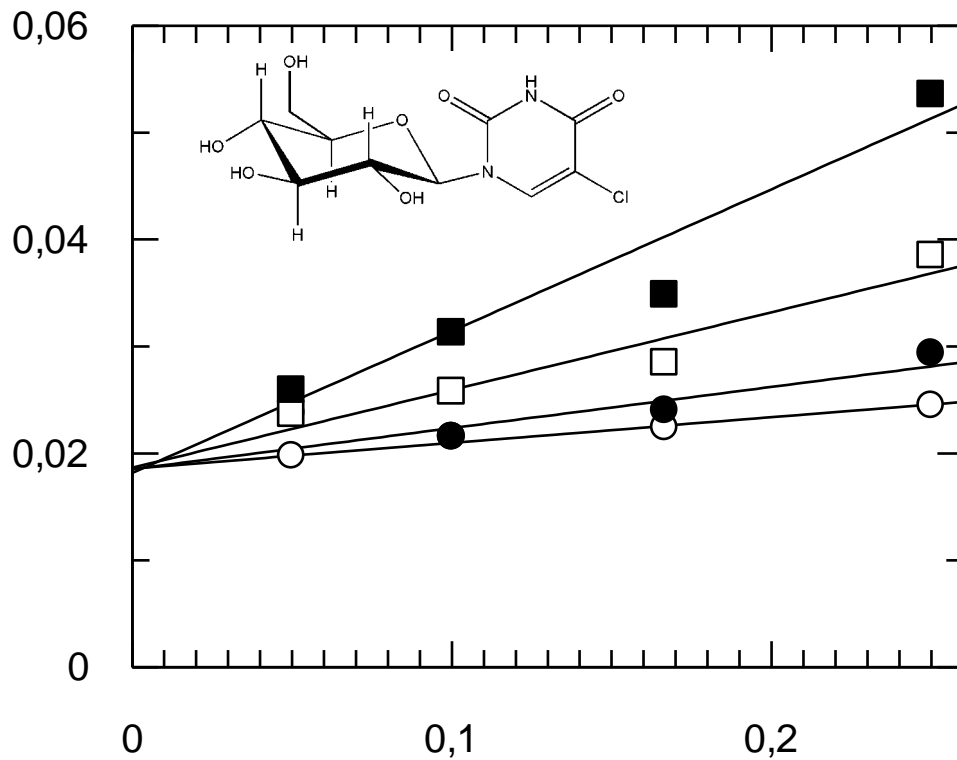


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ -ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΗ 5΄ΘΕΣΗ
ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ



ΚΟΥΤΣΟΓΙΑΝΝΗΣ ΖΗΣΗΣ
ΛΑΡΙΣΑ 2011

**Η ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΗ 5΄ΘΕΣΗ
ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

Τριμελής επιτροπή:

- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**

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

- **Δρ. Κομιώτης Δημήτριος**

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

- **Δρ. Κοντού Μαρία**

Λέκτορας Κλινικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε τη χρονική περίοδο Νοέμβριος 2011- Μάιος 2011, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στον κ. Δημήτρη Λεωνίδα, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα αλλά και για τη συμβολή του στη σωστή διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών, παρέχοντας μου τις πολύτιμες υποδείξεις του και τη πετυχημένη καθοδήγηση του.

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

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	5
Abstract.....	5
Εισαγωγή.....	6
Θεωρητικό μέρος.....	10
Γλυκόζη.....	10
Γλυκογόνο.....	11
Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	12
Ενζυμική αναστολή.....	14
Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	16
Κλινική σημασία γλυκόζης.....	19
Φωσφορυλάση γλυκογόνου.....	20
Κέντρα σύνδεσης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	23
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	28
Υλικά και μέθοδοι.....	30
Απομόνωση της φωσφορυλάσης b από σκελετικούς μυς κουνελιού.....	30
Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	34
Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας GPb.....	33
Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b.....	35
Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m).....	35
Υπολογισμός των αρχικών ταχυτήτων και των τυπικών αποκλίσεων.....	37
Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων V_{max} και K_m και των τυπικών αποκλίσεων.....	37
Προσδιορισμός της K_i	39
Προσδιορισμός φωσφόρου.....	45
Μέθοδος του ασκορβικού οξέος.....	45

Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων-προγραμμα Grafit.....	47
Αποτελέσματα.....	48
Κινητική μελέτη αναστολέων.....	50
Συμπέρασμα-συζήτηση.....	54
Βιβλιογραφία.....	56

Περίληψη

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 μοριακοί στόχοι για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για κάποιο κέντρο σύνδεσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Προς αυτήν την κατεύθυνση, το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, απομονώσαμε το ένζυμο φωσφορυλάση β του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μυς κουνελιού και μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση στην ενζυμική του δραστηριότητα τριών τροποποιημένων νουκλεοζιτών της γλυκόζης στη 5' θέση με φθόριο, χλώριο ή ιώδιο. Οι κινητικές μελέτες έδειξαν πως οι ενώσεις αποτελούν ισχυρούς μη συναγωνιστικούς αναστολείς του ενζύμου με σταθερές αναστολής K_i 12.8, 1.0, και 1.9 μM αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές υποδεικνύουν πως στην 5' θέση η το χλώριο οδηγεί σε ισχυρότερη σύνδεση στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου από ότι το φθόριο ή το ιώδιο. Κρυσταλλογραφικές μελέτες προς την κατεύθυνση της επιβεβαίωσης του συμπεράσματος αυτού είναι σε εξέλιξη. Εντούτοις, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούν να βοηθήσουν σημαντικά στο σχεδιασμό νέων πιο ισχυρών ενώσεων.

