται 4 έως 12 εβδομάδες πριν ο ασθενής αναζητήσει ιατρική βοήθεια [Σ. Α. Ράπτης 2006].

Αντιμετώπιση – Θεραπεία

Η ανακάλυψη της ινσουλίνης το 1922 αποτέλεσε ένα από τα σημαντικότερα γεγονότα στην ιστορία της ιατρικής και φαρμακευτικής. Η ινσουλίνη εκκρίνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος που αποτελούν το 60-85% των κυττάρων των νησιδίων Langerhans. Τα β-κύτταρα "διεγείρονται" από τα μόρια γλυκόζης και η δράση της ινσουλίνης είναι ξεκάθαρα αναβολική. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, τόσο αυξάνει ο

ρυθμός έκκρισης ινσουλίνης. Με τη σειρά της η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα είδη κυττάρων του οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα. Χωρίς την ινσουλίνη τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη που αποτελεί την κύρια πηγή χημικής ενέργειας. Επιπλέον, η ινσουλίνη προκαλεί την "αποταμίευση" γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ υπό τη μορφή γλυκογόνου (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Βιολογικός ρόλος ινσουλίνης (www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_insulin.htm).

Εάν το ήπαρ "κορεσθεί" σε γλυκογόνο, η γλυκόζη αρχίζει να κατευθύνεται στα λιπώδη κύτταρα όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και γλυκερόλης και τελικά τριγλυκεριδίων. Η ινσουλίνη "καθοδηγεί" τα κύτταρα, όταν αυτά αναζητούν ενέργεια, να καταναλώσουν γλυκόζη αντί λιπαρών οξέων–και επομένως εμπλέκεται στους μηχανισμούς συσσώρευσης λίπους στο σώμα. Πέραν της εμπλοκής της ινσουλίνης στο ισοζύγιο σακχάρου/λίπους, η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη αμινοξέων για σχηματισμό πρωτεϊνών, ενώ η έλλειψή της (όπως π.χ. σε καταστάσεις νηστείας) οδηγεί σε κατανάλωση και αλλοίωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών.

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

1.3 ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ 2

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 γνωστός παλαιότερα και ως NIDDM (Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus) συνήθως συνδυάζεται με παχυσαρκία, ενώ υπάρχει μικρότερη πιθανότητα εμφάνισης κετοξέωσης και απουσιάζει η απόλυτη εξάρτηση από την ινσουλίνη για επιβίωση. Σήμερα ως διαβήτης τύπου 2 ορίζεται το μεταβολικό σύνδρομο, του οποίου το φάσμα εκτείνεται από την εμφάνιση ινσουλινοαντοχής ως κύριας εκδήλωσης με σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης, έως τη διαταραχή στην έκκριση της ινσουλίνης με αντίσταση στην ινσουλίνη.

Η υιοθέτηση του δυτικού τρόπου ζωής με την υψηλή πρόσληψη λιπών και τη μείωση της σωματικής δραστηριότητας, έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση παχυσαρκίας με άμεσο επακόλουθο την εγκατάσταση αντίστασης στην ινσουλίνη. Η επίκτητη αυτή αντίσταση στην ινσουλίνη σε συνδυασμό με την γενετικά προκαθορισμένη μειονεκτική ικανότητα για αύξηση της έκκρισης της ινσουλίνης οδηγεί στην εγκατάσταση της νόσου.

Παθοφυσιολογία

Η παθογένεση του NIDDM είναι σύνθετη. Η ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη, που αποτελεί το πρώτο χαρακτηριστικό της νόσου, αρχικά εξουδετερώνεται σε ένα βαθμό από την αύξηση της παραγωγής ινσουλίνης από τα β- κύτταρα του παγκρέατος (υπερινσουλιναίμια) [DeFronzo, 1997]. Στη συνέχεια όμως καθώς τα β- κύτταρα 'εξαντλούνται' το συνδυασμένο φαινόμενο αντίστασης και μείωσης απελευθέρωσης της ινσουλίνης ελαττώνει τη γλυκόζη που λαμβάνεται και χρησιμοποιείται από το σκελετικό μυ και εμποδίζει την καταστολή της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση υπεργλυκαιμίας (αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα) [Bailey, 2000]. Στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 δεν παρατηρείται υπερπλασία των β-κυττάρων ή και των νησιδίων, όπως θα αναμενόταν από τη χρόνια

υπεργλυκαιμία. Τουναντίον η μάζα των β-κυττάρων είναι μειωμένη κατά 40-60% του φυσιολογικού.

Οι χαρακτηριστικές χρόνιες επιπτώσεις του NIDDM δεν οφείλονται μόνο στην υπεργλυκαιμία. Η κατάσταση αυτή συνδυάζεται και με την αντίσταση στην ινσουλίνη η οποία εμπλέκεται στην παθογένεση και άλλων σημαντικών ασθενειών όπως αθηροσκληρωτική καρδιακή νόσος και δυσλιπιδαιμία. Οι ιστοί που κυρίως επηρεάζονται από την αντίσταση στην ινσουλίνη είναι το ήπαρ και ο μυϊκός ιστός. Έτσι, παρά την υπεργλυκαιμία, το ήπαρ συνεχίζει να παράγει γλυκόζη, ενώ οι μύες παρουσιάζουν μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης. Από νεώτερα δεδομένα φαίνεται ότι και ο λιπώδης ιστός επηρεάζεται στο διαβήτη τύπου 2, με αυξημένη παροχή ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ και στους μυς, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο αυξημένη γλυκονεογένεση και μειωμένη οξειδωση της γλυκόζης στους μυς, συντελώντας ακόμα περαιτέρω στη δημιουργία υπεργλυκαιμίας [Σ. Α. Ράπτης].

Ο διαβήτης επηρεάζει επίσης τις αρτηρίες του αίματος και την καρδιά αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα καρδιακών παθήσεων, εμφράγματος και άλλων προβλημάτων, όπως γάγγραινα, που οφείλονται στην κακή κυκλοφορία. Επίσης θεωρείται ως η κύρια αιτία τύφλωσης και νεφρικής ανεπάρκειας των ενηλίκων [Moller, 2001].

Κλινική εικόνα

Ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται από απουσία κλινικών συμπτωμάτων επί σειρά ετών και βαθμιαία εισβολή της νόσου με παρουσία πολυουρίας και πολυδιψίας, για αρκετές εβδομάδες ή και μήνες πριν την επίσημη έναρξη του. Πολυφαγία παρουσιάζεται σπανιότερα, ενώ απώλεια βάρους, κόπωση, αδυναμία και λοίμωξη εμφανίζονται αρκετά συχνά. Όχι σπάνια οι ασθενείς παραπονούνται για κεφαλαλγία, ζάλη και θάμβος όρασης.

Αντιμετώπιση – Θεραπεία

Ο έλεγχος του NIDDM επιτυγχάνεται κυρίως με την κατάλληλη διαίτα και τη σωματική άσκηση, σε ορισμένες όμως περιπτώσεις είναι απαραίτητη και η θεραπευτική αγωγή, προκειμένου να μειωθούν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Συγκεκριμένα στις μέρες μας χορηγούνται κυρίως τα παρακάτω θεραπευτικά ανάλογα:

- Σουλφονουλουρίες
- Διγουανίδια
- Αναστολείς των α- γλυκοσιδασών
- Θειαζολιδινεδιόνες
- Γλινίδες

Οι διάφορες κατηγορίες των αντιδιαβητικών δισκίων στοχεύουν στη βελτίωση και στην εξομάλυνση της χρησιμοποίησης της γλυκόζης. Ο στόχος αυτός, ανάλογα με την κατηγορία που υπάγονται τα αντιδιαβητικά δισκία, επιτυγχάνεται με:

1. Μείωση του σωματικού βάρους.
2. Φαρμακευτική διέγερση της έκκρισης της ινσουλίνης.
3. Φαρμακευτική καθυστέρηση της μεταγευματικής ανόδου της γλυκόζης.
4. Επιτάχυνση της χρησιμοποίησης της γλυκόζης, χωρίς επίδραση στη διαταραγμένη έκκριση της ινσουλίνης.
5. Δράση στους ινσουλινικούς υποδοχείς της περιφέρειας.

Η δράση των διάφορων φαρμακευτικών ουσιών που χορηγείται σήμερα στους διαβητικούς είναι η ακόλουθη:

Ινσουλίνη. Καταστέλλει την παραγωγή της γλυκόζης, ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την χρησιμοποίηση της από τα κύτταρα.

Σουλφονουρίες. Ο κύριος μηχανισμός δράσης των σουλφονουριών είναι η διέγερση της έκκρισης της ινσουλίνης από το πάγκρεας. Η διέγερση αυτή πιθανότατα επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης της ευαισθητοποίησης των β-κυττάρων στη γλυκόζη.

Διγουανίδια. Τα διγουανίδια ουσιαστικά δρουν ως „αντιυπεργλυκαιμικά“, και αυτό επειδή η δράση τους εμφανίζεται χωρίς διέγερση της έκκρισης ινσουλίνης αλλά μέσω αυξημένης κατανάλωσης της γλυκόζης στην περιφέρεια. Δρουν πρωτίστως καταστέλλοντας την παραγωγή ηπατικής γλυκόζης μέσω της αναστολής της γλυκονεογένεσης. Επίσης, φαίνεται να επάγουν την απώλεια σωματικού βάρους και μάλιστα, κατά προτίμηση την απώλεια λιπώδους ιστού.

Αναστολείς των α-γλυκοσιδασών. Ο αναστολέας των α-γλυκοσιδασών ή ασκαρβόζη επιτυγχάνει ικανοποιητικότερο γλυκαιμικό έλεγχο. Η ασκαρβόζη αναστέλλοντας τα εντερικά ένζυμα και συγκεκριμένα τις α-γλυκοσιδάσες, γλυκοαμυλάση και σακχαράση, καθυστερεί τη διάσπαση των δισακχαριτών και πολυσακχαριτών σε μονοσακχαρίτες ή γλυκόζη στο έντερο και την απορρόφησή τους. Ως φυσικό επακόλουθο, μειώνεται η μεταγευματική υπεργλυκαιμία.

Αγωνιστές του υποδοχέα γ του υπεροξειδιοσώματος (PPARγ), θειαζολιδινεδιόνες (Γλιταζόνες). Ο πρωταρχικός μηχανισμός δράσης των φαρμάκων αυτών είναι η ευαισθητοποίηση των μυϊκών κυττάρων στη δράση της ινσουλίνης, μέσω ενεργοποίησης ενδοκυττάρων υποδοχέων, επικουρώντας με αυτόν τον τρόπο στην παράκαμψη της ινσουλινοαντοχής στους μυς, μειώνοντας ταυτόχρονα την αντίσταση της ινσουλίνης τόσο στο λιπώδη ιστό όσο και στο ήπαρ. Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός δράσης αυτών των φαρμάκων παραμένει ασαφής.

Γλινίδες. Δρούν όπως και οι σουλφονουλιδες ως εκκριματογωγά, κλείνοντας τους ευαίσθητους στην τριφωσφορική αδενοσίνη διαύλους καλίου στα παγκρεατικά β-κύτταρα, προκαλώντας εκπόλωση και έκλυση ινσουλίνης κατά γλυκοζοεξαρτώμενο τρόπο.

Μιμητικά της ινκρετίνης. Ως „δράση της ινκρετίνης“ αποδίδεται ο δυνητικός ρόλος των εντερικών πεπτιδίων-στη ρύθμιση της μεταγευματικής έκκρισης ινσουλίνης και της ρύθμισης της γλυκόζης, που οφείλεται στη δραστηριότητα δύο κυρίως ορμονών του εντέρου: του GIP (Glucose- dependent Insulinotropic Polypeptide) και του GLP-1(Glucagon-Like Peptide- 1).

Ωστόσο, οι παρενέργειες που προκαλεί η θεραπεία με τα φάρμακα αυτά στην πραγματικότητα υπερισχύουν έναντι του όφελους που υπάρχει. Έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς, που έκαναν χρήση των παραπάνω φαρμάκων, παρουσίασαν σοβαρά προβλήματα παχυσαρκίας, υπογλυκαιμίας ακόμα και αντίστασης στην ινσουλίνη [Bailey, 2000]. Επιπλέον οι σουλφονουλιδες σταματούν να έχουν ικανοποιητική δράση όταν χορηγούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα στους ίδιους ασθενείς. Στην περίπτωση αυτή είναι απαραίτητη η χορήγηση ενός πιο δραστικού φαρμάκου [Moller, 2001].

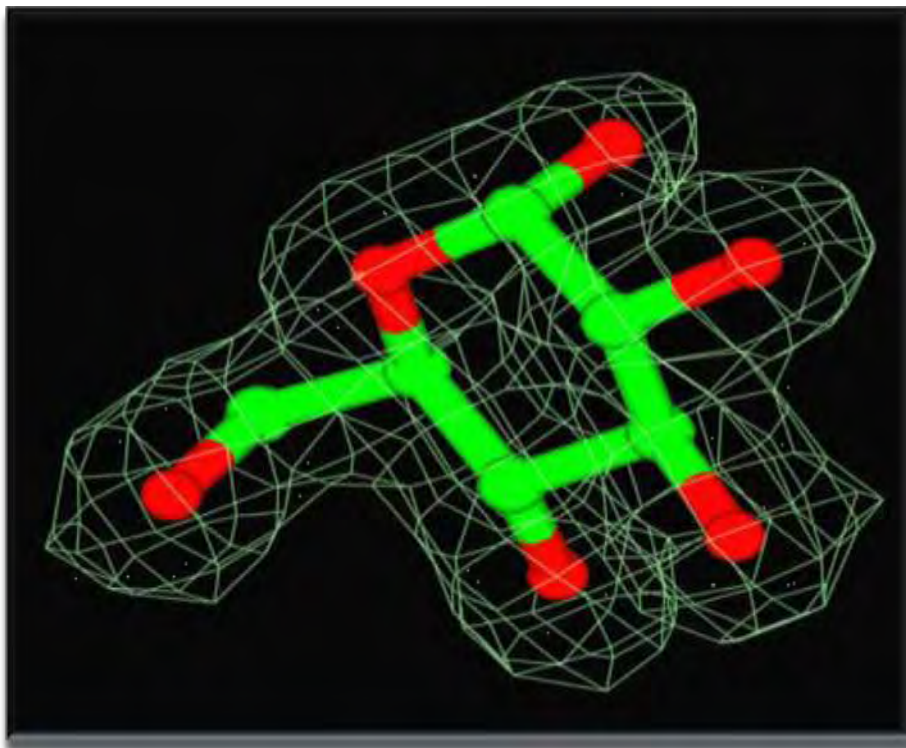
1.4 Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΣΤΟΧΟΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Καθώς οι ήδη υπάρχουσες θεραπευτικές αγωγές για το διαβήτη τύπου 2 δεν είναι ικανοποιητικές, τα τελευταία χρόνια έχει εκδηλωθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την εύρεση ενός άλλου δραστικού και ασφαλούς τρόπου ρύθμισης των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Μια μοριακή προσέγγιση στοχεύει στην μείωση παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ με αναστολή της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP). Η GP είναι ένα ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται ως στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos, 2002].

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΓΛΥΚΟΖΗ

Η γλυκόζη είναι μονοσακχαρίτης με 6 άτομα άνθρακα (εξόζη) και η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη [Stryer,1997].



Σχήμα 4. Τρισδιάστατη απεικόνιση του μορίου της γλυκόζης στην ηλεκτρονιακή της πυκνότητα (Alexacou et al., 2008).

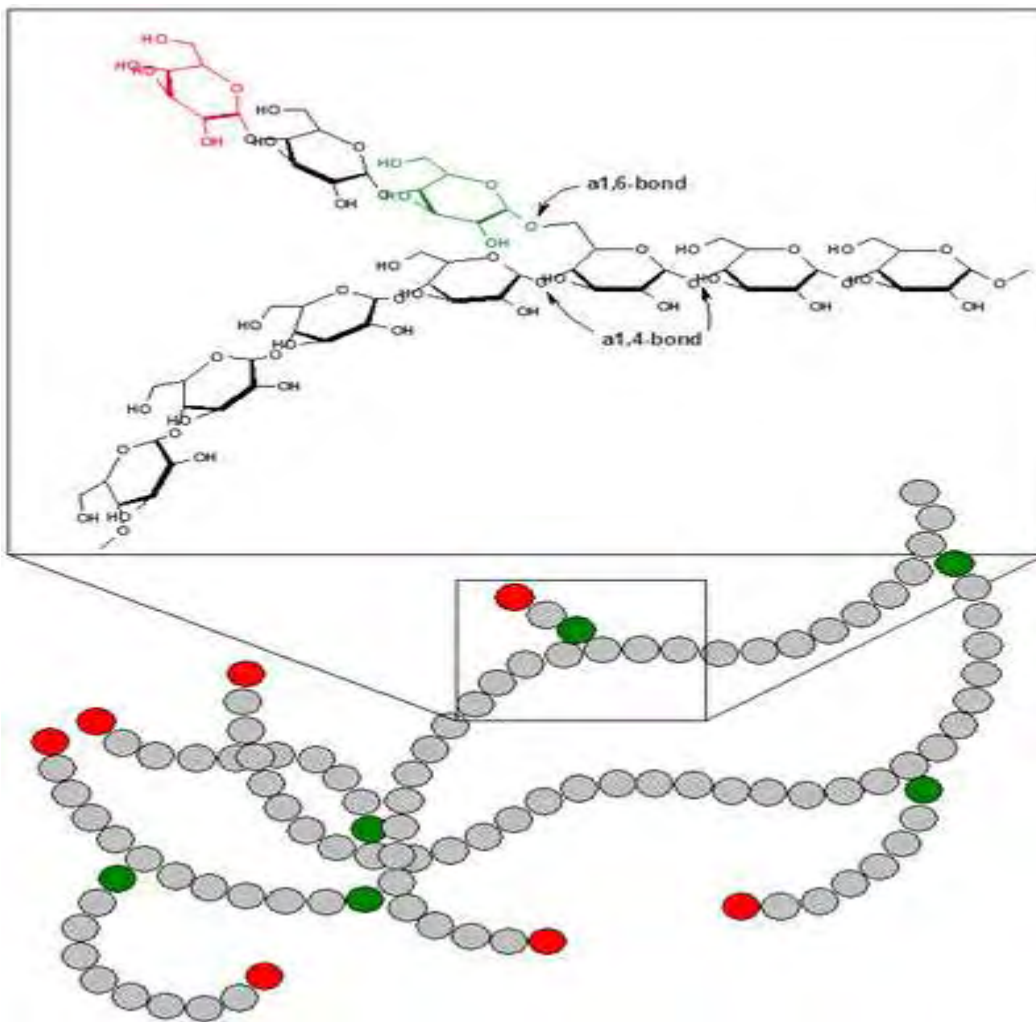
Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη [Stryer, 1997]. Η αλληλουχία αντιδράσεων, μέσω της οποίας η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό με ταυτόχρονη παραγωγή ATP, ονομάζεται γλυκόλυση. Σε αερόβιους οργανισμούς, η γλυκόλυση είναι το προοίμιο του κύκλου του κιτρικού οξέος και της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι δύο τελευταίες διεργασίες μαζί συλλέγουν την περισσότερη ενέργεια που περιέχεται στη γλυκόζη [Stryer,1997].

Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια ινσουλίνης [McArdle *et al.*, 2000]. Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο GP διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη [Martin *et al.*, 1998;90].

Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από τη δράση των επιμέρους ενζύμων, τη συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και ως αναστολείς, καθώς και τη διαιτητική κατάσταση του οργανισμού [McArdle *et al.*, 2000].

2.2 ΓΛΥΚΟΓΟΝΟ

Το γλυκογόνο είναι μια άμεσα κινητοποιημένη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Είναι ένα πολύ μεγάλο, διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει μόρια γλυκόζης όταν απαιτείται ενέργεια. Τα μόρια γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με α -1,4 και α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι δεσμοί α -1,6 υπάρχουν ανά περίπου 10 μόρια και είναι υπεύθυνοι για τις διακλαδώσεις του πολυμερούς [Stryer,1997].



Σχήμα 5. Σχηματική αναπαράσταση του γλυκογόνου.

Το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, καθώς η παρουσία του αυξάνει κατά πολύ την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων και κατά τη διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ από τους μύς (10% έναντι 2% κατά βάρος). Παρόλα αυτά, περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύς συνολικά, λόγω της μεγαλύτερης μάζας τους [Stryer,1997].

Η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς ρυθμίζουν το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα και παρέχουν αποθέματα γλυκόζης σε περίπτωση εξαντλητικής μυϊκής εργασίας. Τα διάφορα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στον μεταβολισμό του γλυκογόνου αποκρίνονται αλλοστερικά σε μεταβολίτες που σηματοδοτούν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Επιπλέον, ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται και ορμονικά μέσω διεγερόμενων καταρρακτών, οι οποίοι οδηγούν σε αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των ενζύμων που αλλάζει τις κινητικές τους ιδιότητες.