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

glycogen phosphorylase represents an important molecular target for the design of novel hypoglycaemic drugs.

In this study, glycogen phosphorylase b (GPb) from rabbit skeletal muscles has been purified and the inhibitory potency of three C-5 halogen (F, CL, or J) substituted glucopyranosyl nucleosides has been studied with kinetic experiments. It was found that these compounds are potent competitive inhibitors of the enzyme with K_i values of 12.8, 1.0, and 1.9 μM respectively. These values indicate that the presence of chloride at the C-5 position favours the binding to the active site of the enzyme more than fluorine or chloride. However, this has to be confirmed by structural studies which are currently underway. Nevertheless, the present study will assist in designing more potent analogues. .

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο Σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια μεταβολική νόσος που χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης. Εμφανίζεται στην περίπτωση που το πάγκρεας δεν παράγει αρκετή ινσουλίνη (Τύπου I) ή όταν ο οργανισμός δε μπορεί να χρησιμοποιήσει αποτελεσματικά την ινσουλίνη που παράγεται (Τύπου II). Η αύξηση αριθμού των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με στόχο το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα αυτά έχουν στόχο ένζυμα και υποδοχείς που συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και αποσκοπούν σε μία αποτελεσματική αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 [Kurukulasuriya et al, 2003]. Παρά τις προσπάθειες όμως 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. 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>].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, την κύρια μορφή αποθήκευσης υδατανθράκων στα κύτταρα των θηλαστικών. Το ένζυμο καταλύει το πρώτο στάδιο της ενδοκυτταρικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P). Η Glc-1-P χρησιμοποιείται μέσω της γλυκόλυσης για την παραγωγή ενέργειας και στο ήπαρ μετατρέπεται προς γλυκόζη. Το ήπαρ είναι ένα όργανο που έχει ως σκοπό να αποκαθιστά της ενεργειακές ανάγκες των άλλων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP, Liver GP), ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, αποτελεί έναν από της μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η αναστολή του ενζύμου αυτού έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου και τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών. Σύμφωνα με τους Agius et al. (2001), η φωσφορυλάση και η γλυκοκινάση αποτελούν δύο ένζυμα που φαίνεται να έχουν κατά κύριο λόγο τον έλεγχο της ρύθμισης της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τα ηπατικά κύτταρα.

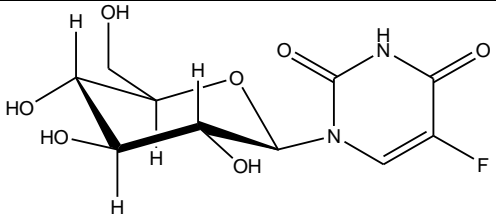
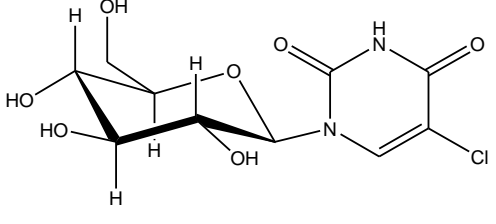
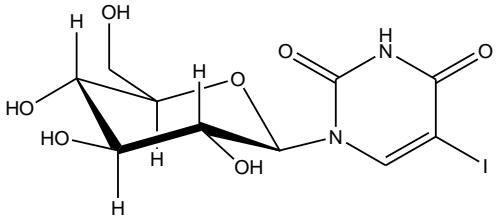
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ένζυμο που μπορεί λοιπόν, να αποτελέσει στόχο φαρμακευτικής παρέμβασης για το διαβήτη τύπου 2 (Somsák L. et al, 2003). Η γλυκόζη, ο φυσιολογικός ρυθμιστικός παράγοντας του μεταβολισμού του γλυκογόνου, αναστέλλει την ενζυμική δράση της GP και δρα συνεργιστικά με την ινσουλίνη, με αποτέλεσμα την ελάττωση της αποικοδόμησης και την παράλληλη αύξηση της σύνθεσης γλυκογόνου (που επιτυγχάνεται με τη δράση της συνθάσης του γλυκογόνου). Συνεπώς,

ενώσεις, με ισχυρότερη ανασταλτική δράση (συγκριτικά με τη δράση της γλυκόζης), είναι δυνατόν να μετατοπίζουν την ισορροπία αποικοδόμησης - σύνθεσης γλυκογόνου προς την κατεύθυνση της σύνθεσης και ως εκ τούτου έχουν κλινικό ενδιαφέρον στην αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

Προς την κατεύθυνση αυτή στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, ακολουθείται η μέθοδος του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμός βιοδραστικών ενώσεων. 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 την πρωτεΐνη-στόχο.

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της πορείας αυτής και συγκεκριμένα αποσκοπεί στη βιοχημική μελέτη ουσιών που έχουν συντεθεί μετά από κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό και έχουν ως στόχο το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Πρόσφατα, δείχθηκε πως νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπως οι 1-(3'-δεοξυ-3'-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο) πυριμιδίνες, παρουσιάζουν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και επιπλέον και μελέτες της σχέσης δομής-δράσης τους παρείχαν νέες κατευθύνσεις προς την ανάπτυξη ισχυρότερων αναστολέων (Tsirkone V. *et al*, 2010). Ακολουθώντας τις κατευθύνσεις αυτές, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη τριών νέων ενώσεων (τροποποιημένοι στη 5' θέση νουκλεοζίτες της γλυκόζης), αναλόγων της γλυκόζης, για τον προσδιορισμό της ικανότητάς της να αναστέλλουν τη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου b από κουνέλι.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι μοριακές δομές των αναστολέων που μελετήθηκαν:

<p>Αναστολέας φθορίου</p>	
<p>Αναστολέας χλωρίου</p>	
<p>Αναστολέας ιωδίου</p>	

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%. 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.

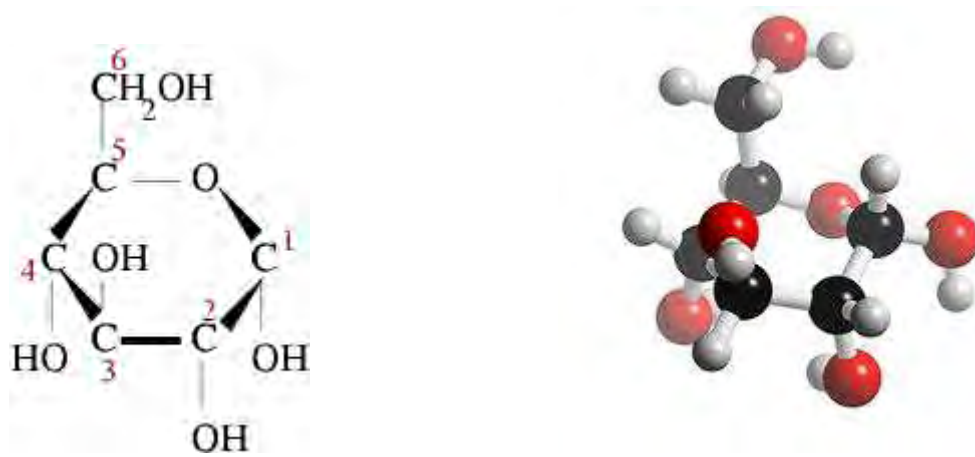
Θεωρητικό Μέρος

1. ΓΛΥΚΟΖΗ

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα τα οποία συνδέονται με δώδεκα άτομα υδρογόνου και έξι άτομα οξυγόνου. Ο γενικός τύπος της γλυκόζης είναι $C_6H_{12}O_6$.