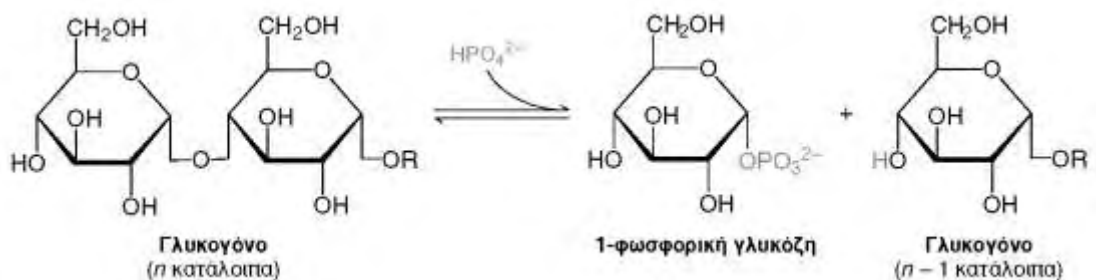
2.2.1 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου διαλευκάνθηκε από τους Carl & Gerty Cori. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi) προς απόδοση 1- φωσφορικής γλυκόζης. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP).

Η φωσφορυλάση καταλύει τη συνεχή διάσπαση και απομάκρυνση μορίων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ C-1 του τελικού μορίου και C-4 του γειτονικού διασπάται από το ορθοφωσφορικό. Ο

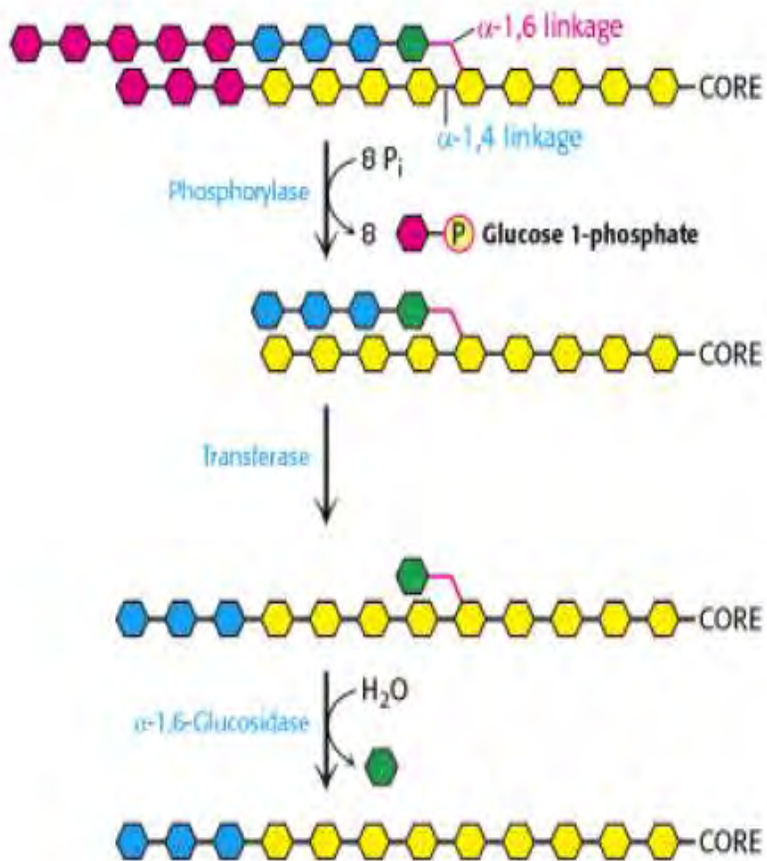
δεσμός μεταξύ του άνθρακα C-1 και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση του C-1 διατηρείται.

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



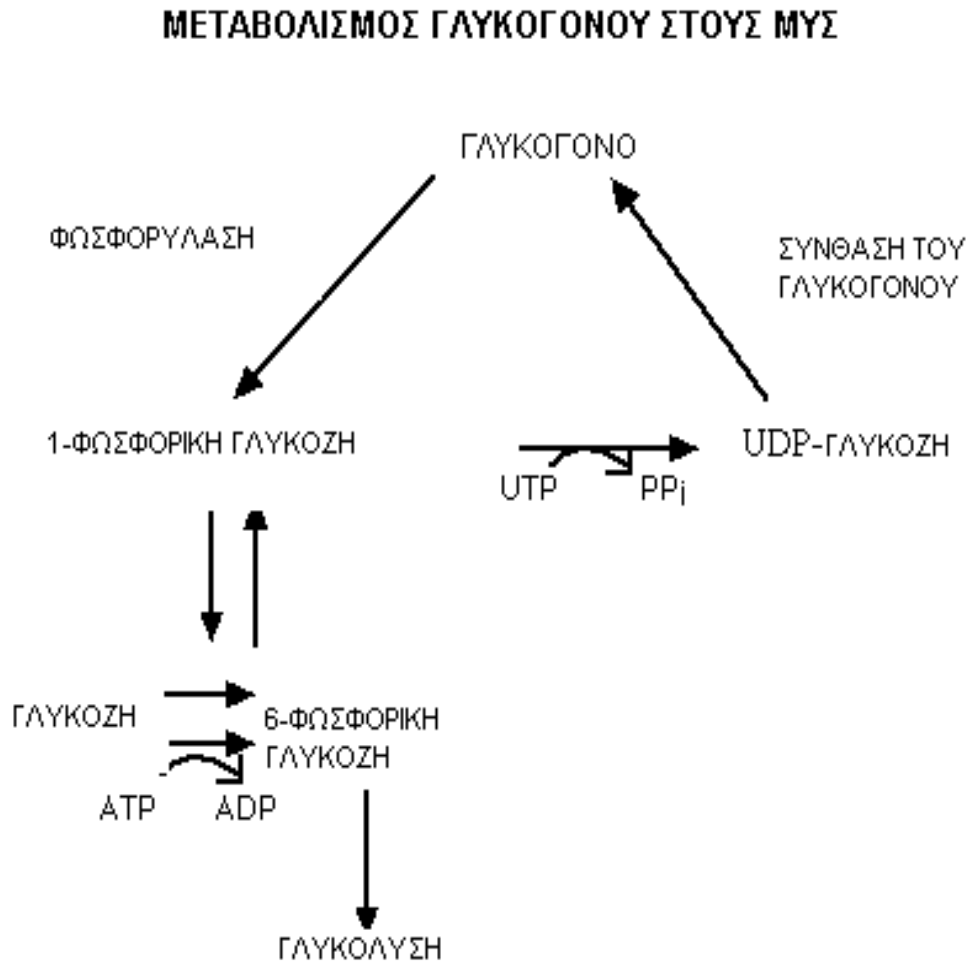
Σχήμα 6. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου (Stryer, 1997).

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8 ο λόγος ισορροπίας της συγκέντρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων προς τη συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης είναι 3.6 [Stryer,1997]. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου μπορεί να καταλύσει την απομάκρυνση μορίων γλυκόζης μέχρι 4 μόρια πριν από τη διακλάδωση. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση. Η μεταφοράση μεταφέρει τα 3 μόρια γλυκόζης που βρίσκονται πριν από τη διακλάδωση στον άλλο κλάδο του γλυκογόνου. Έτσι στον ένα κλάδο έχουν προστεθεί 3 επιπλέον μόρια, ενώ στο δεύτερο κλάδο έχει μείνει η μονάδα που σχηματίζει τον α- 1,6 δεσμό. Το ένζυμο αποδιακλάδωσης (γλυκοζιδάση α-1,6) υδρολύει το δεσμό α-1,6 μεταξύ των δύο καταλοίπων (Σχήμα 7). Με αυτόν τον τρόπο εκεί όπου υπήρχε διακλάδωση, σχηματίζεται ένας ευθύγραμμος κλώνος, πάνω στον οποίο μπορεί να δράσει η φωσφορυλάση [Stryer,1997].



Σχήμα 7. Τα στάδια της αποικοδόμησης του γλυκογόνου σχηματικά (Stryer, 1997).

2.2.2 Μεταβολισμός του γλυκογόνου



Σχήμα 8. Μεταβολισμός γλυκογόνου. Το γλυκογόνο αποικοδομείται από τη φωσφορυλάση γλυκογόνου και συντίθεται από τη συνθάση. Η σύνθεση του γλυκογόνου γίνεται με μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε UDP-γλυκόζη (υπόστρωμα στο οποίο δρα η συνθάση) και κατανάλωση του ΑΤΡ. Η 1-φωσφορική γλυκόζη που παράγεται από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη για να εισέλθει στον κύκλο της γλυκόλυσης.

2.2.3 Ο ρόλος της γλυκόζης

Ο έλεγχος της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι βασικό στοιχείο για τη ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα. Όταν εγχύεται γλυκόζη στην κυκλοφορία, η ποσότητα της φωσφορυλάσης στο αίμα μειώνεται αισθητά [Stryer,1997].

Στο ήπαρ, η γλυκόζη δρα συνεργατικά με την ινσουλίνη και αναστέλλει τη δράση της GPa, με αποτέλεσμα την ελάττωση της αποικοδόμησης και την παράλληλη αύξηση της σύνθεσης του γλυκογόνου. Η γλυκόζη σταθεροποιεί την T διαμόρφωση, η οποία είναι καλύτερο υπόστρωμα για την πρωτεϊνική φωσφατάση PP-1G. Η PP-1G καταλύει τη μετατροπή της GPa σε GPb, καθώς και την αποφωσφορυλίωση (ενεργοποίηση) της συνθάσης γλυκογόνου, αυξάνοντας τη σύνθεση του γλυκογόνου. Ενώσεις, συνεπώς, με ισχυρότερη ανασταλτική δράση είναι δυνατόν να μετατοπίζουν την ισορροπία αποικοδόμησης σύνθεσης γλυκογόνου προς την κατεύθυνση της σύνθεσης και, ως εκ τούτου, να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στην αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2, όπου η υπεργλυκαιμία αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα [Οικονομάκος, 2001].

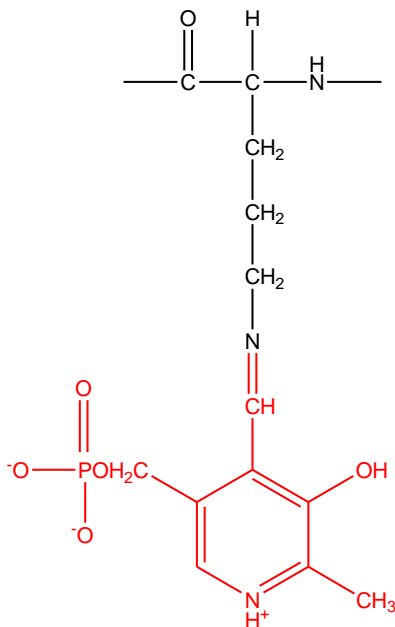
2.3 ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ανήκει στην τάξη των τρανσφερασών στην υπόταξη των γλυκοζυλοτρανσφερασών και στην υπο-υποτάξη των εξοζυλοτρανσφερασών, σύμφωνα με την IBU και IUPAC όσον αφορά την φύση της αντίδρασης που καταλύει και έχει συστηματική ονομασία 1,4- α -D- γλυκο φωσφορικό α -D- γλυκοτρανσφεράση [Barman, T.E.1969]. Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενδομοριακή χρήση. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση όπως γλυκόζης [Kurukulasuriya, 2003].

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη. Δομικά αποτελεί μια ομοδιμερή πρωτεΐνη, που αποτελείται από δύο υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kDa και χρησιμοποιεί ως προσθετική ομάδα για τη κατάλυση τη φωσφορική πυριδοξάλη. Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η δράση της φωσφορυλάσης επιτυγχάνεται μέσω της προσθετικής ομάδας, φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Η PLP σχηματίζει βάση Schiff με την ϵ -αμινομάδα της λυσίνης 680 της φωσφορυλάσης, (Σχήμα 9). Όταν η φωσφορυλάση έρχεται σε επαφή με ένα μόριο γλυκόζης του γλυκογόνου, η PLP δρα ως μεταφορέας ηλεκτρονίων και βοηθά στη δημιουργία ενός ενδιάμεσου καρβοκατιόντος. Η πορεία δύο βημάτων για την

απόσπαση ενός μορίου γλυκόζης που γίνεται λόγω της παρουσίας της PLP οδηγεί στη διατήρηση της γλυκόζης στην α-D- μορφή [Stryer,1997].



Σχήμα 9. Η φωσφορική πυριδοξάλη (κόκκινο) σχηματίζει μία βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Stryer, 1997).

Η κατάλυση της φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό κέντρο που εντοπίζεται σε μία κοιλότητα που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινοτελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Η κοιλότητα αυτή φέρνει σε γειτνίαση τα υπόστρωμα (γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ιόν) ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυσή του, αποκλείοντας τα μόρια του H₂O. Αυτό αποτελεί ένα μηχανισμό εξοικονόμησης ενέργειας.

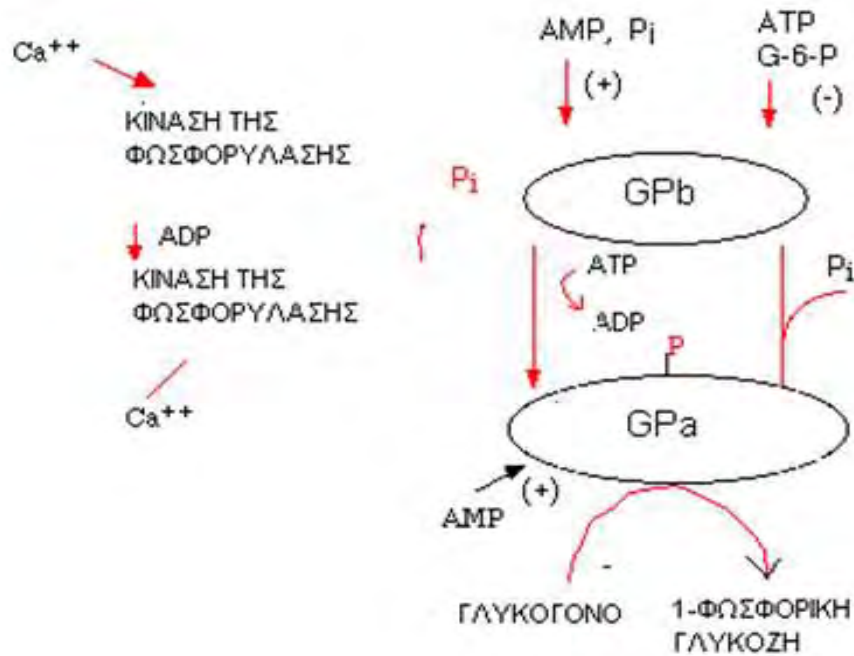
Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1- φωσφορική α-D- γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται πιθανότατα στο σχηματισμό του ανωμερικού

καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου φωσφορική πυριδοξάλη, που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε αμινομάδα της λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα ως δότης αλλά κι ως δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση [McLaughlin 1984].

Η 1-φωσφορική γλυκόζη μετά από ισομερείωση (από το ένζυμο φωσφογλυκομουτάση) μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Στην περίπτωση που η διάσπαση γίνεται στο ήπαρ, που στόχο έχει τη διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα σε κατάσταση υπεργλυκαιμίας, η 6-φωσφορική γλυκόζη υδρολύεται προς γλυκόζη (δράση φωσφατάσης 6-φωσφορικής γλυκόζης), η οποία και ελευθερώνεται στο αίμα με τη δράση της γλυκοτρανσφεράσης. Στο ήπαρ, εκτός από τη διάσπαση του γλυκογόνου λαμβάνει χώρα και η σύνθεση του που καταλύεται από τη συνθάση του γλυκογόνου και το ένζυμο διακλάδωσης (σχηματισμό α -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών). Αντίθετα, στους μύς και στον εγκέφαλο η διάσπαση του γλυκογόνου έχει στόχο την ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών, γι' αυτό και στους ιστούς απουσιάζει το ένζυμο υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης [Stryer 1997].

2.3.1 Ρύθμιση της δραστικότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί ένα από τα πλέον ενδιαφέροντα ένζυμα λόγω της ιδιαίτερης πολλαπλής ρύθμισης της δραστικότητάς της, (Σχήμα 10), που φανερώνει και τη πολυπλοκότητα του συστήματος της ρύθμισης του μεταβολισμού του γλυκογόνου.

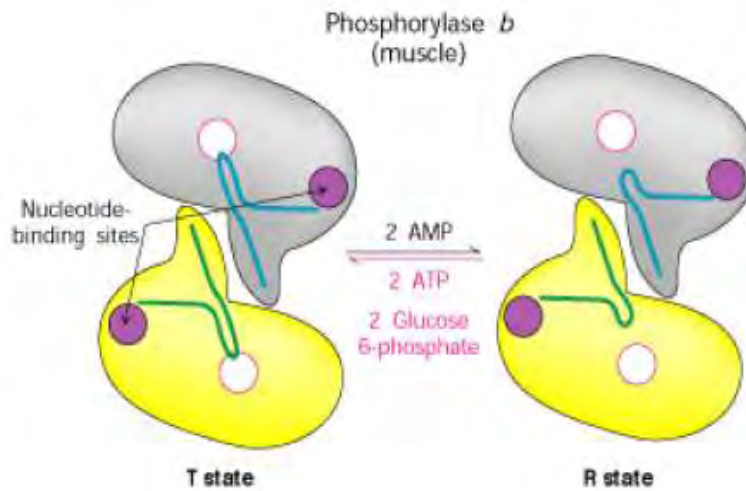


Σχήμα 10. Έλεγχος της δραστικότητας της GP.

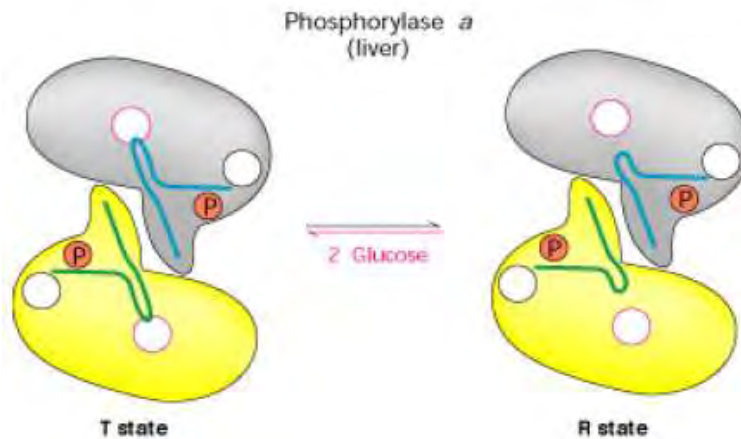
Φυσιολογικά, η δραστηριότητά της ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η κινάση, μέσω ενός ορμονικού καταρράκτη αντιδράσεων και της ενεργοποίησης της μέσω ασβεστίου, φωσφορυλίώνει τη σερίνη 14 της φωσφορυλάσης οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP, ενεργή). Αντίθετα, μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G, (PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP, ανενεργή). Οι δύο μορφές δε διαφέρουν μόνο στη φωσφορική ομάδα, αλλά έχουν και δομικές διαφορές που προκύπτουν από την παρουσία ή απουσία φωσφορικής ομάδας, (Σχήμα 11).

Στον μυ σε κατάσταση ηρεμίας, η GP βρίσκεται στην ανενεργή μορφή b, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν *in vitro* να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺ [Oikonomakos et al., 1992]. Η μετατροπή της GP_b σε GP_a έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GP_a επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GP_b (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P [Johnson et al., 1989].

α)



β)



Σχήμα 11. Αναπαράσταση του ελέγχου της δραστηριότητας α) της GPb στους μύς (*muscle*) και β) της GPa στο ήπαρ (*liver*). Στους μύς η δραστηριότητα της GP ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό αλλοστερικά από το ενεργειακό φορτίο (AMP, ATP) αλλά και από την 6-φωσφορική γλυκόζη (*glucose 6-phosphate*). Αντίθετα στο ήπαρ, που βρίσκεται κυρίως υπό μορφή GPa η γλυκόζη είναι αυτή που ρυθμίζει τη δραστηριότητα [Stryer,1997].

Ο συντονισμός των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες γίνεται με την βοήθεια ρυθμιστικών ενζύμων, η λειτουργική δομή των οποίων τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την καταλυτική τους δράση ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Σύμφωνα με τους Monod, Changeux και Wyman, ως αλλοστερικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τουλάχιστον δυο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο ευθύνεται για την βιολογική δράση της πρωτεΐνης, συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ στο αλλοστερικό συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση ένας άλλος μεταβολίτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αλλοστερικός τροποποιητής προκαλεί μια διακριτή, αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται αλλοστερική μετάπτωση. Αυτή τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή [Monod *et al.*, 1963].

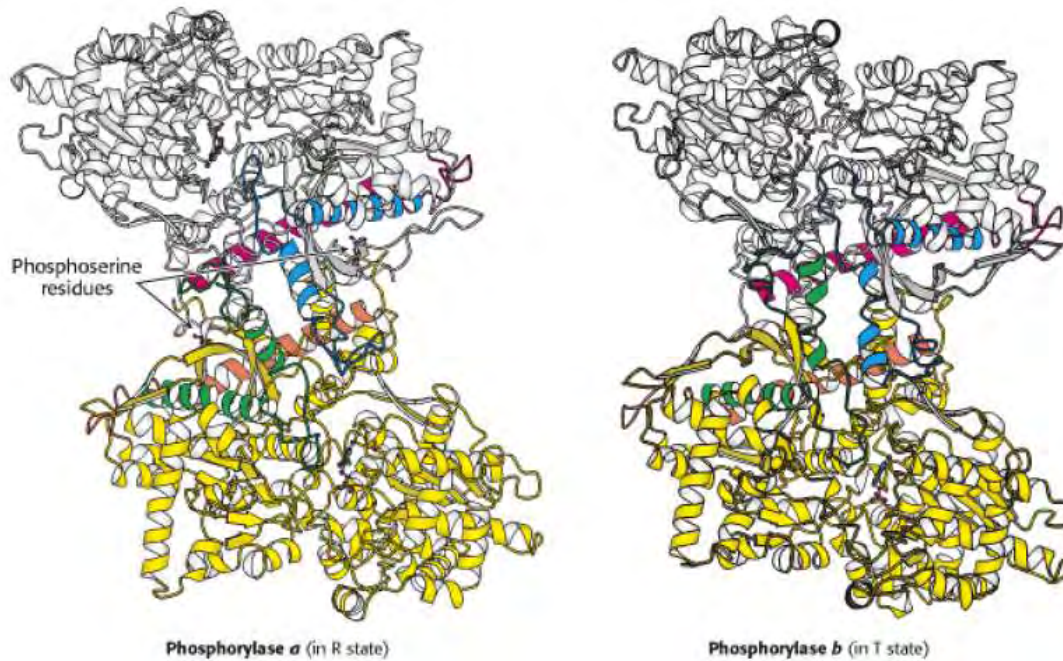
Γενικά, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από τη συγκεκριμένη δομή του ίδιου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωσή του που επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή [Monod *et al.*, 1963].

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

μεταξύ μονομερών T ή R διαμόρφωσης και υποστρώματος είναι αντίστοιχα ίδιες [Monod *et al.*, 1965].

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα [Monod *et al.*, 1965].

Συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η αύξηση ή αντίστοιχα η μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, σε περισσότερο ή λιγότερο σιγμοειδή. Η τροποποίηση αυτή γίνεται ανάλογα με το αν η αλλοστερική μετάπτωση προκαλείται από αναστολέα ή ενεργοποιητή του ενζύμου. Σημειώνεται ότι η σιγμοειδής συμπεριφορά αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλοστερικών πρωτεϊνών [Monod *et al.*, 1965, Oikonomakos *et al.*, 1977].



Σχήμα 12. Οι δομές της φωσφορυλάσης *a* και *b*. Η φωσφορυλάση *a* είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή R διαμόρφωση. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρυθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν είναι φωσφορυλιωμένη και απαντάται κυρίως στην T διαμόρφωση.

Η φωσφορυλάση υφίσταται σε δύο τουλάχιστον καταστάσεις την T (λιγότερο δραστική) και την R (δραστική), που οφείλονται στα κέντρα σύνδεσης και την επαγωγή δόκιμων μεταβολών από τη μία ή την άλλη διαμόρφωση [Rath et al., 2000] (Σχήμα 11).

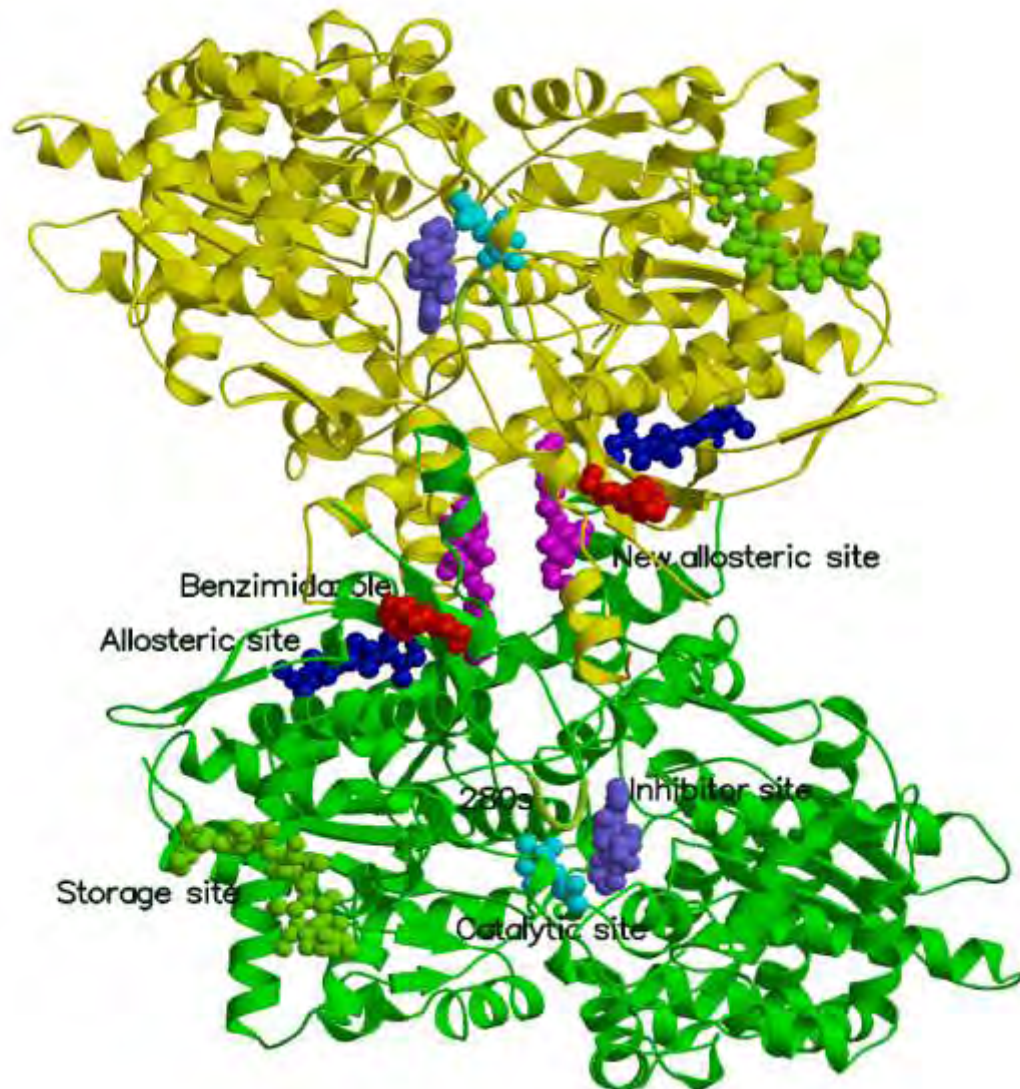
Επιπλέον, η δραστικότητα ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο. Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς τη λιγότερο δραστική T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου. Τέλος, στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6- φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την T κατάσταση, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας προς την R κατάσταση και το ATP που απλά ανταγωνίζεται το AMP [Oikonomakos et al., 1992].

2.3.2 Κρυσταλλική δομή της GP

Οι κρυσταλλικές δομές της GP_a και της GP_b (στην T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 [Barford & Johnson, 1989]. Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά νερού (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Κι αυτό συμβαίνει, διότι η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων είναι τέτοια, ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσης [Barford & Johnson, 1989].

Μετάπειτα κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη έξι κέντρων σύνδεσης (Σχήμα 13) :

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- Αλλοστερικό κέντρο (N)
- Καταλυτικό κέντρο
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων).



Σχήμα 13. Διάγραμμα του διμερούς μορίου της GPb. Το διμερές μόριο της GPb όπως φαίνεται κατά μήκος του μοριακού άξονα συμμετρίας δεύτερης τάξης στο οποίο υποδεικνύονται τα κέντρα σύνδεσης των διάφορων τροποποιητών: με μωβ το κέντρο αναστολής (φλαβοπιριδόλη), με κυανό το καταλυτικό κέντρο (GlucNac), με μπλε το αλλοστερικό κέντρο (Acugea), με πράσινο το αποθηκευτικό κέντρο (κυκλοδεξτρίνη), με ροζ το νέο αλλοστερικό κέντρο (CP320626) και με κόκκινο το νέο κέντρο σύνδεσης (Chrysin et al., 2004).

2.3.3 Κέντρα σύνδεσης της GP

1. Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14

Το κέντρο φωσφορυλίωσης είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή α στη μορφή β. Το κέντρο σχηματίζεται κατά την ενεργοποίηση της GPb με φωσφορυλίωση (Sprang et al., 1988). Η φωσφορική ομάδα συνδέεται με δύο πλευρικές αλυσίδες αργινίνης εκ των οποίων η μια είναι αυτή της Arg 69 από τη δική της υπομονάδα και η άλλη της Arg 63' από τη συμμετρική υπομονάδα. Η φωσφορική ομάδα αλληλεπιδρά επίσης με το άζωτο της κύριας αλυσίδας της Val 15 και της Gln 72 μέσω ενός μορίου ύδατος.

2. Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, περίπου 32 Å από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å από τη Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις δύο πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, T και R, της GPb και α. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από τρία υπο-κέντρα:

α) υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας

β) υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων (ριβόζης)

γ) υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρίνης)

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, Glc-1-P, Pi, SO₄²⁻) είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, Glc-6-P, UDP-Glc, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν, NADH) το ένζυμο (Barford & Johnson, 1989; Οικονομακος et al., 1988, 1989, 1992). Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP, όταν συνδέεται, εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 (αμινοξέα 47-78 και 289-314 αντίστοιχα) και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων.

3. Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (Glc-1-P, Pi) και αναλόγων τους (UDP-Glc). Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε απόσταση 15 Å από τη επιφάνεια περίπου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP [Οικονομακος et al., 1992].

4. Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε ένα αβαθές αυλάκι που σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας [Johnson et al., 1989].

Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης [Οικονομακος et al., 1992].

5. Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής (ή νουκλεοζιτικό κέντρο) είναι ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Στην T διαμόρφωση του ενζύμου, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό

κέντρο. Έχει αποδειχτεί πως οι πουρίνες (όπως η αδενίνη και η καφεΐνη), τα νουκλεοσίδια (όπως η αδενοσίνη και η ινωσησίνη), τα νουκλεοτίδια (όπως το AMP, το IMP και το ATP), το NADH καθώς και συγκεκριμένες ετεροκυκλικές ενώσεις, όπως η ριβοφλαβίνη και η φλαβοπιριδόλη δένονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GPα και GPβ, όχι όμως (όλες οι ενώσεις) και στην ηπατική Gρα, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα. Η κατάληψη αυτού του κέντρου από ένα μόριο έχει ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της ανενεργής T διαμόρφωσης του ενζύμου, καθώς και την φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Μ' αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP [Οικονομακος et al., 2000; Οικονομακος, 2002]. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων [Sprang et al., 1982].

6. Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPβ. Κατά τη σύνδεση μιας ένωσης δημιουργούνται αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις στην T διαμόρφωση της GPβ. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της Gρα [Οικονομακος et al., 2002].

2.4 ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΔΟΜΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Σε περιπτώσεις όπου είναι γνωστή η δομή ενός ενζύμου ή συγκεκριμένα κάποιων σημαντικών περιοχών της δομής καθώς και του ενεργού κέντρου, είναι δυνατός ο σχεδιασμός μορίων, τα οποία να συνδέονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και να επηρεάζουν την δραστικότητά του. Η τεχνική αυτή είναι γνωστή ως κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων ή σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή [Moran & Stewart, 2000/1].

Η εφαρμογή του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων βασίζεται στην τοποθέτηση με μεθόδους μοντελισμού αναλόγων φυσικών υποστρωμάτων στο κέντρο του υπό μελέτη μορίου. Φυσικά αυτό προϋποθέτει ότι η δομή του έχει προσδιοριστεί σε υψηλή ευκρίνεια με μία μέθοδο προσδιορισμού δομής μακρομορίων (όπως είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ). Ακολουθεί η επιλογή των μορίων που πληρούν τις προϋποθέσεις και έπειτα, συντίθενται και ελέγχονται οι βιοχημικές τους ιδιότητες.

Η διαδικασία είναι δύσκολη και απαιτητική, διότι η χημική σύσταση ενός φαρμάκου και η σχέση του με την επίδραση στον οργανισμό, δεν είναι εύκολα προβλέψιμη. Επιπλέον, η επιτυχία σε μοριακό επίπεδο δεν μπορεί να εγγυηθεί την επιτυχή παρασκευή του φαρμάκου. Γενικά, η παρασκευή του νέου φαρμάκου, με αυτόν τον τρόπο απαιτεί τη διεξοδική μελέτη σημαντικού πλήθους μορίων. Το μόριο που θα επιλεγεί για να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή φαρμάκου θα πρέπει να διαθέτει πλήθος στοιχείων όπως εκλεκτικότητα, έλλειψη τοξικότητας, κατάλληλη βιοδιαθεσιμότητα, σταθερότητα και διαλυτότητα. Η πρόκληση όσο το δυνατόν λιγότερων ανεπιθύμητων ενεργειών από το φάρμακο είναι ιδιαίτερα σημαντική [Verlinde et al., 1994]. Τα ένζυμα είναι ο κύριος στόχος για δράση των φαρμάκων, λόγω της ικανότητάς τους να δρουν ως εξειδικευμένοι καταλύτες αντιδράσεων. Η δράση τους βασίζεται στην σύνδεση των υποστρωμάτων στις καταλυτικές περιοχές όπου και προωθείται η εκάστοτε καταλυόμενη αντίδραση [Drenth JP, Jansen JB, 2000].

Ωστόσο η ανακάλυψη ή ο σχεδιασμός ενός ισχυρά συνδεόμενου αναστολέα μιας πρωτεΐνης στόχου απέχει πολύ από την εμπορική διαθεσιμότητα του φαρμάκου. Είναι προφανές ότι ακόμη και αναστολείς που συνδέονται πολύ ισχυρά δεν είναι απαραίτητα αποτελεσματικά και ασφαλή φάρμακα. Τα φάρμακα συντίθενται βάσει μορίων που διαθέτουν συνδυασμό ιδιοτήτων, πέραν της υψηλής ανασταλτικής τους δράσης. Αυτά τα μόρια πρέπει να παρουσιάζουν αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα. Να είναι ικανά όχι μόνο να φτάσουν στην πρωτεΐνη που τίθεται ως στόχος, περνώντας συχνά μέσω αρκετών μεμβρανών, αλλά και να μην αποβάλλονται γρήγορα από τον οργανισμό. Δεν πρέπει να εμφανίζουν όμως και επικίνδυνες παρενέργειες, πρέπει να έχουν χαμηλή τοξικότητα, να μπορούν να παρασκευαστούν σε μεγάλες ποσότητες με υψηλή καθαρότητα και να μην μετατρέπονται σε επιβλαβείς ενώσεις από ανθρώπινα παθογόνα αμυντικά συστήματα. Τα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία θα επιτραπεί η χορήγηση μιας νέας ένωσης σε μεγάλους πληθυσμούς πρέπει να είναι αρκετά αυστηρά και είναι ο κύριος λόγος στον οποίο αποδίδεται η αποτυχία πολλών ενώσεων να γίνουν φάρμακα.

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της φωσφορυλάσης γλυκογόνου για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης ενζύμου:αναστολέα και το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου:αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης \leftrightarrow σύνθεσης γλυκογόνου στο σακχαρώδη διαβήτη τυπου 2.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ β ΑΠΟ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΜΥΣ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer & Krebs (1962) με μικρές μόνο τροποποιήσεις (π.χ. χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) [Melridou & Oikonomakos, 1983].

Υλικά

- 1 κουνέλι
- Απιονισμένο H₂O
- Όξινο ανθρακικό κάλιο, MB. 100.12 (Merck Chemicals, Germany)
- 2-μερκαπτοαιθανόλη, MB. 78.3 (Serva, Heidelber- Germany)
- EDTA, MB. 372.24 (Panreac, Barcelona-España)
- Οξικό οξύ 99-100%, MB. 60.05 (Chem-Lab, B-8210 Zedelgem)
- β- γλυκερινοφωσφορικό νάτριο 0.005M, MB. 306.12 (Merck KGaA, Germany)
- 5'- φωσφορική αδενοσίνη, MB. 367.2 (Sigma- Aldrich, Steinheim- Germany)
- Τρίς- (υδροξυμέθυλο)- αμινομεθένιο, MB. 121.1 (Serva, Heidelber, Germany)
- Οξικό μαγνήσιο, MB. 214.46 (Ferac, Berlin)
- Θεϊκό αμώνιο, MB. 132.14 (Serva, Heidelber- Germany)
- C₃H₈O₃ - Γλυκερόλη 100% (Charlo Erba Reactifs- SDS)
- Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης (Serva Heidelberg, Germany)

Πριν από τη χρήση τους υφίστανται κατεργασία με 1% Na₂CO₃ και 10mM EDTA στους 100°C (30 min) και συνεχείς εκπλύσεις με απεσταγμένο ύδωρ.

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου (50: 50: 1) β- γλυκερινοφωσφορικό νάτριο / 2-μερκαπτοαιθανόλη / EDTA, pH 6.8

- Κεκορεσμένο Διάλυμα KHCO_3
- Διάλυμα 2- μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH 7.0
- Διάλυμα CH_3COOH 1N
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 2M και 0.001M, pH 7.5
- Διάλυμα EDTA 0.1M pH 7.0
- Διάλυμα AMP 0.1M pH 7.0
- Διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M pH 7.0
- Διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ 90% κορεσμού w/v

Όργανα

- Χειροκίνητη κρεατομηχανή
- Αναλυτικός ζυγός (Kern, Balingen- Germany)
- Αντλία Κενού Buchner (Pall, Live Sciences)
- Υδρόλουτρο
- Συσκευή Vortex (IKA[®] Works, INC)
- Φασματοφωτόμετρο (Genesys 10uv – Spectronic Unicam)
- Οι φυγοκεντρήσεις μέχρι 45000 g έγιναν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Sorvall, RC5-C (Sorvall, USA) χρησιμοποιώντας την κεφαλή SS-34 (DuPont, Wilmington-USA).
- Η ρύθμιση pH των διαλυμάτων έγινε με πεχάμετρο Metrohm 744 (Metrohm, Switzerland).
- Για την ογκομέτρηση μικρών όγκων κατά την διεξαγωγή των κινητικών πειραμάτων και των κρυσταλλώσεων χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες Gilson P1000-P10 (Gilson, France).

Πορεία

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

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μύς από ένα κουνέλι. Οι μύς αλέθονται με χειροκίνητη μηχανή παραγωγής κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσσεις με απιονισμένο νερό εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο νερού αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο νερού αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2. Όξινη καταβύθιση άλλων πρωτεϊνών.

Το pH του ψυχρού εκχυλίσματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με την προσθήκη CH_3COOH 1N. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min, όπου και παρατηρείται η σταδιακή αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος (κατακρήμιση πρωτεϊνών). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 40 min σε θερμοκρασία 0-4°C, το υπερκείμενο υγρό διηθείται για την απομάκρυνση υπολειμμάτων και γίνεται ρύθμιση του pH στο 6.8 με κορεσμένο διάλυμα KHCO_3 .

Βήμα 3. Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο.

Η φωσφορύλαση του γλυκογόνου καταβυθίζεται σε 41% κορεσμό θειικού αμμωνίου με την προσθήκη διαλύματος θειικού αμμωνίου σε 90% κορεσμό όγκου ίσου με 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το μίγμα αφήνεται στους 4 °C για 24 ώρες. Μετά από την προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου, το ίζημα παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 45min στους 4°C και διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου νερού και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

Βήμα 4. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH.

Μετά την διαπίδυση του πρωτεϊνικού διαλύματος ακολουθεί διαύγαση με φυγοκέντρηση στις 17.000 rpm για 10min στους 4 °C και στη συνέχεια προστίθενται τα ακόλουθα:

α) κατάλληλος όγκος ουδέτερου διαλύματος β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M έτσι ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 3×10^{-2} M

β) ουδέτερο διάλυμα EDTA 0.1M

γ) κατάλληλη ποσότητα αλκαλικού διαλύματος Tris 2.0M για τη ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH₃COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 17000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20°C και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται.