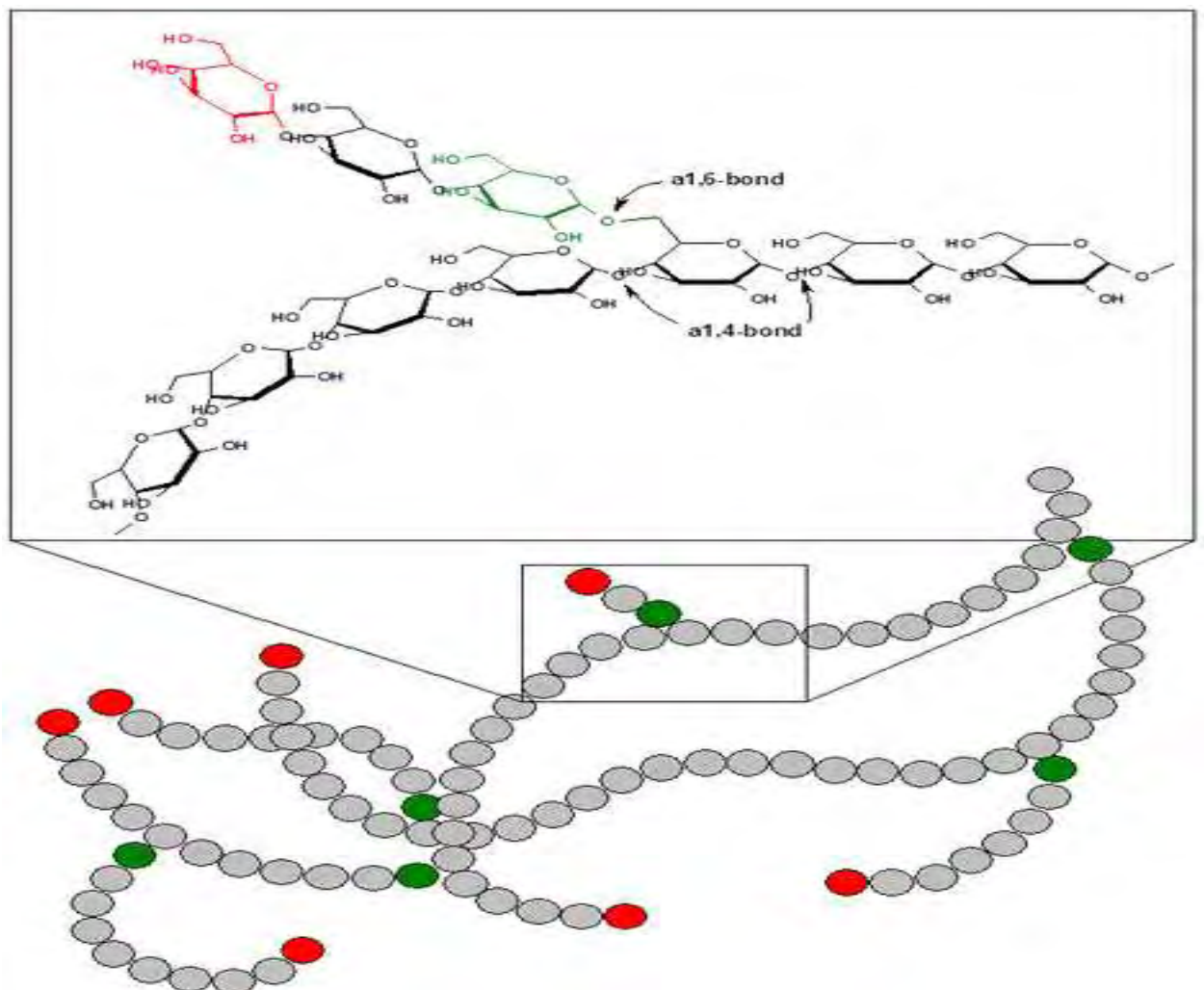
Η γλυκόζη ή δεξτρόζη, είναι ένα πολύ σημαντικό, σάκχαρο. Ανήκει στις εξόζες, με δομή αλδόζης, το οποίο απαντάται σε δύο μορφές: την α και την β. Η γλυκόζη παράγεται σύμφωνα με τον κύκλο του Κάλβιν κατά τις φωτοσυνθέσεις και αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τα κύτταρα τόσο των φυτών όσο και των ζώων. Συνηθέστερα όμως η γλυκόζη μετατρέπεται σε μια αδιάλυτη ουσία, πολυσακχαρίτη, προκειμένου έτσι να αποθηκευθεί και να διατηρηθεί για μεγάλο διάστημα, στα μεν φυτά ονομάζεται άμυλο, στα δε ζώα γλυκογόνο.

Συνεπώς η γλυκόζη αποτελεί τη πρωταρχική μητρική οργανική ένωση όλων των οργανικών ενώσεων αφού είναι προϊόν της φωτοσύνθεσης, όπου και πραγματοποιείται η μοναδική βιολογική διεργασία της μετατροπής του ανόργανου άνθρακα σε οργανικό. Συνέπεια αυτού είναι ότι σήμερα υπολογίζεται πως στον αστρονομικό αριθμό των οργανικών βιολογικών μορίων η γλυκόζη αντιπροσωπεύει το 60-70% της συνολικής μάζας αυτών των μορίων της βιόσφαιρας. Η γλυκόζη υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ παράγεται και στον ίδιο τον οργανισμό από καταβολικές διαδικασίες πιο περίπλοκων υδατανθράκων.



Εικόνα 1: Δομή γλυκόζης σε απλή και τρισδιάστατη δομή

2. ΓΛΥΚΟΓΟΝΟ



Εικόνα 2 : Δομή γλυκογόνου

Το γλυκογόνο είναι ένα μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές το οποίο αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης και αποτελεί την κύρια πηγή αποθήκευσης γλυκόζης στα θηλαστικά. Το γλυκογόνο είναι επίσης αποταμιευτική ουσία των ζώων και των μυκήτων. Στα σπονδυλωτά αποθηκεύεται στο ήπαρ και στους γραμμωτούς μυς. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά 10 μόρια γλυκόζης. Το γλυκογόνο δηλαδή είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μόρια γλυκόζης που σχηματίζουν διακλαδισμένες αλυσίδες. Διασπώμενο, αποδίδει μόρια γλυκόζης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης.