Βήμα 5. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση.

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1ml AMP 0.1M (pH 7.0) και (CH₃COO)₂Mg 1M (pH 7.0) ανά 100 mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, το AMP και το (CH₃COO)₂Mg διευκολύνουν την κρυστάλλωση προάγοντας τον τετραμερισμό της GP. Το μίγμα αφήνεται στους 4°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 17000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία 4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραιώσης (50 mM β-GP, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, pH 6.8). Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 18000 rpm για 15 min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH₃COO)₂Mg, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στον ψυκτικό θάλαμο (4°C) για 3-4 ώρες. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP.

Βήμα 6. Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου.

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης b γλυκογόνου, μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή, διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης 100%. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20°C.

3.2 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ β ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

3.2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της GPb

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, sa, $\mu\text{mol} / \text{min} \times \text{mg}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας (mg ενζύμου), αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου που προκαλεί μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Υλικά

- Διάλυμα εκχυλίσματος οίνου (b10)
 - Διάλυμα αναστολέα- catechin (14 mM) (SIGMA, MB 290.27)
 - Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου 50 mM β - GP, 50 mM β - μερκαπτοαιθανόλη 1 mM EDTA, pH 6.8 (β -GP:Merc:EDTA, 50:50:1)
 - Υποστρώματα 1-φωσφορικής γλυκόζης συγκεντρώσεων 9-90 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 6.8.

 - Ρυθμιστικό διάλυμα- Assay Buffer pH 6.8
Ιμιδαζόλιο 200 mM MB. 68.08 (Merck Chemicals, Germany)
KCl 400 mM MB. 74.56 (Sigma- Aldrich, Germany)
EDTA 4 mM MB. 372.24 (Panreac, Barcelona-España)
DTT 4 mM MB. 154.3 (Serva, Heidelber- Germany)
- Για την παρασκευή των υποστρωμάτων 1-D-φωσφορικής γλυκόζης γίνεται αραιώση της 1-φωσφορικής γλυκόζης (αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 400mM) με το ρυθμιστικό διάλυμα. Τα υποστρώματα φυλάσσονται στην κατάψυξη προκειμένου να αποφευχθεί η υδρόλυση της 1-φωσφορικής γλυκόζης.
- Πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων (KH_2PO_4) 1.0 mM pH 6.8

- Γλυκογόνο (oyster glycogen). Sigma (Saint Luis, USA). Πιθανές προσμίξεις νουκλεοτιδίων απομακρύνθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Helmreich & Cori (1964). Τα στάδια του καθαρισμού περιλαμβάνουν κατεργασία με ενεργό ζωϊκό άνθρακα, φυγοκέντρηση στους 4οC, διήθηση με φίλτρα Whatman No1, καταβύθιση με 1.5 όγκο απόλυτης αλκοόλης, διήθηση υπό κενό και λυοφιλίωση σε θερμοκρασία -20°C για 12-15 ώρες. Ακολουθεί διαλυτοποίηση του στερεού στον κατάλληλο όγκο απιονισμένου ύδατος ώστε η τελική συγκέντρωση του γλυκογόνου να είναι 10% (w/v). Φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20°C.
- 5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP), 5'-μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP), γλυκοζη, α-D-1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P) (dipotassium salt), θειϊκό αμμώνιο, σπερμίνη, οξικό μαγνήσιο. Sigma (Saint Luis, USA).
- Εναιώρημα ενζύμου GPb 500 μg/ ml.
Για την παρασκευή του διαλύματος, πραγματοποιείται αραιώση του αρχικού διαλύματος (50% γλυκερόλη) με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου (50:50:1). Η ποσότητα του ενζύμου υπολογίζεται μέσω της απορροφήσεως σε μήκος κύματος 280nm.
- Διάλυμα Ασκορβικού- Μολυβδαινικού
Μολυβδαινικό διάλυμα:
- Μολυβδαινικό αμμώνιο, MB.1236.86 (Merck Chemicals, Germany)
-Οξικός Ψευδάργυρος, MB. 219.49 (Sigma- Aldrich, Steinheim- Germany)
- Ασκορβικό Διάλυμα 10% w/v pH 5.0
-L (+) Ασκορβικό οξύ, MB. 176.13 (Merck Chemicals, Germany)
Ανάμιξη 4:1 όγκους διαλυμάτων μολυβδαινίου και ασκορβικού οξέος.
- Διάλυμα SDS $C_{12}H_{25}NaO_4S$ 1% w/v
Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο MB. 288.38 (Sigma- Aldrich, Steinheim- Germany)
- Διάλυμα NaOH 10N και 1N
MB. 40.00 (Merck KGaA, Darmstadt- Germany)

Πορεία

Το ένζυμο αραιώνεται σε τελική συγκέντρωση ~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος ($\beta\text{-GP}:\text{Merc}:\text{EDTA}$, 50:50:1). Ακολουθεί παρασκευή ενζυμικού μίγματος που περιέχει ένζυμο (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), γλυκογόνο 1% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου. Παρασκευάζονται επίσης τα υποστρώματα για G-1-P με τελικές συγκεντρώσεις ίσες προς 2mM, 3mM, 4mM, 6mM, 10mM και 20 mM.

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση στους 30°C επί 15 min και το υπόστρωμα επί 5 min. Μετά την επώαση, 180 μL από το ενζυμικό μείγμα προστίθενται στο σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στο τελικό μίγμα που λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε : 5.0 μg ένζυμο/ mL , AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0,2% w/v, υπόστρωμα $\alpha\text{-D-G-1-P}$ 2.0-20 mM, Imidazole 30mM , KCl 60mM, DTT 0.6mM, EDTA ~0.6mM, b-GP 0.1M και Merc 0.1M.

Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8.

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα(1.5-3-5-7min) λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1% για να σταματήσει η καταλυτική αντίδραση, αφού παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται. Στα δείγματα γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με τη μέθοδο μολυβδαινικού αμμωνίου-ασκορβικού οξέος που περιγράφεται στη συνέχεια.

Παρασκευή Τυφλών. Η μέθοδος μέτρησης της K_m του ενζύμου βασίζεται, όπως έχει προαναφερθεί, στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb. Γι' αυτό το λόγο, θα πρέπει να αφαιρεθούν από τις μετρήσεις η τιμή της οπτικής απορροφής των ορθοφωσφορικών ιόντων που δεν οφείλονται στη δράση του ενζύμου.

Διαδικασία παρασκευής των παρακάτω τυφλών:

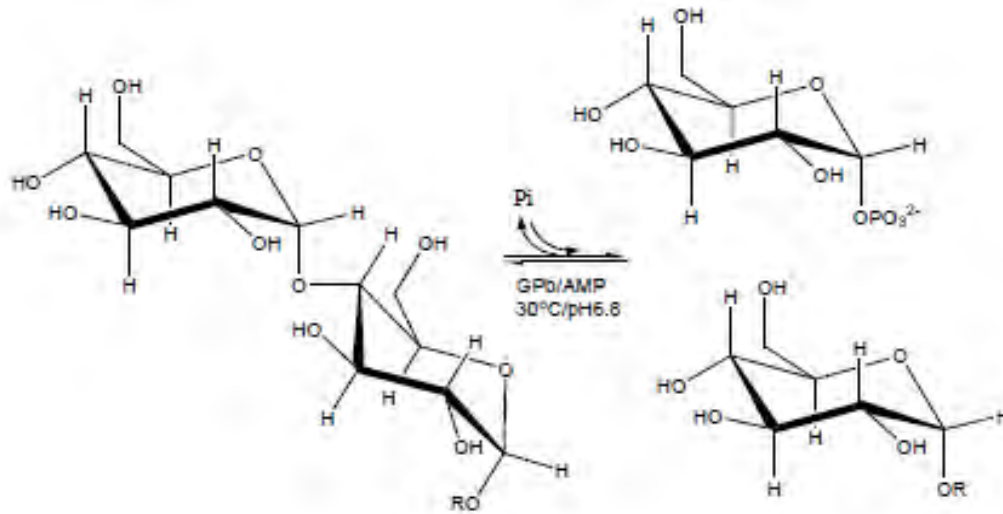
- Τυφλό νερού
- Τυφλό με τη μέγιστη συγκέντρωση G-1-P το οποίο χρησιμοποιείται και για την αναγωγή της τιμής της απορρόφησης που προκύπτει λόγω της φυσικής υδρόλυσης της Glc-1-P στις άλλες συγκεντρώσεις του πειράματος
- Τυφλό γλυκογόνου λόγω της πιθανής παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων

Επίσης παρασκευάζεται και πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από το οποίο με απλή αναγωγή βρίσκεται η τιμή της οπτικής απορρόφησης ενός $\mu\text{mol Pi}$.

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

3.2.2 Προσδιορισμός K_m της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός της απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (G-1-P). Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (GPb) βασίζεται στην ακόλουθη αντίδραση (Σχήμα 14):



Στην αντίδραση αυτή η λιγότερο ενεργή μορφή του ενζύμου (T διαμόρφωση), μετά ενεργοποίηση με AMP, δρα αντίστροφα, προς σχηματισμό γλυκογόνου, παρουσία Glc-1-P (α-D-1-φωσφορικής γλυκόζης), και ελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi) [Οικονομακος et al., 1995]. Η καταλυόμενη αντίδραση σε συνθήκες κορεσμού σε AMP και γλυκογόνου (1.0 mM και 1.0% αντίστοιχα) ακολουθεί μία κινητική κατά Michaelis-Menten, σύμφωνα με την οποία η καμπύλη της ταχύτητας ως προς το υποστρώμα, την 1-φωσφορική γλυκόζη, αποτελεί τμήμα υπερβολής. Σε μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση του υποστρώματος όσο και από την ποσότητα του ενζύμου. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, όπου επέρχεται κορεσμός, η ταχύτητα εξαρτάται αποκλειστικά από την ποσότητα του ενζύμου στο μίγμα της αντίδρασης [Segel, 1975].

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

Πορεία

Παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα τελικής συγκέντρωσης GPb 5μg/mL, γλυκογόνου 0.2%, ρυθμιστικού διαλύματος β-GP-Merc-EDTA 2.5:2.5:0.5 mM. Οι τελικές συγκεντρώσεις έχουν υπολογιστεί στον όγκο της αντίδρασης, δηλ. 900 μL. Το μίγμα επωάζεται για 15min στους 30°C. Τα υποστρώματα παρασκευάζονται με προσθήκη 200 μL υποστρώματος (τελικών συγκεντρώσεων 2, 3, 4, 6, 10, 20mM), AMP 0.1M.

Στη συνέχεια, τα υποστρώματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο για 5 min ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ενζυμικό διάλυμα. Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 180 μL ανά τακτά χρονικά διαστήματα από το ενζυμικό μίγμα σε κάθε υπόστρωμα με όγκο 720 μL, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ακολούθως, σε χρόνο 1,5-3-5-7min, λαμβάνονται 200 μL από τους δοκιμαστικούς σωλήνες και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1%.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 2.5 mL διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου (βλ. *Πειραματικό μέρος §3.3*) σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15 min και ακολουθεί φωτομέτρησή τους σε μήκος κύματος 850 nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των μολι Ρi που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit προκειμένου να προσδιοριστεί η Km (βλ. *Πειραματικό μέρος § 4.3.1*).

3.2.3 Προσδιορισμός IC₅₀ του εκχυλίσματος οίνου b10 ως προς την κατεχίνη

Η σταθερά IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία προκαλείται 50% μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την κινητική μελέτη του ενζύμου με διάφορες συγκεντρώσεις του αναστολέα για συγκεκριμένη συγκέντρωση Glc-1-P. Η πορεία που ακολουθείται είναι η ίδια με την περίπτωση προσδιορισμού της ειδικής δραστηριότητας της φωσφορυλάσης.

Πορεία

Κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού μείγματος παρασκευάζεται σε έξι δοκιμαστικούς σωλήνες (25 μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 1% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου 5% (v/v)), σε καθένα από τους οποίους προστίθεται διαφορετική συγκέντρωση του αναστολέα b10, (7μM-8μM-9μM-10μM-12μM).

Παράλληλα σε πολλαπλούς δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάζονται διαλύματα που περιέχουν ίδια συγκέντρωση υποστρώματος (Glc-1-P, 18mM), έτσι ώστε με την προσθήκη του ενζυμικού μείγματος η αντίδραση να λαμβάνει χώρα στις εξής συνθήκες: ένζυμο 5.0 μg / mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2% w/v, υπόστρωμα Glc-1-P σταθερής συγκέντρωσης και αναστολέα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Επίσης, η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8.

3.2.4 Προσδιορισμός K_i του αναστολέα

K_i είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα που δίδει το μέτρο της αγχιστείας του ενζύμου προς τον αναστολέα.

Πορεία

Κατάλληλη ποσότητα ενζυμικού μείγματος το οποίο έχει μελετηθεί κινητικά (προσδιορισμός K_m) παρασκευάζονται τέσσερις δοκιμαστικοί σωλήνες οι οποίοι περιέχουν ένζυμο (25μg/mL), γλυκογόνο 1% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, και διαφορετική συγκέντρωση του αναστολέα (0 μM, 4 μM 7 μM και 11 μM). Παράλληλα σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (α-D-G-1-P: 2 mM, 4 mM, 6 mM, 10 mM, 20 mM), σε κατάλληλες ποσότητες έτσι ώστε μετά την προσθήκη του ενζυμικού μείγματος η αντίδραση να λαμβάνει χώρα στις εξής συνθήκες: ένζυμο 5.0 μg/mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2% w/v. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8.

Το κινητικό πείραμα πραγματοποιείται παρουσία αναστολέα με τον ίδιο τρόπο που γίνεται και ο προσδιορισμός IC_{50} της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου. Οι συνθήκες και τα αποτελέσματα για το κινητικό πείραμα που αφορούσε στην ένωση κατεχίνη περιγράφονται στην §4.3.3 Αποτελέσματα- Συζήτηση.

3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΩΣΦΟΡΟΥ

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στη Βιοχημεία, κυρίως επί του προσδιορισμού δραστηρότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις, στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Η χρησιμότητα του προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου οδήγησε σε μια συνεχή τροποποίηση και βελτιστοποίηση της αρχικής μεθόδου που προτάθηκε από τους Fiske και Subbarow (1925).

Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Μέθοδος ασκορβικού οξέος [Saheki et al, 1985]

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ιόντα φωσφόρου πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.4 μmol, προκειμένου να είναι ανιχνεύσιμα από το φασματοφωτόμετρο.

Πορεία

Διάλυμα Α. Μολυβδαινικό αμμώνιο 15mM και οξικός ψευδάργυρος 100mM ρυθμίζονται με ατμίζον HCl σε pH 5.0 και φυλάσσονται σε δοχείο πολυαιθυλενίου, μακριά από το φως.

Διάλυμα Β. Ασκορβικό οξύ 10% w/v ρυθμίζεται με NaOH σε pH 5.0. Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευάζεται πριν από κάθε πείραμα λόγω της ταχείας οξειδωσής του.

Ακολουθεί ανάμιξη των δύο διαλυμάτων με αναλογία όγκων

$$V_{\text{Διάλυμα Α}} : V_{\text{Διάλυμα Β}} = 4 : 1$$

Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά 15min από την παρασκευή του για χρονικό διάστημα μικρότερο των 4hr.

3.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-Grafit

Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων πραγματοποιείται με το πρόγραμμα GraFit (Leatherbarrow, 1992) και περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

3.4.1 Υπολογισμός των αρχικών ταχυτήτων (v) και των τυπικών αποκλίσεων (σ²)

Οι τιμές των αρχικών ταχυτήτων (v) και το τυπικό τους σφάλμα (σ²) υπολογίζονται εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simple weighting') (Leatherbarrow, 1990). Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων είναι η εξής:

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

όπου k: είναι η αρχική ταχύτητα v της αντίδρασης

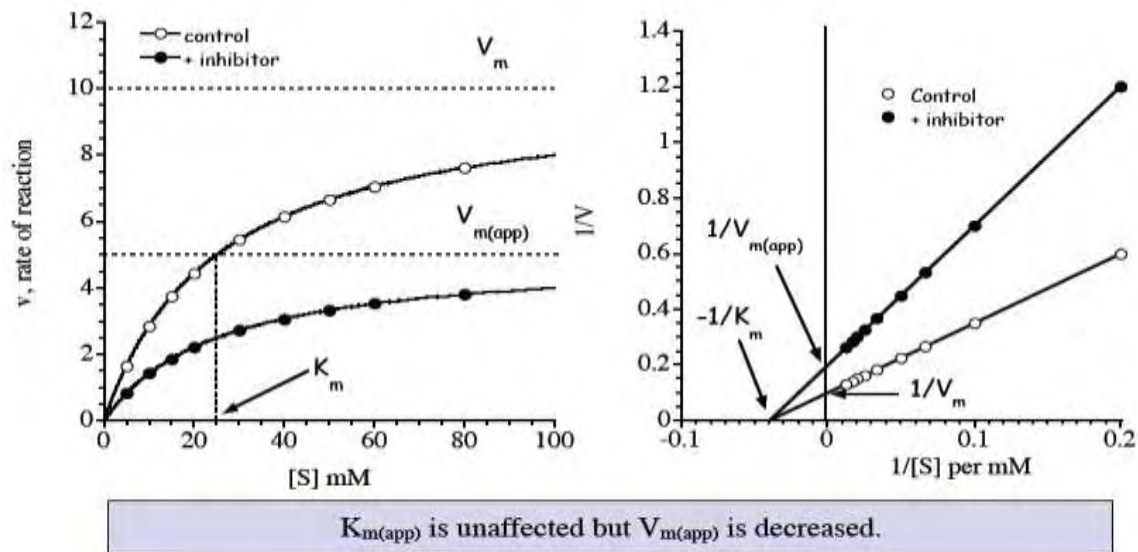
t: ο χρόνος της αντίδρασης

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

3.4.2 Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων V_{max} και K_m και των τυπικών αποκλίσεων (σ_2)

Οι αρχικές ταχύτητες που προκύπτουν από την παραπάνω εξίσωση επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων (ετεροσκεδαστικότητα 'explicit weighting'). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους V_{max} και K_m , (Σχήμα 15), και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό αυτό χρησιμοποιείται η γνωστή εξίσωση Michaelis-Menten:

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



$$V_{m(app)} = V_m / (1 + [I]/K_i)$$

where K_i is the dissociation constant for the EI complex, $K_i = [E][I]/[EI]$

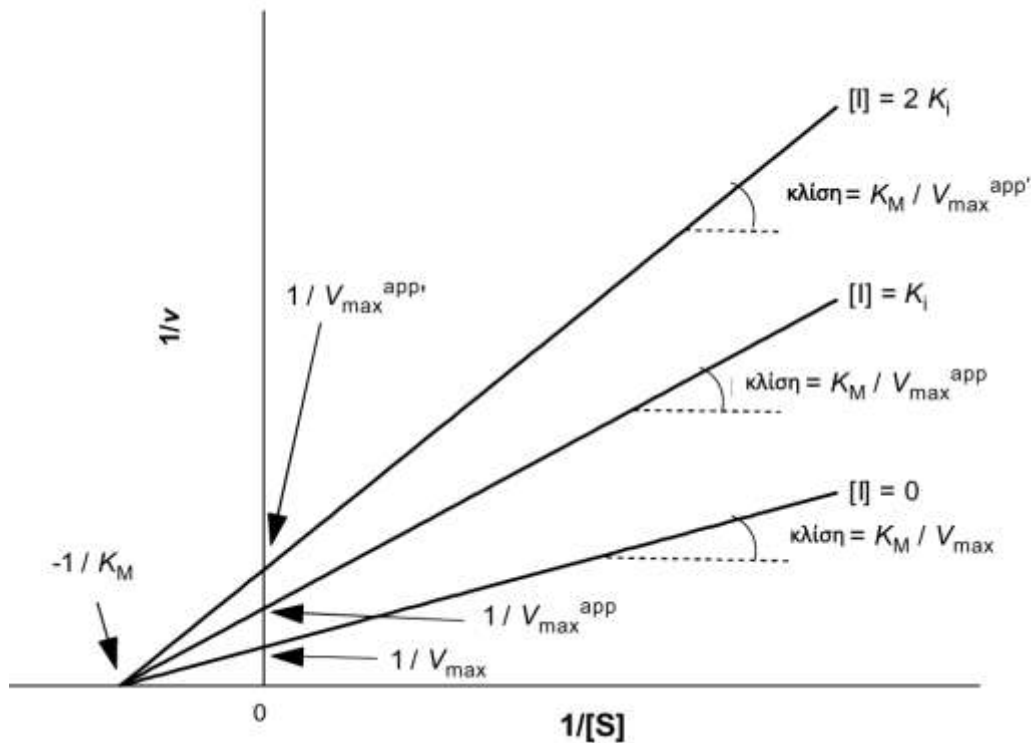
Σχήμα 15. Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. (αριστερά) Διάγραμμα Lineweaver- Burke (δεξιά).

3.4.3 Υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K_i

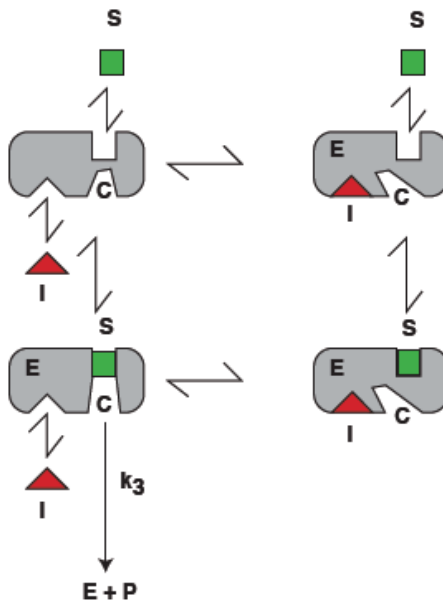
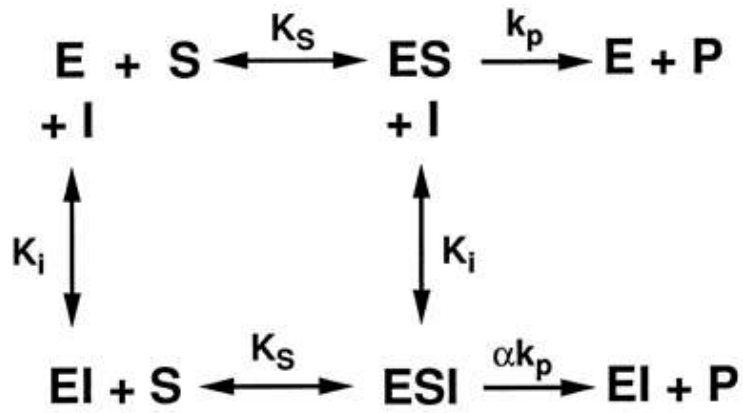
Σε συστήματα καθαρής μη συναγωνιστικής αναστολής (Σχήμα 16), ο υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K_i υπολογίζεται από τη σχέση

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

Η αντίστοιχη γραφική παράσταση είναι η ακόλουθη:



Σχήμα 17. Το διάγραμμα απεικονίζει το αντίστροφο της ειδικής δραστηριότητας σε συνάρτηση με το αντίστροφο της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

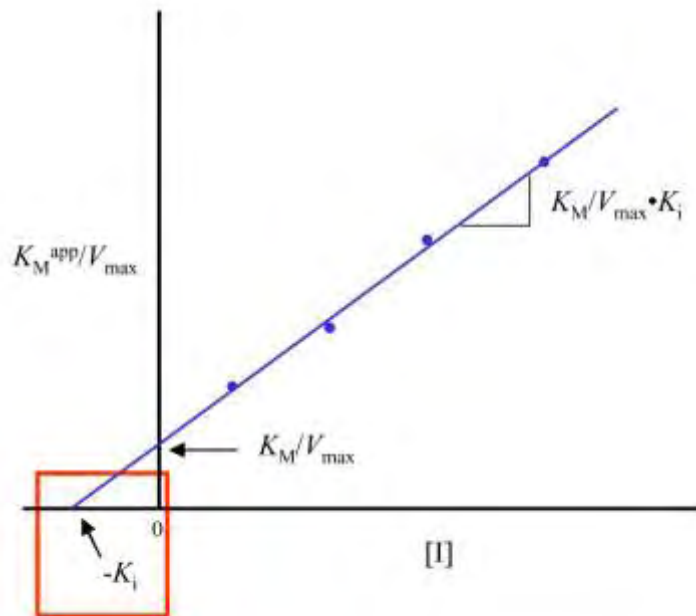


Σχήμα 15. Κινητικό διάγραμμα μη συναγωνιστικής αναστολής. Εξ ορισμού δεν υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ S και I για δέσμευση στα αντίστοιχα κέντρα τους. Συνεπώς, μπορούν να δεσμευτούν ταυτόχρονα σχηματίζοντας ένα τριπλό σύμπλοκο του τύπου ES..

Η σχέση που συνδέει το λόγο K_{Mapp}/V_{max} με την σταθερά αναστολής K_i είναι η ακόλουθη:

$$\left(\frac{K_M^{app}}{V_{max}^{app}} \right) = \frac{\left(\frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{1 + \frac{[I]}{K_i'}} \right)}{\left(\frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i'}} \right)} = \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Από την παραπάνω σχέση προκύπτει το διάγραμμα της K_{Mapp}/V_{max} σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναστολέα, από το οποίο μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά αναστολής K_i , (Σχήμα 18).



Σχήμα 18. Διάγραμμα της K_{Mapp}/V_{max} σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναστολέα.

3.5 ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ b ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

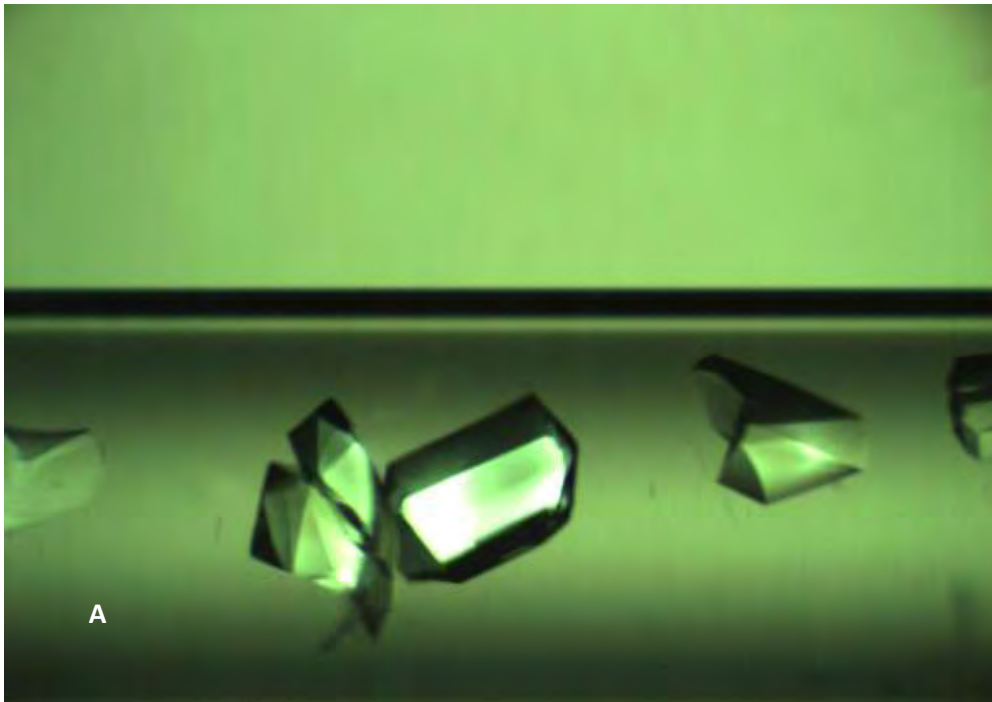
Για το σχηματισμό των κρυστάλλων μπορεί να εφαρμοστεί πληθώρα μεθόδων, όπως αυτή της κρεμάμενης ή καθήμενης σταγόνας (hanging drop, sitting drop), batch κ.ά. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (στην T διαμόρφωση) γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο batch [Oikonomakos et al, 1985].

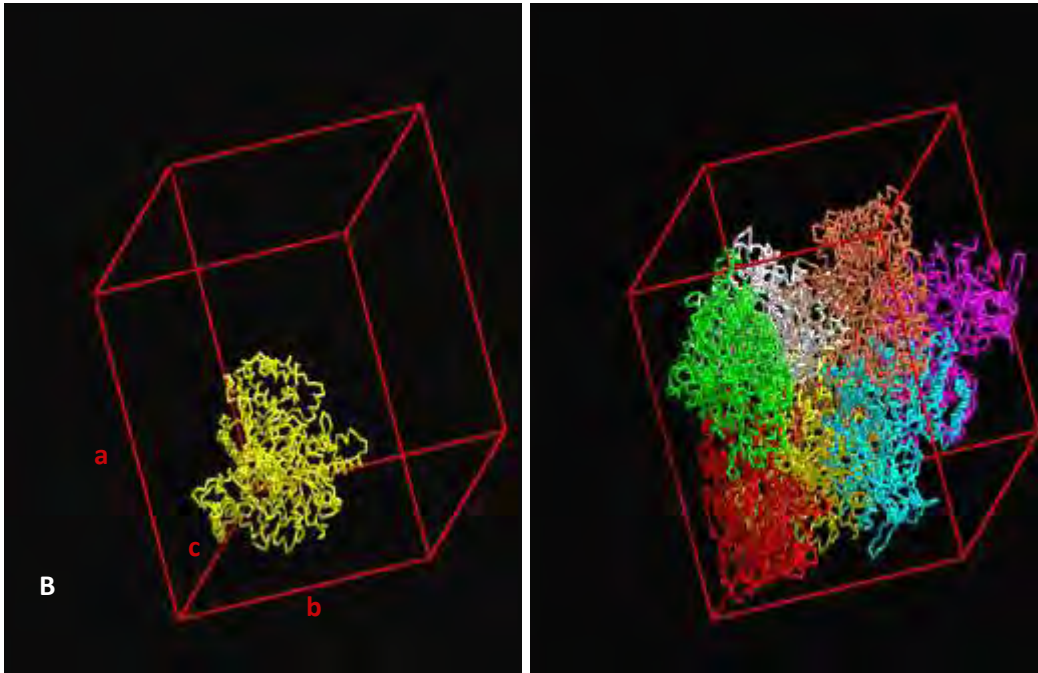
Ο καθαρισμός της GPb από την γλυκερόλη και το AMP αποτελεί ένα σημαντικό στάδιο πριν από την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης. Η απομάκρυνση της γλυκερόλης πραγματοποιείται με διαπίδυση του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα 10mM BES, 0.1mM EDTA, 0.02% w/v NaN_3 (pH 6.8) για 24h σε θερμοκρασία 0-4°C. Ακολουθεί κατεργασία της GPb με ενεργό ζωικό άνθρακα σε αναλογία ενζύμου: ζωικού άνθρακα 1:1 (w/w) και υπολογίζεται ο λόγος των οπτικών απορροφήσεων σε μήκη κύματος 260 και 280 nm (A_{260}/A_{280}) [Melridou & Oikonomakos, 1983]. Η τιμή του λόγου για την οποία θεωρείται ότι η απομάκρυνση του AMP έχει επιτευχθεί ισούται με 0.53-0.54. Η ανάπτυξη κρυστάλλων T διαμόρφωσης της καθαρής πλέον πρωτεΐνης πραγματοποιείται με τη στατική μέθοδο batch [Oikonomakos et al., 1985].

Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Σύμφωνα με τη μέθοδο, το μίγμα κρυστάλλωσης περιέχει 20-30mg/ml καθαρής πρωτεΐνης, 1mM σπερμίνης, 3mM DTT, 10mM BES/NaOH, 0.1mM EDTA, 0.02% (w/v) NaN_3 (pH 6.7) και διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραιώσης. Πολλές φορές στο μίγμα κρυστάλλωσης προστίθεται διάλυμα 1mM IMP σε pH 6.8 το οποίο επιταχύνει την διαδικασία κρυσταλλογένεσης. Το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε ειδικά γυάλινα σωληνάκια μήκους 3cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3mm και φυλάσσεται στους 16°C. Οι κρύσταλλοι αρχίζουν να σχηματίζονται μετά από περίπου 6 ώρες και η ανάπτυξη τους συνεχίζεται για λίγες εβδομάδες (Σχήμα 19 A). Οι

κρύσταλλοι ανήκουν στην τετραγωνική ομάδα συμμετρίας P43212 με διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας $a=b=128.5 \text{ \AA}$, $c=116.3 \text{ \AA}$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, Σε αυτή την κρυσταλλική μορφή του ενζύμου συναντάται ένα μονομερές GP ανά ασύμμετρη μονάδα ενώ η στοιχειώδης κυψελίδα αποτελείται από οχτώ επαναλήψεις της ασύμμετρης μονάδας (Σχήμα 19 Β). Συνήθως το μέγεθος αυτών είναι 0.2-0.5mm, κατάλληλο για την περαιτέρω χρήση αυτών σε πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι:

$$I = I_0 * e^{-\mu t}$$





Σχήμα 19. (A) Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της φυσικής GPb και (B) Στοιχειώδης κυψελίδα των κρυστάλλων της φυσικής GPb με ένα μόριο φωσφορυλάσης ανά ασύμμετρη μονάδα και οχτώ επαναλήψεις της ασύμμετρης μονάδας ανά στοιχειώδη κυψελίδα.

3.6 ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

3.6.1 Επιλογή κρυστάλλων και διαλύματος εργασίας

Η καταλληλότητα των κρυστάλλων που χρησιμοποιούνται σε πειράματα περιθλασης ακτίνων-Χ κρίνεται αρχικά από το μέγεθος και τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά τα οποία εξετάζονται με τη βοήθεια στερεό-μικροσκοπίου εφοδιασμένου με διάταξη πολωμένου φωτός. Πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι με διαστάσεις 0.2-0.5mm δίνουν συνήθως υψηλής ευκρίνειας περιθλασιγράμματα με έντονες και καλοσηματισμένες ανακλάσεις (reflections). Η χρήση μικρότερων κρυστάλλων είναι δυνατή, ωστόσο τα περιθλασιγράμματα είναι ασθενέστερα, συνήθως παρέχουν μικρότερη ευκρίνεια και απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος έκθεσής τους στην ακτινοβολία. Κρύσταλλοι πολύ μεγαλύτεροι από 0.5 mm πιθανόν να μη βομβαρδίζονται ομοιόμορφα από τις ακτίνες-Χ (ανάλογα με το μέγεθος της οπής, της διάταξης ευθυγράμμισης της δέσμης που χρησιμοποιείται) και η χρήση τους συνοδεύεται από προβλήματα απορρόφησης των ακτίνων-Χ. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι:

$$I = I_0 * e^{-\mu t}$$

όπου μ (Units/cm) είναι ο συντελεστής γραμμικής απορρόφησης, ο οποίος αυξάνει σημαντικά με τον ατομικό αριθμό του στοιχείου και t το πάχος του κρυστάλλου.

Επιπλέον, οι κρύσταλλοι πρέπει να είναι μονοκρύσταλλοι χωρίς ρωγμές, να διαθέτουν οπτική διαύγεια, λείες επιφάνειες, και καλά καθορισμένες ακμές και έδρες.

Πολλές φορές παρατηρείται η ανάπτυξη κρυστάλλων με τη μορφή συμπλεγμάτων μικρών κρυστάλλων. Στην περίπτωση αυτή ο διαχωρισμός τους επιτυγχάνεται με εφαρμογή μικρής πίεσης με τη βοήθεια λεπτής τρίχας ή λεπίδας.

Το 30 έως 60% περίπου του όγκου των πρωτεϊνικών κρυστάλλων καταλαμβάνεται από διαλύτη ο οποίος είναι απαραίτητος για τη σταθεροποίηση του κρυσταλλικού πλέγματος και η αλλαγή της σύστασης του, που μπορεί να οφείλεται σε εξάτμιση ή σε μεταβολή της συγκέντρωσης του άλατος ή του ρυθμιστικού, έχει αρνητικές δυσμενείς επιπτώσεις στην ακεραιότητα του πλέγματος και την ικανότητα του κρυστάλλου να περιθλά τις ακτίνες-X [Rhodes, 2006]. Στον κρύσταλλο ο διαλύτης βρίσκεται είτε δεσμευμένος στην επιφάνεια της πρωτεΐνης μέσω δεσμών υδρογόνου, είτε υπάρχει ελεύθερος στις περιοχές μεταξύ των μορίων. Στις περιπτώσεις που η κρυστάλλωση λαμβάνει χώρα απουσία κάποιου καταβυθιστικού, λόγω υψηλής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, το διάλυμα πρωτεΐνης θα πρέπει να περιέχει και πρωτεΐνη.

3.6.2 Τοποθέτηση του κρυστάλλου στους τριχοειδείς σωλήνες

Το πρώτο στάδιο της έκθεσης των κρυστάλλων στις ακτίνες Χ σε θερμοκρασία δωματίου, περιλαμβάνει την κλασική μέθοδο τοποθέτησης των κρυστάλλων σε λεπτούς γυάλινους τριχοειδείς σωλήνες παρουσία μικρής σταγόνας διαλύματος εργασίας. Δύο είναι οι συνήθεις μέθοδοι τοποθέτησης των κρυστάλλων στις ακτίνες-Χ κατά τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων σε θερμοκρασία δωματίου. Η πρώτη μέθοδος, περιλαμβάνει τη μεταφορά του κρυστάλλου από το διάλυμα εργασίας με πιπέτα Pasteur, σε τριχοειδή σωλήνα Glaskapillaren που περιέχει μικρό όγκο διαλύματος εργασίας. Στη δεύτερη μέθοδο, ο τριχοειδής προσαρμόζεται σε πιπέτα Gilson και ο κρύσταλλος αναρροφάται από το διάλυμα εργασίας. Και στις δύο μεθόδους, ο κρύσταλλος τοποθετείται στο κέντρο του τριχοειδούς σωλήνα. Στη συνέχεια απομακρύνεται η περίσσεια του διαλύτη με τη βοήθεια λεπτών λωρίδων διηθητικού χαρτιού ώστε να αποφευχθεί η περίθλαση από το διαλύτη καθώς και ο κίνδυνος ολίσθησης του κρυστάλλου κατά την περιστροφή του. Τέλος οι άκρες του τριχοειδούς σωλήνα κλείνονται με κερί για να μην εξατμιστεί ο διαλύτης που παραμένει μέσα στο τριχοειδές. Συνήθως δυο σταγόνες διαλύματος εργασίας τοποθετούνται στα δύο άκρα του τριχοειδή σωλήνα πριν από την σφράγιση του με κερί προκειμένου να υπάρχει ικανοποιητική υγρασία μέσα στον σωλήνα κατά την διάρκεια μεταφοράς και έκθεσης των κρυστάλλων στις ακτίνες Χ. Η εμφάνιση κρυστάλλου με διάλυμα αναστολέα πραγματοποιείται μέσα στους τριχοειδείς σωλήνες. Ο κρύσταλλος διαβρέχεται από κατάλληλο διάλυμα αναστολέα (200-300μl και pH 6.8) για κάποιες ώρες έτσι ώστε να εισχωρήσει ο αναστολέας μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα. Κατά την διάρκεια της διαβροχής, ο κρύσταλλος παρακολουθείται ανά τακτά χρονικά διαστήματα και η απομάκρυνση του διαλύματος κρίνεται απαραίτητη κατά την εμφάνιση των πρώτων ρωγμών. Οι ρωγμές οφείλονται κυρίως στην ισχυρή σύνδεση του αναστολέα με την πρωτεΐνη.

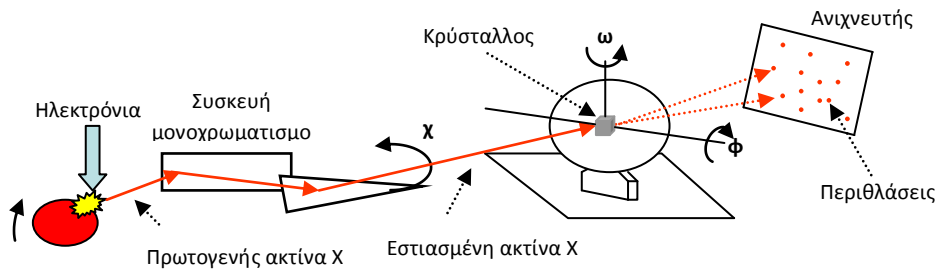
Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την προσαρμογή του τριχοειδούς σωλήνα που περιέχει τον κρύσταλλο στην κεφαλή γωνιομέτρου με την βοήθεια πλαστελίνης (Σχήμα 20). Ο σωλήνας προσαρμόζεται στην κεφαλή με τέτοιο τρόπο ώστε κάποια από τις έδρες του κρυστάλλου να είναι κάθετη ή παράλληλη με ένα από τα ρυθμιζόμενα τόξα του γωνιομέτρου και ένας από τους κρυσταλλογραφικούς άξονες να είναι παράλληλος με τον άξονα περιστροφής.



Σχήμα 20. Προσαρμογή του τριχοειδούς σωλήνα με τον κρύσταλλο πάνω στο γωνιόμετρο.