2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η καταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε κυρίως από τους Carl & Gerty Cori τη δεκαετία του 40. Οι δυο τους απομόνωσαν το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διασπά το υπόστρωμα της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς 1-φωσφορική γλυκόζη. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη Pi αναφέρεται και ως φωσφορόλυση. (Εικόνα 3)

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

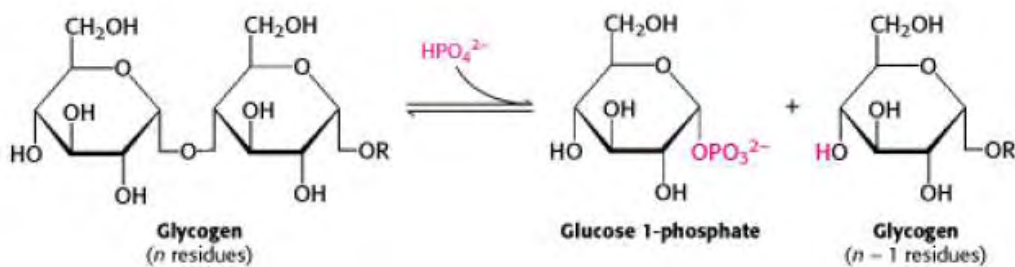
του τελικού μορίου του τετάρτου άνθρακα του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν.

Η αντίδραση έχει ως εξής:



(n κατάλοιπα)

($n-1$ κατάλοιπα)



Εικόνα 3: Αποικοδόμηση του γλυκογόνου [Stryer, 1997]

Η αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8 ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6. Η φωσφορολυτική διάσπαση πλεονεκτεί ενεργειακά γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο, το οποίο θα απαιτούσε φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και έτσι δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να διαφύγει από το κύτταρο, σε αντίθεση με τη γλυκόζη.

3. Ενζυμική αναστολή

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

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

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

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

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

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

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

Στη συναγωνιστική αναστολή, το ένζυμο μπορεί να προσδέσει υπόστρωμα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI) αλλά όχι και τα δύο. Πολλοί συναγωνιστικοί αναστολείς μοιάζουν με το υπόστρωμα και

προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης, με το να ελαττώνει την αναλογία μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδεμένα με ένα υπόστρωμα.

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

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

4. Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

Ο συντονισμός των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες γίνεται με τη 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 διακριτικά 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

ενζυμο-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 την συγκεκριμένη δομή του ιδίου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να μεταβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωση του που επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή (Monod et al., 1963).

Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Δηλαδή, το μόριο να έχει ένα τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δύο διαμορφώσεις την T και την R, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που ρυθμίζεται από την αλλοστερική σταθερά L. Η σύνδεση του υποστρώματος σε οποιοδήποτε μονομερές δεν επηρεάζει κατά κανένα τρόπο τη σύνδεση του στα υπόλοιπα μονομερή (Monod et al., 1963). Οι αλλοστερικές αλληλοεπιδράσεις διακρίνονται σε ομοτροπικές, μεταξύ ταυτόσημων ενώσεων και ετεροτροπικές, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου.

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δύο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Η σύνδεση του υποστρώματος έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση ή την μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και την τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης της ενζυμικής ταχύτητας ως προς την 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.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της, δηλαδή τη μορφή a και b βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας

ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγου ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για τη φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T. Η μετάβαση από τη κατάσταση T στην R συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α-έλικες, οι οποίες μετακινούν ένα βρόχο έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι, η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή καθώς το καταλυτικό κέντρο παρεμποδίζεται. Το αντίθετο συμβαίνει στην κατάσταση R, όπου το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη.

Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων με AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί την στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Το ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος το AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση. Συνεπώς το ενεργειακό φορτίο ελέγχει την μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων του ATP. Αντίθετα, η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργή ανεξαρτήτως των επιπέδων ATP και AMP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μυς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για ενεργειακούς σκοπούς.

Η δραστηριότητα της GP ελέγχεται και από αναστολείς και από αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο (εικόνα σελ. 13). Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής συνδέονται νουκλεοτίδια που μπλοκάρουν το καταλυτικό κέντρο μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την T διαμόρφωση. Τέλος, στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την T διαμόρφωση, το AMP

προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία στην R κατάσταση, ενώ το ATP ανταγωνίζεται το AMP.

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοίωση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως συνόλου. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση a, αλλά όχι και η b παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης a από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP, γιατί το ήπαρ δεν υφίσταται τις αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο.

Κλινική σημασία γλυκόζης

Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας για το σώμα και η μόνη πηγή θρεπτικών συστατικών για τον εγκεφαλικό ιστό. Επίσης η γλυκόζη αποτελεί τον φυσιολογικό ρυθμιστή του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο ήπαρ, εφόσον αδρανοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου και δρα συνεργιστικά με την ινσουλίνη [Stalmans *et al.*, 1974]. Η γλυκόζη σαν αλλοστερικός μεταβολίτης σταθεροποιεί την T διαμόρφωση της φωσφορυλάσης a (λιγότερο δραστική), γεγονός που εκθέτει την φωσφορική ομάδα της σερίνης (Ser) 14 στην υδρολυτική δράση της φωσφατάσης (PP-1G), η οποία μετατρέπει την GPα (φωσφορυλιωμένη GP) σε GPb (μη φωσφορυλιωμένη) [Madsen *et al.*, 1978, Sprang *et al.*, 1982]. Η μετατροπή της GPα σε GPb συνοδεύεται από την απελευθέρωση της PP-1G, η οποία έχει πλέον την δυνατότητα να ενεργοποιήσει την συνθάση του γλυκογόνου (GS) [Bolen *et al.*, 1992]. Επομένως, η ισορροπία μεταξύ της αποικοδόμησης και της σύνθεσης του γλυκογόνου ρυθμίζεται από αντιδράσεις φωσφορύλιωσης-αποφωσφορύλιωσης με κύριο ρυθμιστή την γλυκόζη.