3.6.3 Έκθεση του κρυστάλλου στις ακτίνες X

Το γωνιόμετρο τοποθετείται μπροστά από τις ακτίνες X σε μια διάταξη η σχηματική αναπαράσταση της οποίας φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 21).



Σχήμα 21. Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης που χρησιμοποιείται για την συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Πριν από την έναρξη της έκθεσης του κρυστάλλου στις ακτίνες X απαραίτητη προϋπόθεση είναι η επιλογή της απόστασης του κρυστάλλου από τον ανιχνευτή, η γωνιά περιστροφής και ο χρόνος έκθεσης για την συλλογή ενός πλήρους αριθμού περιθλάσεων στην υψηλότερη δυνατή ευκρίνεια.

Απόσταση. Η ευκρίνεια (resolution) d ορίζεται από την σχέση (νόμος Bragg):

$$2d = \frac{\lambda}{\sin\theta}$$

όπου λ : μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

θ : η γωνιά που υποδηλώνει σε τι απόσταση R_{\max} από το κέντρο ενός περιθλασιγράμματος είναι ορατά τα δεδομένα περίθλασης.

Η γωνιά περίθλασης υπολογίζεται από την σχέση:

$$\tan 2\theta = \frac{R_{\max}}{X_{\text{toD distance}}}$$

όπου X_{toD} : απόσταση ανάμεσα στον κρύσταλλο και τον ανιχνευτή.

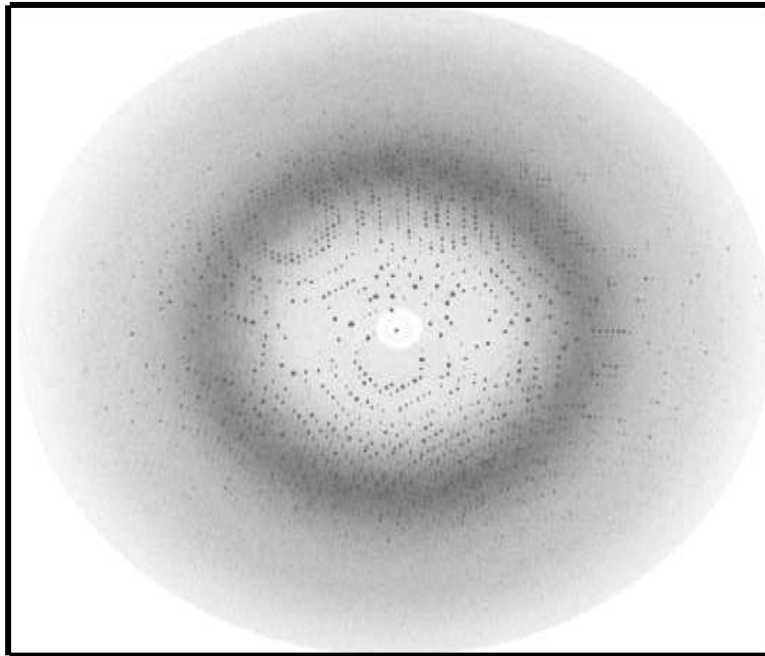
Γωνιά περιστροφής. Η μέθοδος περιστροφής έχει μελετηθεί τους Arndt και Wonacott το 1977 [Arndt & Wonacott, 1977]. Συνήθως ο κρύσταλλος τοποθετείται με τέτοιο τρόπο στις ακτίνες X ώστε το μικρότερο διάστημα του αντίστροφου πλέγματος να είναι παράλληλο με τον άξονα περιστροφής. Έτσι καθίσταται δυνατή η χρησιμοποίηση του μεγαλύτερου δυνατού εύρους περιστροφής ενώ συγχρόνως αποφεύγεται η επικάλυψη των περιθλάσεων. Το μέγιστο εύρος ($\Delta\phi$) στο οποίο αποφεύγεται η επικάλυψη των περιθλάσεων δίνεται από την παρακάτω εξίσωση

$$\Delta\phi = (P^* / d_{\max}^*) - \Delta$$

όπου d_{\max}^* είναι η μέγιστη επιθυμητή ευκρίνεια, P^* είναι το διάστημα του αντίστροφου πλέγματος και Δ είναι το εύρος περίθλασης του κρυστάλλου. Είναι καλύτερο η τιμή του μέγιστου εύρους που τελικά θα χρησιμοποιηθεί να είναι λίγο μεγαλύτερη από την υπολογιζόμενη από την παραπάνω εξίσωση γιατί έτσι αφενός μεν αυξάνεται ο λόγος των πλήρως προς των μερικώς καταγραφόμενων περιθλάσεων αφετέρου δε μειώνεται ο αριθμός των περιθλασιγραμμάτων που απαιτούνται για να έχουμε ένα πλήρες σύνολο δεδομένων.

Χρόνος έκθεσης. Ο χρόνος έκθεσης του κρυστάλλου στην ακτινοβολία εξαρτάται από το μέγεθος του, τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας και την πηγή της ακτινοβολίας [Rhodes, 2006].

Τελικά λαμβάνεται μια σειρά από περιθλασιγράμματα (Σχήμα 22) από τα οποία πρέπει να υπολογιστούν οι εντάσεις των περιθλάσεων.



Σχήμα 22. Περιθλασίγραμμα φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

3.6.4 Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Ο υπολογισμός των εντάσεων πραγματοποιείται με ένα πακέτο υπολογιστικών προγραμμάτων το οποίο ονομάζεται HKL PACKAGE [Otwinowsky Z. & Minor W 1997] και αποτελείται από τρία επιμέρους προγράμματα:

- *XdisplayF*: Απεικόνιση των περιθλασιγραμμάτων.
- *Denzo*: Προσδιορισμός της ομάδας συμμετρίας χώρου, προσδιορισμός του προσανατολισμού του κρυστάλλου και ολοκλήρωση των περιθλάσεων.
- *Scalepack*: Συγχώνευση πλαισίων πειραματικών δεδομένων, άθροιση των μερικώς καταγεγραμμένων περιθλάσεων, αναγωγή των δεδομένων και μεταβελτιστοποίηση (postrefinement).

Το τελικό αποτέλεσμα από την εφαρμογή των παραπάνω προγραμμάτων είναι η παραγωγή ενός αρχείου το οποίο ονομάζεται sca και περιέχει τις εντάσεις. Επιπλέον παράγεται ένα ακόμα αρχείο (scalepack.log) το οποίο περιλαμβάνει ένα σύνολο στατιστικών στοιχείων χρήσιμων για την αξιολόγηση των δεδομένων. Τα τρία πιο σημαντικά στοιχεία από τα οποία κρίνεται η ποιότητα των δεδομένων σε αυτό το στάδιο είναι:

- Το ποσοστό της πληρότητας των δεδομένων (ο συνολικός αριθμός των περιθλάσεων σε συγκεκριμένη ευκρίνεια) το οποίο πρέπει να είναι όσο το δυνατό υψηλότερο ($\geq 85\%$).
- Ο λόγος των εντάσεων προς το σφάλμα των εντάσεων $I/\langle\sigma\rangle$ με τιμές μεγαλύτερες του 2.
- Ο παράγοντας R_{merge} ο οποίος δηλώνει την συμφωνία μεταξύ συμμετρικά σχετιζόμενων περιθλάσεων (symmetry related reflections) και πρέπει να λαμβάνει μικρές τιμές.

Στο επόμενο στάδιο της επεξεργασίας των δεδομένων υπολογίζονται οι δομικοί παράγοντες F. Αυτό επιτυγχάνεται με την βοήθεια δυο προγραμμάτων του scalpack2mtz [CCP4, 1994] και του TRUNCATE [Laskowski *et al.*, 1993]. Ο ρόλος του πρώτου προγράμματος είναι να τροποποιεί την μορφή του sca αρχείου έτσι ώστε να παράγεται ένα άλλο αρχείο (mtz) αναγνώσιμο από το TRUNCATE. Εν συνεχεία υπολογίζονται οι δομικοί παράγοντες F από τις εντάσεις I με το πρόγραμμα TRUNCATE.

3.6.5 Βελτιστοποίηση του πρωτεϊνικού μοντέλου

Για τον υπολογισμό των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας εκ διαφοράς Fourier χρησιμοποιείται το πρόγραμμα REFMAC εφαρμόζοντας διορθώσεις για την επίδραση του περιβάλλοντος διαλύτη στην πρωτεΐνη ενώ ως αρχικό μοντέλο χρησιμοποιείται η γνωστή δομή της T διαμόρφωσης της φυσικής φωσφορυλάσης ή συμπλόκου του με κάποιο τροποποιητή. Στη συνέχεια αυτό ακολουθεί λεπτομερής εξέταση των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών "COOT" [Emsley *et al.*, 2004] για ικανοποιητική προσαρμογή των ατόμων στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Στη συνέχεια ελέγχεται ο χάρτης (Fo-Fc) για κορυφές ηλεκτρονιακής πυκνότητας μεγαλύτερες των 3.5σ (σ η τυπική απόκλιση της έντασης της περίθλασης). Οι αναστολές οι οποίοι σχεδιάζονται με πρόγραμμα SYBYL [Tripos Associates, 1992] προσαρμόζονται στις κορυφές ηλεκτρονιακής πυκνότητας στα αντίστοιχα κέντρα σύνδεσης με μικρή μεταβολή των δίεδρων γωνιών με τη βοήθεια του προγράμματος μοριακών γραφικών "COOT". Ακολουθεί τροποποίηση στη θέση αρκετών πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων του ενζυμικού μοντέλου σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) και μόρια ύδατος προστίθενται ή αφαιρούνται από τη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας (Fo-Fc και 2Fo-Fc).

3.6.6 Έλεγχος αξιοπιστίας του πρωτεϊνικού μοντέλου

Το πρωτεϊνικό μοντέλο που προκύπτει από την βελτιστοποίηση πρέπει να πληρεί ορισμένα κριτήρια πριν χρησιμοποιηθεί για δομικές μελέτες και διεξαγωγή συμπερασμάτων. Ορισμένα από αυτά τα κριτήρια περιγράφονται παρακάτω:

A. Κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας R

Ο κρυσταλλογραφικός δείκτης αξιοπιστίας R αποτελεί ένα κριτήριο αξιολόγησης του πρωτεϊνικού μοντέλου που προκύπτει από την βελτιστοποίηση. Συνήθως η τιμή του πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 0.18 και 0.2 και να παραμένει σταθερή μετά από ένα συγκεκριμένο αριθμό κύκλων βελτιστοποίησης.

B. Μήκη και γωνίες δεσμών

Για να είναι ένα μοντέλο αποδεκτό θα πρέπει τα μήκη και οι γωνίες των δεσμών του να είναι παραπλήσιες με τις τιμές που έχουν τα απλά οργανικά μόρια. Ένα κριτήριο το οποίο πιστοποιεί την ύπαρξη της παραπάνω προϋπόθεσης είναι η τιμή μέσης τυπικής απόκλισης (r.m.s) για τα μήκη δεσμών και τις γωνίες. Η τιμή αυτή υπολογίζεται κατά την διάρκεια της βελτιστοποίησης και πρέπει να είναι μικρότερη από 0.02 Å και 4° για τα μήκη δεσμών και τις γωνίες αντίστοιχα έτσι ώστε το πρωτεϊνικό μοντέλο να είναι αποδεκτό.

Γ. Πεπτιδικοί δεσμοί

Οι πεπτιδικοί δεσμοί πρέπει να είναι σχεδόν επίπεδοι.

Δ. Γωνίες διαμόρφωσης

Οι γωνίες διαμόρφωσης ϕ και ψ πρέπει να βρίσκονται εντός των επιτρεπόμενων περιοχών, οι οποίες καθορίζονται από τα διαγράμματα Ramachandran (Σχήμα 23).

E. Γωνίες στρέψης

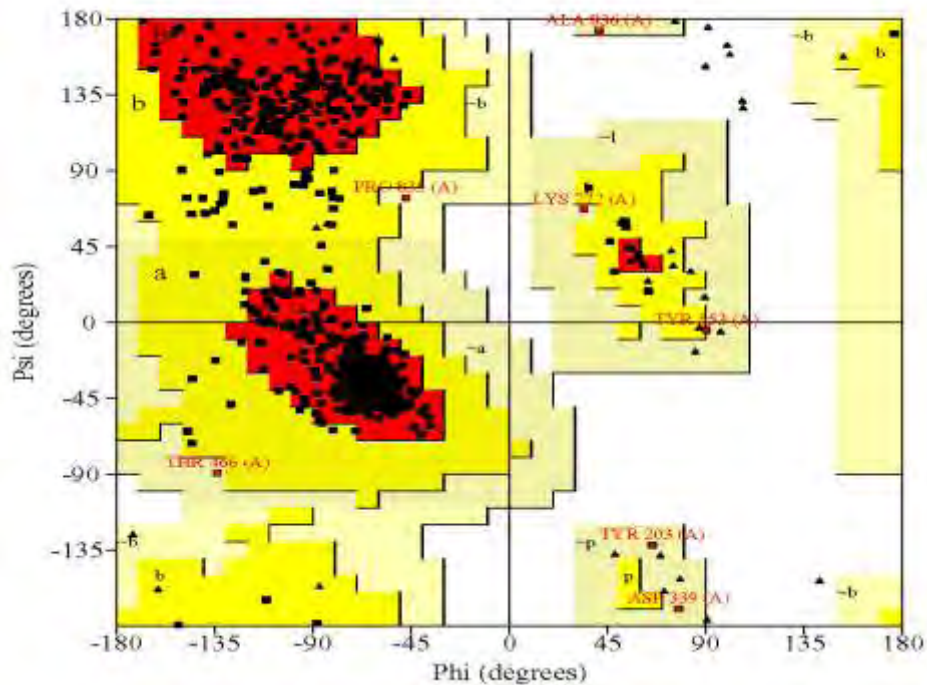
Οι γωνίες στρέψης των απλών δεσμών των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων πρέπει έχουν κατάλληλη διαμόρφωση ώστε να μην προκαλείται στερεοχημική παρεμπόδιση.

ΣΤ. Ευκρίνεια και ακρίβεια των ατομικών θέσεων

Η ακρίβεια των μετρήσεων που πραγματοποιούνται στο στατικό μοντέλο εξαρτάται από την ακρίβεια του προσδιορισμού των ατομικών θέσεων. Το μέγιστο σφάλμα στον προσδιορισμό

των θέσεων των ατόμων εξαρτάται από την ευκρίνεια της κρυσταλλογραφικής ανάλυσης και τον κρυσταλλογραφικό δείκτη αξιοπιστίας R και μπορεί να προσδιοριστεί με βάση το διάγραμμα Luzzati.

Το διάγραμμα Luzzati είναι μια γραφική παράσταση η οποία εκφράζει την συνολική ή μέση ακρίβεια της θέσης των ατόμων σε ένα βελτιστοποιημένο κρυσταλλογραφικό μοντέλο (Σχήμα 24). Στον κάθετο άξονα του διαγράμματος φαίνονται οι τελικές τιμές του παράγοντα R ενώ στον οριζόντιο άξονα η αντίστροφη τιμή της απόστασης ($1/d$) μεταξύ των επιπέδων του πραγματικού πλέγματος (real lattice plane). Οι τιμές που βρίσκονται δεξιά από κάθε καμπυλή είναι οι θεωρητικές εκτιμήσεις της μέσης απόκλισης των θέσεων των ατόμων στο βελτιστοποιημένο μοντέλο. Η πραγματική μέση απόκλιση των θέσεων των ατόμων υπολογίζεται όταν η πειραματική καμπύλη του παράγοντα R βρίσκεται κοντά στην θεωρητική καμπύλη.

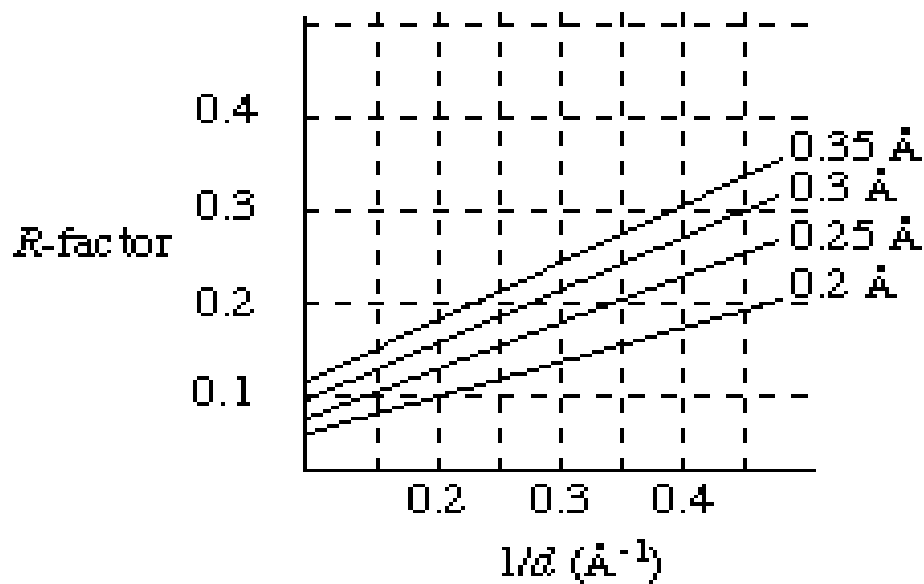


Κατάλοιπα σε πιο ευνοϊκές περιοχές [A, B, L]

Κατάλοιπα σε επιπλέον επιτρεπτές περιοχές [a, b, l, p]

Κατάλοιπα σε γενικά επιτρεπτές περιοχές [~a, ~b, ~l, ~p]

Σχήμα 23. Διάγραμμα Ramachandran το οποίο προκύπτει από το πρόγραμμα PROCHECK [Laskowski et al., 1993] και δείχνει τις επιτρεπόμενες περιοχές. Από την κρυσταλλογραφική ανάλυση 118 πρωτεϊνικών δομών σε ευκρίνεια τουλάχιστον 2 Å και κρυσταλλογραφικό δείκτη αξιοπιστίας R μικρότερο του 20% προκύπτει ότι σε ένα καλής ποιότητας μοντέλο το 90% των καταλοίπων βρίσκονται στις περιοχές A, B και L.



Σχήμα 24. Διάγραμμα Luzzati.

Z. Θερμική δόνηση και αποδιάταξη

Ο συντελεστής θερμοκρασίας B που λαμβάνεται κατά την βελτιστοποίηση της δομής του πρωτεϊνικού μοντέλου εμπεριέχει τόσο την επίδραση της θερμικής δόνησης όσο και την επίδραση της αποδιάταξης των ατόμων του μορίου και μπορεί να καθοριστεί με βάση τη σχέση

$$B_j = 8\pi^2 (u_j^2)$$

όπου (u_j^2) : η μέση τετραγωνική εκτόπιση του ατόμου j από τη θέση που έχει όταν βρίσκεται σε ηρεμία.

Η αποδιάταξη αναφέρεται στα άτομα ή τις ομάδες ατόμων που δεν καταλαμβάνουν την ίδια θέση σε κάθε στοιχειώδη κυψελίδα ή σε κάθε ασύμμετρη μονάδα ή σε κάθε μόριο της ασύμμετρης μονάδας και εκφράζεται με την κατάληψη (g_j) η οποία αποτελεί μέτρηση του κλάσματος των μορίων στα οποία το άτομο j κατέχει πλήρως την θέση που προσδιορίζεται από το μοντέλο. Για παράδειγμα ένα μόριο ύδατος το οποίο καταλαμβάνει μια συγκεκριμένη θέση στο 30% της στοιχειώδους κυψελίδας έχει g_j ίσο με 0.3. Οι τιμές της κατάληψης των ατόμων της πρωτεΐνης συνήθως διατηρούνται σταθερές και ίσες με 1.0 κατά την διάρκεια της βελτιστοποίησης του πρωτεϊνικού μοντέλου [Rhodes, 2006].

3.6.7 Δομική ανάλυση των συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα

Η δομική ανάλυση μιας πρωτεϊνικής δομής της GP παρουσία αναστολέα περιλαμβάνει την καταγραφή των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ του αναστολέα και του ενζύμου και εκτελείται από τα προγράμματα CONTACT [CCP4, 1994], HBPLUS [McDonald *et al.*, 1994], DISTANG [CCP4, 1994]. Οι δεσμοί υδρογόνου αναγνωρίζονται από τα παραπάνω προγράμματα όταν η απόσταση μεταξύ των ηλεκτρωνητικών ατόμων είναι μικρότερη από 3.3 Å και εφόσον η γωνία μεταξύ αυτών και του προηγούμενου ή επόμενου ατόμου είναι πάνω από 90°. Αντίστοιχα, οι δεσμοί van der Waals αποδίδονται όταν δύο μη υδρογονικά άτομα απέχουν μεταξύ τους λιγότερο από 4 Å [CCP4, 1994]. Οι υπολογισμοί της ακρίβειας των ατομικών συντεταγμένων εμπεριέχουν σφάλματα της τάξης των 0.2 Å όπως προκύπτει από το διάγραμμα Luzzati. Ακολουθεί αντιπαραβολή μεταξύ των δομών του φυσικού ενζύμου και του συμπλόκου ένζυμο-αναστολέας με το πρόγραμμα 'LSQKAB [CCP4, 1994] με σκοπό να διαπιστωθεί αν η σύνδεση του αναστολέα προκαλεί αλλαγές στην πρωτεϊνική δομή. Επιπλέον η υπέρθεση δομών μεταξύ διαφορετικών συμπλόκων δίνει πληροφορίες για τις διαμορφωτικές αλλαγές που υφίσταται η πρωτεΐνη κατά την σύνδεση διαφορετικών αναστολέων. Σε αυτό το στάδιο υπολογίζεται επίσης η επιφάνεια της πρωτεΐνης και

των αναστολέων που είναι προσιτή στο διαλύτη με το πρόγραμμα NACCESS [Hubbard et al., 1993]. Η μοριακή απεικόνιση των δόμων (π.χ. σχεδιαγράμματα) εκτελείται με το πρόγραμμα PyMOL [<http://www.pymol.org>].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

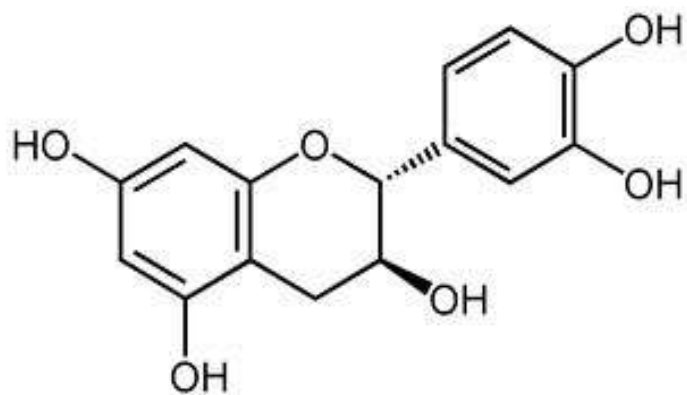
4.1 ANTIKEIMENO ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σχεδιασμός με βάση τη μακρομοριακή δομή, η σύνθεση, η βιοχημική και βιολογική μελέτη της ουσίας αποτελεί σήμερα μία πορεία εργασιών με στόχο την ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και μεγάλη συγγένεια της με την πρωτεΐνη-στόχο. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της της πορείας αυτής και συγκεκριμένα αποσκοπεί στη βιοχημική και κρυσταλλογραφική μελέτη ουσιών που έχουν βρεθεί σε εκχύλισμα οίνου.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά η κινητική μελέτη εκχυλίσματος οίνου, για τον προσδιορισμό της ικανότητάς του να αναστέλλει τη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου b (GPb) από κουνέλι και στη συνέχεια ακολούθησε η ταυτοποίηση της ενεργού ένωσης του εκχυλίσματος με κρυσταλλογραφικές μεθόδους και η κινητική και δομική μελέτη της σύνδεσης της στο ένζυμο.

Η επιλογή του μυϊκού ισοενζύμου της GP κουνελιού έγινε λόγω της μεγάλης ομολογίας που παρουσιάζουν το ηπατικό και το μυϊκό ένζυμο (80% στην αμινοξική αλληλουχία ολόκληρων των μορίων και 100% στα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ισοένζυμα του ανθρώπου: «ηπατικό», «μυϊκό» και «εγκεφάλου», έχουν ομολογία 80-83%, ενώ για το καταλυτικό κέντρο η ομολογία είναι 100%. Επίσης, μελέτες μοντελισμού έδειξαν ότι το καταλυτικό κέντρο της ηπατικής ανθρώπινης φωσφορυλάσης και της μυϊκής φωσφορυλάσης κουνελιού δεν διαφέρουν ούτε στην αλληλουχία αλλά ούτε και στη δομή.

Αρχικά, με κινητικά πειράματα βρέθηκε πως το εκχύλισμα οίνου είχε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Κρυσταλλογραφικές μελέτες με τετραγωνικούς κρυστάλλους της GPb οι οποίοι εμποτίσθηκαν με διάλυμα του εκχυλίσματος οδήγησαν στην ταυτοποίηση του ενεργού συστατικού ως την κατεχίνη (Σχήμα 25). Στη συνέχεια μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση της κατεχίνης στη δραστικότητα της GPb.

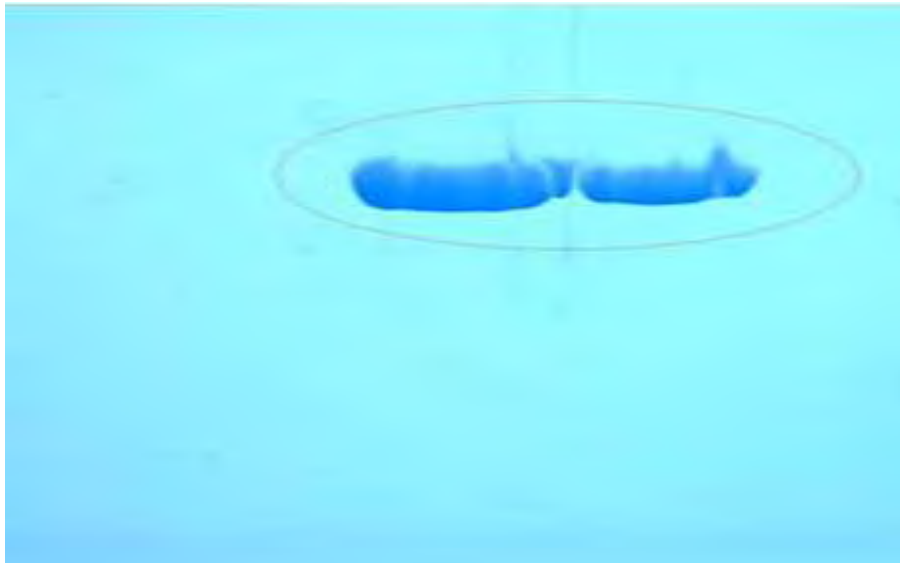


Σχήμα 25. Ο συντακτικός τύπος της κατεχίνης.

Ακολούθησε προσδιορισμός της δομής του συμπλόκου ενζύμου αναστολέα με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου αποκάλυψε την ενεργή ένωση του εκχυλίσματος και το κέντρο σύνδεσης της.

4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ β ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

Από 530gr μυϊκού ιστού απομονώθηκαν 100,9 mg ενζύμου, του οποίου η καθαρότητα από οποιαδήποτε άλλη πρόσμιξη ελέγχθηκε με την πραγματοποίησης ηλεκτροφόρησης τύπου SDS- PAGE όπως αποτυπώνεται παρακάτω (Σχήμα 26).



Σχήμα 26. Πηκτή ακρυλαμίδης με δείγμα φωσφορυλάσης *b* του γλυκογόνου, σε δύο διαφορετικές

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

4.3.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

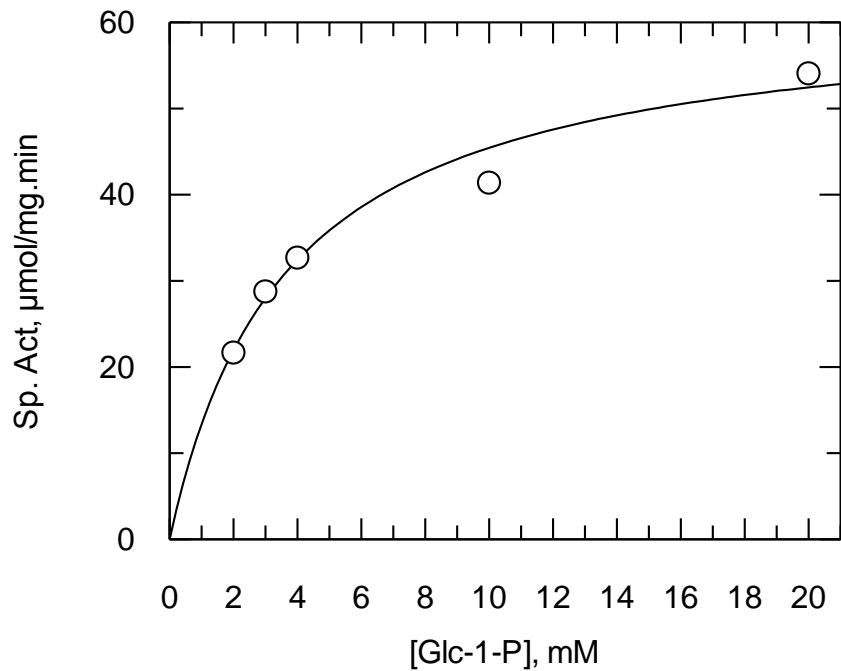
Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (G-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}) [Γεωργιάτσος, 2001].

Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5 mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m .

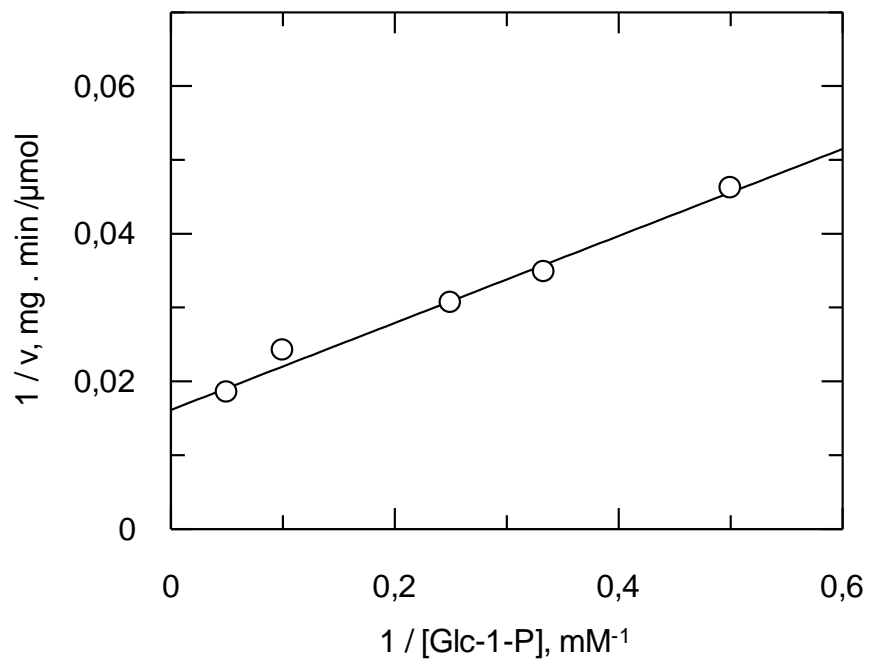
Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι:

$$K_m = 3.65 \pm 0.43 \text{ mM} \text{ και } V_{max} = 62.03 \pm 3.46 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$$

Στα ακόλουθα σχήματα παρουσιάζονται οι καμπύλες της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, *specific activity*, *sa*, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (Glc-1-P).



Σχήμα 27. Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης *b* του γλυκογόνου σε διάφορες συγκεντρώσεις (2.0, 3.0, 4.0, 10.0, 20.0mM) του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης, στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση AMP (1.0mM) και γλυκογόνου (1% w/v). Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

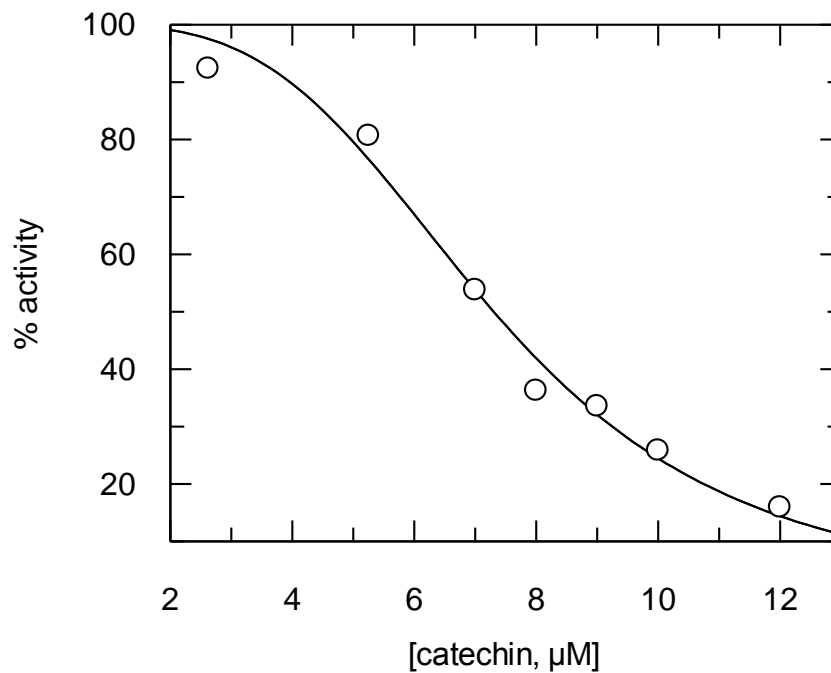


Σχήμα 28. Αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver και Burk της σχέσης του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης.

4.3.2 Κινητική μελέτη του εκχυλίσματος οίνου b10

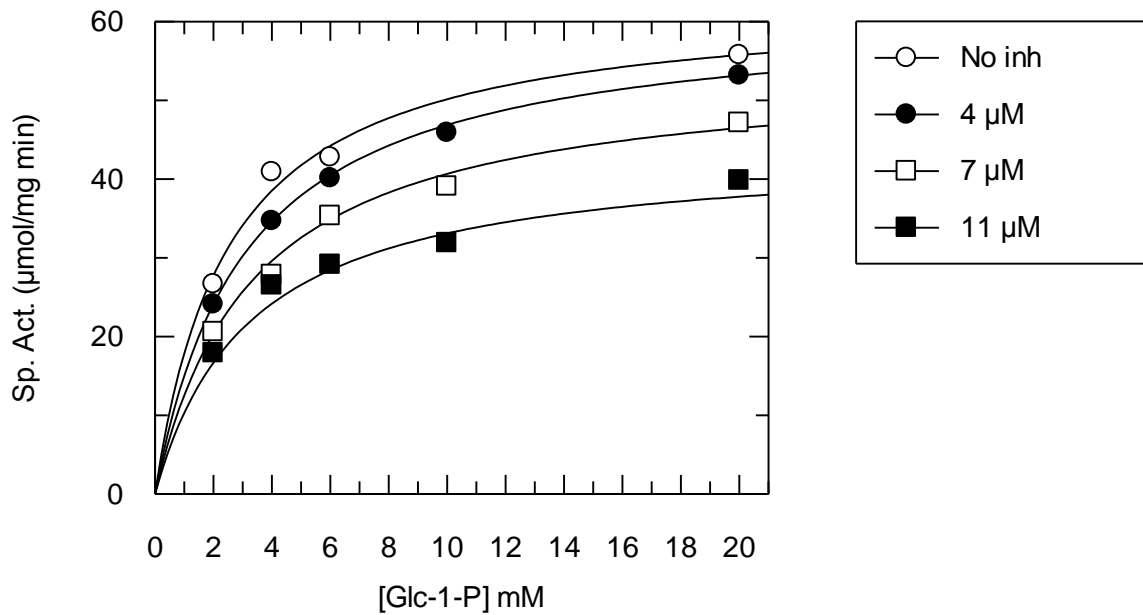
Η σταθερά IC_{50} εκφράζει την συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί 50% αναστολή της δραστηρότητας του ενζύμου.

Μέσω της χρήσης του προγράμματος Graffit γίνεται επεξεργασία των αποτελεσμάτων των κινητικών πειραμάτων για τον αναστολέα και αφού λήφθηκε υπόψη η περιεκτικότητα σε κατεχίνη του εκχυλίσματος οίνου προκύπτει το ακόλουθο διάγραμμα (Σχήμα 29), μέσω του οποίου η σταθερά αναστολής IC_{50} υπολογίζεται σε $7.012 \pm 0.273 \mu\text{M}$.

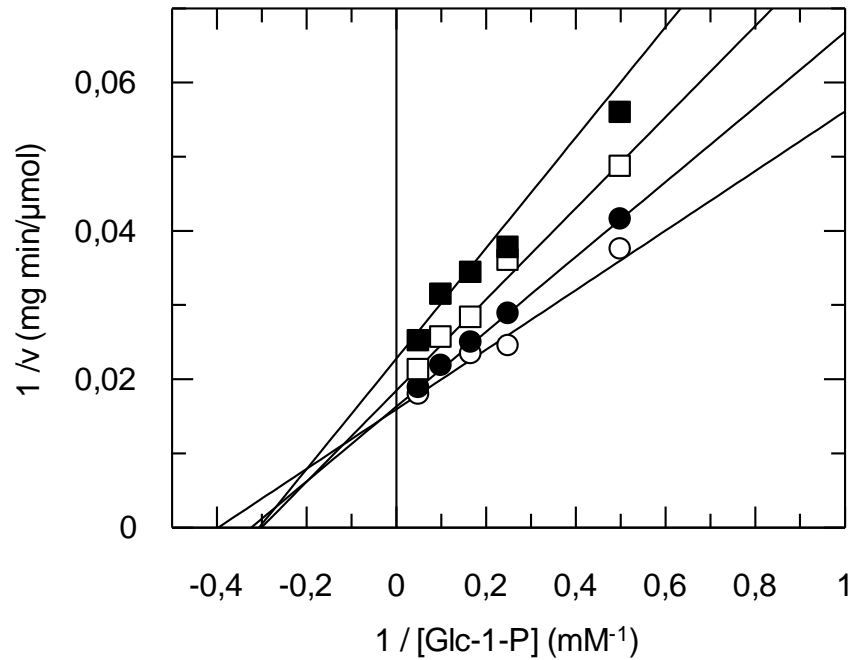


4.3.3 Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής K_i της κατεχίνης

Όπως φαίνεται από το σχήμα 30 η κατεχίνη είναι μη συναγωνιστικός αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.



Σχήμα 30. Το διάγραμμα (υπερβολή) απεικονίζει την ειδική δραστηριότητα (Sp.Act.) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος με διαφορετικής συγκέντρωσης κατεχίνης (No inhibitor, 4 μM , 7 μM , και 11 μM).

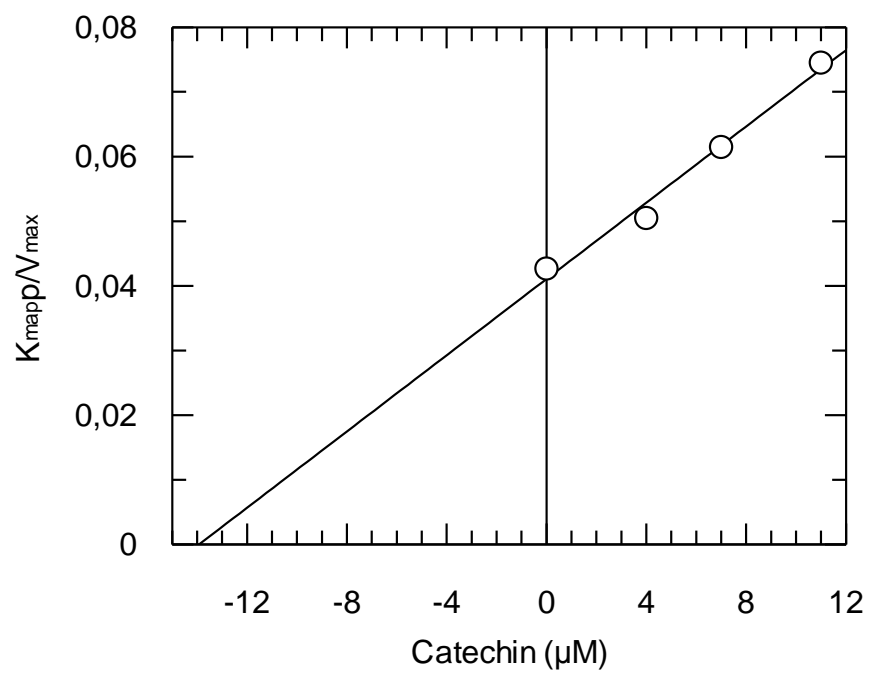


Σχήμα 31. Το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει το αντίστροφο της ειδικής δραστηριότητας (*Sp.Act.*) σε συνάρτηση με το αντίστροφο της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κατεχίνης (0 μM \circ , 4 μM \bullet , 7 μM \square , και 11 μM \blacksquare).

Στη μη συναγωνιστική αναστολή η σταθερά αναστολής υπολογίζεται από τη σχέση:

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

Από τη σχέση αυτή προκύπτει πως από το διάγραμμα της K_{app}/V_{max} σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναστολέα μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά αναστολής.