5. Φωσφορυλάση γλυκογόνου

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

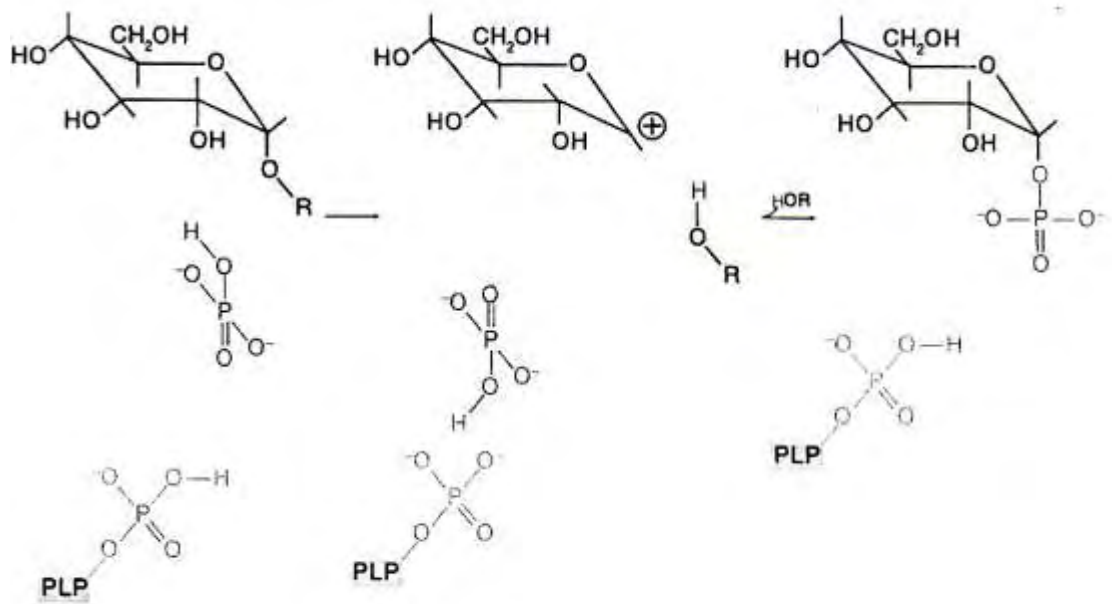
Στον οργανισμό υπάρχουν 3 ισομορφές του ενζύμου: 1) η φωσφορυλάση του εγκεφάλου 2) η φωσφορυλάση του ήπατος και 3) η φωσφορυλάση των μυών. Το cDNA, στο οποίο κωδικοποιείται ολόκληρη η αμινοξική ακολουθία της GP που προέρχεται από τις παραπάνω πηγές, έχει κλωνοποιηθεί και ταυτοποιηθεί σε αρκετά είδη. Μεταξύ της GP που προέρχεται από τον άνθρωπο και της GP που προέρχεται από τα κουνέλια παρατηρείται 97% ομολογία, ωστόσο όσον αφορά τα τρία ισοένζυμα που προέρχονται από τον άνθρωπο η ομολογία πλησιάζει το 80%. Κάθε ισομορφή ωστόσο, έχει διαφορετικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών παρέχει ενέργεια στους μύες, ενώ η αντίστοιχη του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακούς σκοπούς των ίδιων των ιστών, γι αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης.

Δομικά η GP είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δύο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kDa. Το ένζυμο αποτελείται από 842 αμινοξικά κατάλοιπα και από το συνένζυμο 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύς η GP βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις, ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP από ότι σε άλλα ένζυμα που εξαρτώνται από την βιταμίνη B6. Έχει αποδειχτεί ότι η παρουσία της 5-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστικότητα του ενζύμου. Η κάθε υπομονάδα

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

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

Εικόνα 4: Προτεινόμενος μηχανισμός φωσφορυλίωσης του γλυκογόνου από την GP. Η ένδειξη PLP αφορά τη φωσφορική πυριδοξάλη συνδεδεμένη με μία βάση του Schiff στην ε-NH₂ της λυσίνης 680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α-D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο [Stryer, 1997].

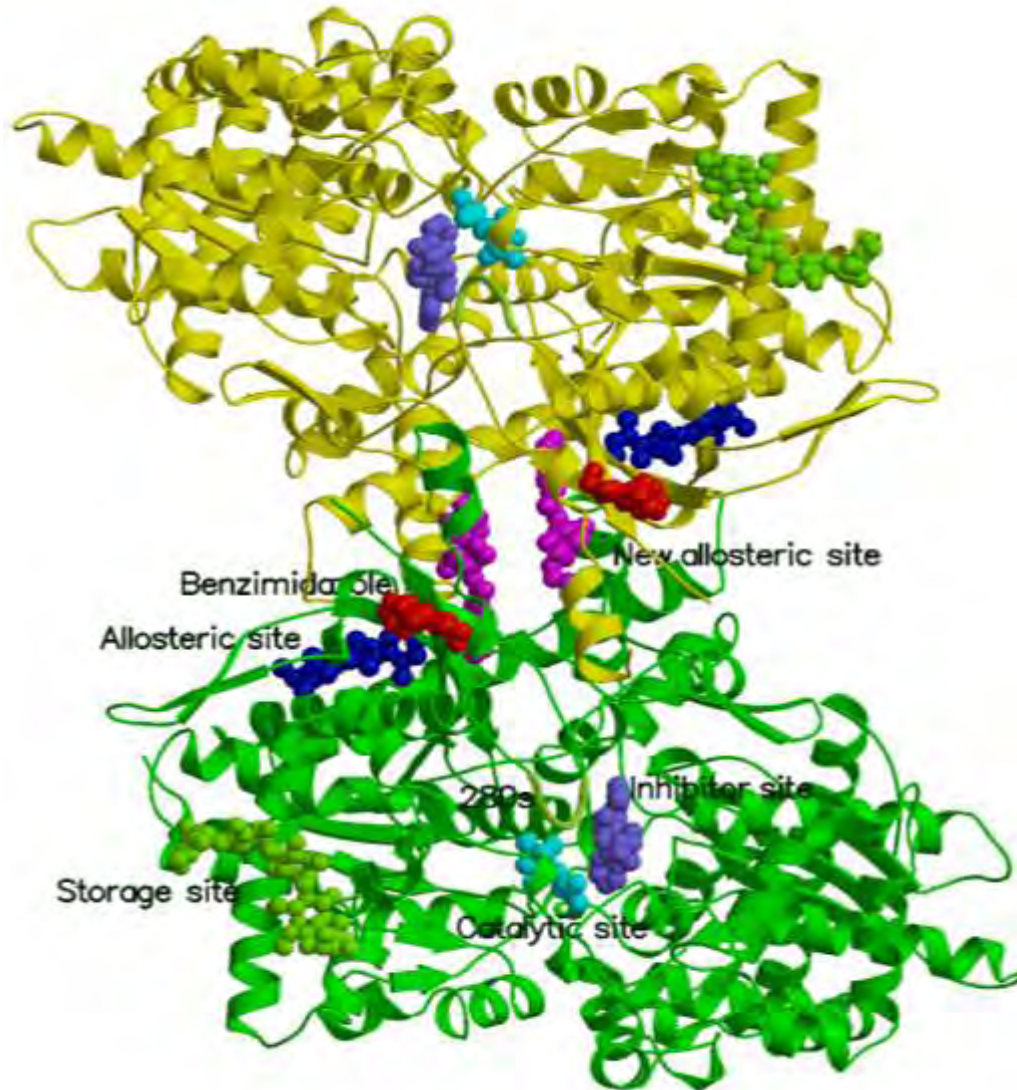


Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση α και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση β. Η φωσφορυλάση α και β διαφέρουν κατά μία φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση.

Φυσιολογικά η δραστηριότητα της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης β στη σερίνη 14, οδηγώντας στο σχηματισμό της φωσφορυλάσης α. Αντίθετα μια ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G,(PP-G1) υδρολύει το φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μετατρέπεται στη μορφή GPb μη (φωσφορυλιωμένη GP).(Rath et al 2000).

6. Κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου μπορεί να χωριστεί σε δυο αυτοτελείς περιοχές, την 1 και την 2. Η περιοχή 1, που ονομάζεται και ρυθμιστική, αποτελείται από τα αμινοξέα 10-484. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο φωσφορύλιωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα καθώς και ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή 2, που ονομάζεται και καταλυτική, αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων [Fletterick & Madsen, 1980].



Εικόνα 5: 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 (Acurea), με πράσινο το αποθηκευτικό κεντρο (κυκλοδεξτρίνη), και με ροζ το νέο αλλοστερικό κέντρο (CP320626).

- **Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14**

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

- **Το αλλοστερικό κέντρο**

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

1. Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
2. Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων ριβόζης
3. Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων πουρίνης

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

- **Το καταλυτικό κέντρο**

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από την σύνδεση των υποστρωμάτων(Glc-1-P, Pi) και αναλόγων τους. Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε μια απόσταση 15 Å από την επιφάνεια. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση επιτυγχάνεται μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται από τον βρόχο αμινοξικής αλληλουχίας 282-285. κατά την μετάπτωση από T σε R, ο βρόχος282-285 εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από τη βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 οδηγεί στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας.