Σχήμα 32. Ο λόγος $K_{\text{map}}/V_{\text{max}}$ σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της κατεχίνης.

Η σταθερά αναστολής της κατεχίνης βρέθηκε $K_i = 13.9 \pm 1.4 \mu\text{M}$

4.3.4 Κρυσταλλογραφική μελέτη

Η κρυσταλλογραφική μελέτη αποτέλεσε το επόμενο στάδιο της έρευνάς μας και είχε ως στόχο την ταυτοποίηση της ενεργού ένωσης του εκχυλίσματος οίνου και τη μελέτη του τρόπου σύνδεσής της στο ένζυμο, για την ερμηνεία των κινητικών αποτελεσμάτων.

Τα επί μέρους στάδια της μελέτης είναι τα εξής:

Εμποτισμός μονοκρυστάλλου GPb (διαμόρφωση T) με διάλυμα του αναστολέα και συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων X

Κρύσταλλος φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου, που είχε αναπτυχθεί με τη μέθοδο batch εμβαπτίστηκε σε διάλυμα εκχυλίσματος οίνου που είχε αραιωθεί με 10 mM BES pH 6.8 και έπειτα επώαστηκε για 9 h. Ακολούθησε η τοποθέτηση του κρυστάλλου στη διάταξη του σχήματος 16 με τέτοιο τρόπο ώστε κατά την περιστροφή του να παραμένει στη δέσμη της ακτινοβολίας.

Βελτιστοποίηση του μοντέλου

Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο τη δομή της T διαμόρφωσης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου όπως παρουσιάζεται στο σύμπλοκο του ενζύμου με την α-D-γλυκόζη με τη βοήθεια του προγράμματος REFMAC [CCP4, 1994]. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται είναι οι ατομικές συντεταγμένες, οι συντελεστές θερμοκρασίας και οι συντελεστές κατάληψης (occupancies). Οι στερεοχημικοί περιορισμοί που λαμβάνονται υπόψη για την ελαχιστοποίηση της τιμής της ελεύθερης ενέργειας αυξάνουν το λόγο των παρατηρήσεων προς τον αριθμό των παραμέτρων. Τα επιπρόσθετα αυτά δεδομένα προέρχονται από τη γνώση της στερεοχημείας των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα τα μήκη και οι γωνίες των δεσμών μεταξύ των ατόμων, πληροφορίες που είναι γνωστές από τις ακριβείς δομές των αμινοξέων. Ένα μέρος των δεδομένων περίθλασης (5-10%) επιλέγεται τυχαία πριν από τη διαδικασία βελτιστοποίησης με σκοπό να υπολογιστεί ο

αρχικός δείκτης αξιοπιστίας R , ο οποίος στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητο κριτήριο της προόδου της βελτιστοποίησης [Brunger, 1992].

Στατιστικά στοιχεία συλλογής κρυσταλλογραφικών δεδομένων του συμπλόκου GPb- κατεχίνης	
Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης διαποτίζονται με διάλυμα εκχυλίσματος οίνου για 9 h
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας MAX-Lab, Lund, Σουηδία	X12- EMBL Hamburg
Μήκος κύματος, λ (Å)	0.81
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.8
Θερμοκρασία (K)	100
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων	37
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4 ₃ 2 ₁ 2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας a, b, c (Å)	126.0, 126.0, 115.3
Αριθμός μορίων/Ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	30.0 – 2.05
Συνολικός αριθμός περιθλάσεων	504978
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (Εξώτ. στοιβάδα)	54508 (2706)
R_{merge} (Εξωτερική στοιβάδα)*	0.098 (0.486)
Πληρότητα (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	92.7 (92.9)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.09 – 2.05
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ (Εξωτερική στοιβάδα)**	10.9 (2.7)
Πολλαπλότητα (Εξωτερική στοιβάδα)	2.4 (2.2)
Τιμή συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Wilson plot)	27.5

*Ο συντελεστής R_{merge} ορίζεται ως $R_m = \sum_i \sum_h |(I_h) - I_{ih}| / \sum_i \sum_h I_{ih}$, όπου (I_h) και I_{ih} είναι η μέση και η i-οστή μέτρηση της έντασης για την περιθλαση h, αντίστοιχα. R_{iso} είναι η μέση κλασματική ισόμορφος διαφορά των ευρών των δομικών παραγόντων από τη φυσική GPb, T διαμόρφωσης.

** $\sigma(I)$ είναι η τυπική απόκλιση του I.

Ακολούθησαν πολλαπλοί κύκλοι διόρθωσης του μοντέλου με το πρόγραμμα COOT [Paul Emsley & Kevin Cowtan, 2004] και βελτιστοποίησης με το REFMAC.

Τα μόρια του ύδατος προστέθηκαν στο μοντέλο εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπιζόνταν στον ηλεκτρονικό χάρτη 2Fo-Fc με σ 1.0. Τα μόρια των αναστολέων συμπεριλήφθηκαν επίσης στα τελικά στάδια της διαδικασίας της βελτιστοποίησης (refinement) και τα αρχικά τους μοντέλα προήλθαν από τη βιβλιοθήκη του COOT. Τέλος, η βελτιστοποίηση των ισοτροπικών παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων βελτίωσε αισθητά το τελικό μοντέλο.

Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας διαφοράς Fo-Fc και 2Fo-Fc στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης έδειξε πρόσθετη ηλεκτρονική πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου που υποδήλωνε χωρίς αμφιβολία τη σύνδεση της ένωσης DK12 σε αυτό. Ακολούθησε διαδοχική βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στους νέους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πακέτο προγραμμάτων CCP4.

Αρχικά, έγινε βελτιστοποίηση ατομικών συντεταγμένων (positional refinement) και ακολούθησε βελτιστοποίηση του ατομικού ισοτροπικού συντελεστή θερμοκρασίας B (B factor). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας Fo-Fc και 2Fo-Fc. Το τελικό μοντέλο περιείχε τα αμινοξέα 12-836, 146 μόρια ύδατος, τον αναστολέα και την φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Οι δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

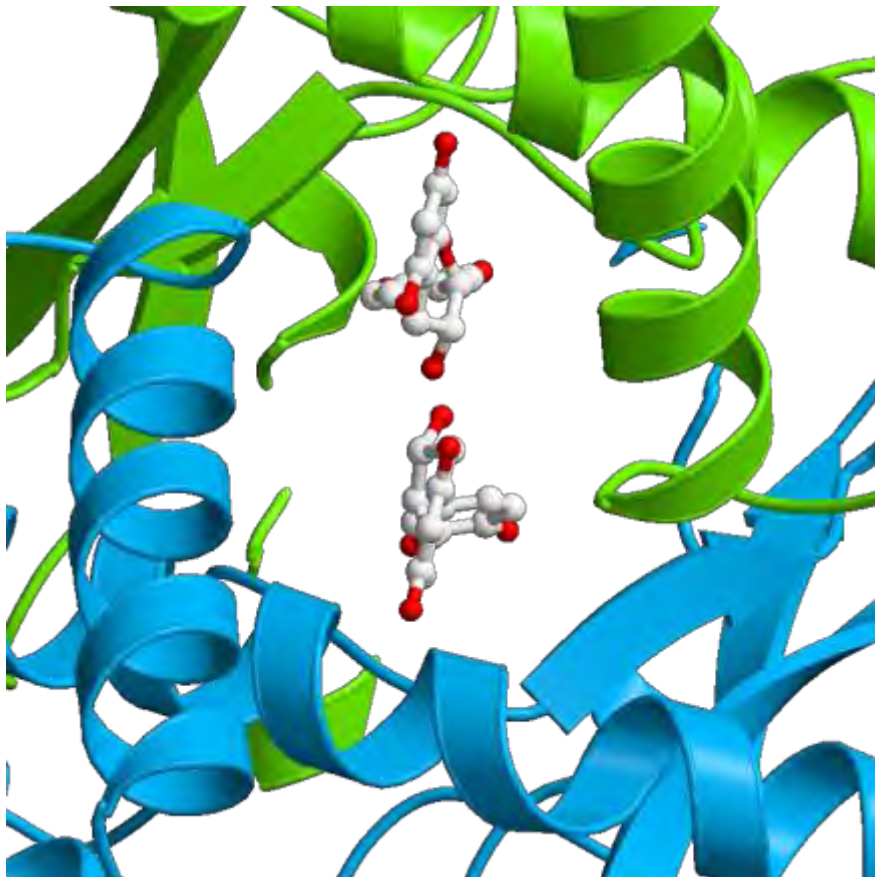
Παρουσίαση στατιστικών χαρακτηριστικών του τελικού μοντέλου GPb-κατεχίνης

Βελτιστοποίηση (Ευκρίνεια) (Å)	86.5 - 2.1
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (παραλείπονται) κατά την βελτιστοποίηση [#]	51591 (2759)
Αμινοξέα που περιελήφθησαν	(12-254) (261-314) (324-836)
Αριθμός πρωτεϊνικών ατόμων	6591
Αριθμός μορίων ύδατος	341
Αριθμός ατόμων υποκαταστατών	21 άτομα (κατεχίνη) 24 άτομα (PLP)
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας R (R_{free})* (%)	21.941 (26.441)
R (R_{free}) (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	27.1 (31.8)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) του μήκους δεσμών (Å)	0.008
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) της γωνίας των δεσμών (°)	1.134
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Πρωτεϊνικά άτομα)	
Όλα τα άτομα	31.0
Ca, C, N, O	30.4
Πλευρική αλυσίδα	31.6
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (ετεροάτομα)	
κατεχίνη	71.8
Μόρια ύδατος	35.3

* Ο δείκτης αξιοπιστίας R ορίζεται ως $R = \frac{\sum |F_o| - |F_c|}{\sum F_o}$, όπου F_o και F_c είναι τα παρατηρούμενα και τα υπολογιζόμενα εύρη των δομικών παραγόντων, αντίστοιχα.

[#] Ποσοστό 5% επί του συνόλου των περιθλάσεων που χρησιμοποιείται κατά τη βελτιστοποίηση. Χρησιμεύει για την πιστοποίηση της ορθής εξέλιξης της βελτιστοποίησης.

Η κατεχίνη κατά τη σύνδεση της στο νέο αλλοστερικό κέντρο της GPb σχηματίζει 2 δεσμούς υδρογόνου και συμμετέχει σε 76 αλληλεπιδράσεις van der Waals με αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης και ο δακτύλιος του ναφθυλίου προσανατολίζεται προς τις πιο υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες των γύρω αμινοξέων, (Σχήμα 33). Η παρούσα μελέτη μπορεί να αποτελέσει την αφετηρία για το σχεδιασμό νέων ενώσεων, χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο ένωση την κατεχίνη, οι οποίες θα συνδέονται στο νέο αλλοστερικό κέντρο. Μελέτες μοντελισμού προς αυτήν την κατεύθυνση είναι σε εξέλιξη.



Σχήμα 33. Η σύνδεση της κατεχίνης στο νέο αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στον κρύσταλλο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Ι. Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν

<u>Ουσία</u>	<u>Συντακτικός τύπος</u>	<u>Μοριακό βάρος</u>	<u>Εταιρία</u>
Μολυβδαινικό αμμώνιο	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1236.86	Merk
Οξικός ψευδάργυρος	$\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	219.49	Sigma- Aldrich
L (+) ασκορβικό οξύ	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	176.13	Merk
β-φωσφογλυκερόλη	$\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	306.12	Merk
β-μερκαπτοαιθανόλη	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	78.3	Serva
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	372.24	Panreac
5'-φωσφορική αδενοσίνη, AMP		347.2	Merk
Διθειοθρεϊτόλη, DTT	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	154.3	Serva
α-D-1-φωσφορική γλυκόζη, α-D-G-1-P	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_9\text{PNa}_2$	376.06	Serva
Χλωριούχο κάλιο	KCl	74.56	Sigma- Aldrich
Δις-οξινο-φωσφορικό κάλιο	KH_2PO_4	136.09	Ferak Berlin
Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο, SDS	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	288.38	Sigma- Aldrich

Πίνακας II. Συντμήσεις

AMP	5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
DTT	Διθειοτριόλη
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
Glc	α-D-γλυκόζη
Glc-1-P	α-D-1-φωσφορική γλυκόζη
GP	Φωσφορυλάση γλυκογόνου
GPb	Φωσφορυλάση γλυκογόνου b
K_m	Σταθερά Michaelis-Menten
NaN_3	Νατραζίδιο
Pi	Ορθοφωσφορικό ανιόν
PLP	5' φωσφορική πυριδοξάλη
SDS	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
Tris	Τρις(υδροξυ-μέθυλο)-αμινομεθάνιο
V_{max}	Οριακή ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

-Alexacou, K.-M., Hayes, J.M, Tiraidis, C., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Archontis, G., Oikonomakos, N.G., Paul, J.V., Varghese, B. and Loganathan, D. 2008. Crystallographic and computational studies on *N*-(β -Dglucopyranosyl)-4-phenyl-1,2,3-triazoleacetamide, an inhibitor of glycogen phosphorylase: comparison with α -D-glucose, *N*-acetyl- β -D-glucopyranosylamine and *N*-benzoyl-*N'*- β -D-glucopyranosyl urea binding. *Proteins* 71, 1307-1323.

-Arndt, U.W.; Wonnacott, A.J. (Eds.): *The Rotation Method in Crystallography*. North Holland, Amsterdam, (1977).

-Bacon, David J. and Anderson, Wayne F. 1988. A fast algorithm for Rendering Space-Filling Molecule Pictures, *Journal of Molecular Graphics*, 6, 219-220.

-Bailey CJ. Potential new treatments for type 2 diabetes. *Trends Pharmacol Sci*. 2000 Jul;21(7):259-65. Review

-Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N. 1989. The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature* 340, 609-616.

-Barman, T.E., 1969 *Enzyme Handbook*, Springer-Verlag-Berlin-Heidelberg-New York Vol 1pg 302

-Brunger A. T., 1992, Free R value - a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystals. *Nature*, 355, 472-475.

-CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4), 1994, *The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography*, *Acta Crystallogr.*, D50, 760-763.

-Chrysin E.D., Kosmopoulou, M.N., Tiraidis C., Kardakaris R., Bischler, N., Leonidas

-DeFronzo RA. *Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis.* *Neth J Med.* 1997 May;50(5):191-7. Review

-Drenth JP, Jansen JB. *From gene to disease; hereditary pancreatitis].* *Ned Tijdschr Geneesk.* 2000 Nov 25;144(48):2301-2. Review. Dutch.

-Dreath, J., 2002, *Principles of protein x-ray crystallography*, Springer, New York

-P.Emsley, P.; Cowtan, K. *Acta Crystallogr., . D. Biol. Crystallogr Sect. D* 2004, 60, 2126.

-Fischer, E. H. & Krebs, E. G., 1962, *Muscle Phosphorylase B.* In *Methods of Enzymology*, (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O., eds.), Vol. 5, pp. 369-373, Academic Press, San Diego.

-Fiske C. H. & Subbarow Y., 1925, *The colometric determination of phosphorous*, *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.

-Helmreich E, Cori CF. *The role of adenylic acid in the activation of phosphorylase.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1964 Jan;51:131-8.

- Helmreich E, Cori CF. *The effects of PH and temperature on the kinetics of the phoshorylase reaction.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1964 Sep;52:647-54.

-Johnson L. N. & Hajdu J., 1989, *Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals*, *Biophysics & Synchrotron Radiation*, Hasnain S. ed, 142-155, Ellis Horwood, Chichester

- Kraulis, P., 1991, MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.*, 24, 946-950.
- Kurukulasuriya, R., Link, J.T., Madar, D.J., Peil, Z., Richards, S.J., Rohde, J.J., Souers, A.J. and Szczepankiewicz, B.G., 2003. Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of the hepatic glucose production. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 123-153
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M., 1993, PROCHECK-A program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.*, 26, 283-291.
- Leatherbarrow, R. J., 1990, Using linear and non-linear regression to fit biochemical data, *TIBS*, 15, 455-458.
- Leatherbarrow B, Nerad JA, Carter KD, Pe'er J, Spencer J. *Br J Ophthalmol.* 1992 Aug;76(8):507-8. Phacomatous choristoma of the orbit: a case report.
- Martin W.H., Hoover D.J., Armento S.J., Stock I.A., McPherson R.K., Danley D.E., Stevenson R.W., Barrett E.J. and Treadway J.L., 1998, Discovery of a human glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 1776-1781
- Martin J. L., Johnson L. N. & Withers S. G., 1990, Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b, *Biochemistry*, 29, 10745-10757.
- McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., 2000, *Essentials of Exercise Physiology*, Τόμος Ι, Έκδοση 2η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.
- McDonald, I.K. and J.M. Thornton, Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J. Mol. Biol.*, 1994. 238: p. 777-793

- McLaughlin, P.J., Stuart, D.I., Klein, H.W., Oikonomakos, N.G., and Johnson, L.N. 1984. Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry* 23, 5862-5873.
- Melpidou AE, Oikonomakos NG. Effect of glucose-6-P on the catalytic and structural properties of glycogen phosphorylase a. *FEBS Lett.* 1983 Apr 5;154(1):105-10
- Moller N, Rizza RA, Ford GC, Nair KS. Assessment of postabsorptive renal glucose metabolism in humans with multiple glucose tracers. *Diabetes.* 2001 Apr;50(4):747-51---
- Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., 1963, *Allosteric Proteins and Cellular Control Systems*, *J. Mol. Biol.*, 6, 306-329
- Monod J., Wyman J. & Changeux J-P., 1965, *On the nature of allosteric transitions: a plausible model*, *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118.
- Moran S. & Steward L., 2000/1, *High-throughput Crystallization*, *DDW*, 41-46
- Nicholls A and Honig B (1991) *A rapid finite difference algorithm, utilising successive over-relaxation to solve the Poisson-Boltzmann equation*. *J Comput Chem*, 12, 435-445.
- Oikonomakos N. G., Melpidou A.E & Johnson L. N., 1985, *Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalic characterization*, *Biochem. Biophys. Acta*, 832, 248-256.
- Οικονομάκος Ν. Γ., 1977. *Χημική τροποποίηση ενός αλλοστερικού ενζύμου*, *Διδακτορική διατριβή*, ΕΚΠΑ.
- Oikonomakos N. G., Acharya K. R. & Johnson L. N., 1992, *Post-Translational Modifications of Proteins*, Harding J. J. & Crabbe M. J. C. eds, *CRC Press Inc.*, Boca Raton, Florida, 81-127

-Oikonomakos, N. G., Kontou, M., Zographos, S. E., Watson, K. A., Johnson, L. N., Bichard, C. J., Fleet, G. W. & Acharya, K. R. (1995). *N*-acetyl-beta-D-glucopyranosylamine: a potent T-state inhibitor of glycogen phosphorylase. A comparison with alpha-D-glucose, *Protein Sci.*, 4, 2469-2477.

-Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G. and Johnson, L.N. (2000). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* 8, 575-584.

-Οικονομάκος Ν. Γ. 2001, Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*, 63, 258-261

-Oikonomakos, N.G. 2002. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586.

-Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysinia, E.D., Somsák L., Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B. and Gergely, P. 2002. The binding of *N*'-acetyl- and Benzoyl-*N*'-β-D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696

-Otwinowsky Z. & Minor W., 1997, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.*, 276, 307-326.

-P. Emsley and K. Cowtan (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica D* 60, 2126-2132

-Σωτήριος Α. Ράπτης, *Εσωτερική Παθολογία, Δ' Τόμος*, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε.

- Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinowetz 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*, 7, No 9, 677-682
- Rhodes G, 2006 *Crystallography made crystal clear*, Academic Press Inc., London
- Saheki, S., Takeda, A. & Shimazu, T., 1985, *Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity*, *Anal. Biochem.*, 148, 277-281.
- Segel, L.H., 1975, *Enzyme kinetics*, Wiley interscience, New York.
- Sprang SR, Goldsmith EJ, Fletterick RJ, Withers SG, Madsen NB. *Biochemistry*. 1982 Oct 12;21(21):5364-71 *Catalytic site of glycogen phosphorylase: structure of the T state and specificity for alpha-D-glucose.*
- Sprang S.R, Fletterick RJ, Gráf L, Rutter WJ, Craik CS. *Crit Rev Biotechnol. Studies of specificity and catalysis in trypsin by structural analysis of site-directed mutants* 1988;8(3):225-36.
- Stryer, 1997 L., 1997. *Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 2η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο*
- Triantafillidou D, Georgatsos JG. *Barley beta-galactosidase: structure, function, heterogeneity, and gene origin.* *J Protein Chem*. 2001 Oct;20(7):551-62.
- Verlinde C. L. M. J. & Hol W. G. J., 1994, *Structure-based drug design: progress, results and challenges*, *Structure* 2, 577-587.