- **Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών**

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

- **Το κέντρο αναστολής**

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

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

- **Το νέο αλλοστερικό κέντρο**

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GP_b. Σε αυτό συνδέεται η ένωση P320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδια καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρία, δημιουργώντας

αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GPb. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GPα [Oikonomakos *et al.*, 2002].

7. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει εκδηλωθεί για την παρασκευή νέων θεραπευτικών φαρμάκων, τα οποία θα μπορούν να μιμούνται τον έλεγχο της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Τα φάρμακα που χορηγούνται μέχρι τώρα για τον διαβήτη έχουν μικρή αποτελεσματικότητα και ανθεκτικότητα και παρενέργειες που οφείλονται στον μηχανισμό με τον οποίο δρουν. Μια μοριακή προσέγγιση στοχεύει στην μείωση της παραγωγής της γλυκόζης από το ήπαρ με αναστολή της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η GP είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για την 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].

Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει λυθεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το

σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιοριστεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τα οποία αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων [Blundell et al., 2002].

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με $K_i \approx 1 \mu\text{M}$, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης [Witters & Avruch, 1978] στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο υπολογισμός υποθέτει πως το σύνολο του φαρμάκου φτάνει στο στόχο του. Αν όμως ληφθεί υπ' όψη η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου τότε απαιτείται αναστολέας με $K_i \approx 0.1 \mu\text{M}$.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από τους σκελετικούς μυς κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο Fisher και Krebs (1962), με ελάχιστες μόνο τροποποιήσεις.

ΥΛΙΚΑ:

- Δύο κουνέλια μετρίου μεγέθους
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6,8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης/HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5 mM DDT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO_3)
- Διάλυμα όξινου οξέος 1N
- Διάλυμα θειικού αμμωνίου κορεσμού 90%
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris /HCl 0.001M, pH 7.5
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0,3M, pH 7.0
- Διάλυμα EDTA .01M pH 7
- Διάλυμα AMP 0.1 M pH 7
- Διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1.0 M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης που έχουν υποστεί επεξεργασία με 1% NaCO_3 και 10 mM EDTA στους 100°C και συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο νερό πριν τη χρήση τους.

Όργανα

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

Διαδικασία:

1. παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος

Ο μυϊκός ιστός λαμβάνεται από τα πίσω κυρίως πόδια καθώς και την σπονδυλική στήλη των κουνελιών. Εφόσον αφαιρεθούν οι σκελετικοί μυς, στη συνέχεια αλέθονται σε μηχανή του κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται τρεις εκχυλίσεις με απιονισμένο κρύο ύδωρ. Ο συνολικός χρόνος επεξεργασίας δεν πρέπει να ξεπερνά τα 30 λεπτά. Οι εκχυλίσεις γίνονται με όγκο ύδατος 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 διηθείτε μέσω γάζας. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

2. Ώξινη καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5,1 με 5,2 με προσθήκη CH_3COOH 1N υπό ανάδευση. Στη συνέχεια το εκχύλισμα αφήνεται για πέντε λεπτά σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000 rpm) για τριάντα λεπτά σε θερμοκρασία 0 - 4° C. Έπειτα το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κεκορεσμένο διάλυμα KHCO_3 και ογκομέτρηση του διαλύματος.

3. καταβύθιση με θειικό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειικό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειικού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0,837 για κάθε λίτρο ενζυμικού διαλύματος. Έπειτα το διάλυμα παραμένει στους 4° C για 24 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται με τη χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 5000 rpm για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4° C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο με απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4° C με ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0,001M pH 7.5 , για 16 ώρες.

4. θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5500rpm για 30 λεπτά στους 0-4° C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M όγκου ίσου με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0,1M pH 7 ίσο με το 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στο 8,8 . Έπειτα από επώαση του μίγματος στους 37° C για μία ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα

CH₃COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7. Μετά το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία από 0-4° C και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετράται.

5. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1 mL AMP 0.1 M pH 7 και διαλύματος (CH₃COO)₂Mg 1.0 M pH 7 ανά 100 mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρωσης. Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της GPb. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 0-4° C και διαλυτοποιούνται στους 30° C με όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης (β-GP, Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 25-30° C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων. Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH₃COO)₂Mg, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0° C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6 ωρών. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP.

6. Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή, διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30° C. Στη συνέχεια προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20° C.

Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

1. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb

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

Διαδικασία

Αρχικά, σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό διάλυμα που περιέχει 25 μg ενζύμου ανά mL, γλυκογόνο 5%(w/v), νερό καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου 5% (v/v). Επίσης σε μια σειρά δοκιμαστικών σωληνίων παρασκευάζονται όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ από 2 mM μέχρι 20 mM με προσθήκη 200 μL από το αντίστοιχο υπόστρωμα $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$, 18 μL AMP 50 mM και 502 μL νερού.

Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση για 15 λεπτά στους 30° C. Μετά την επώαση, για την εκκίνηση της αντίδρασης, 180 μL από το ενζυμικό διάλυμα προστίθενται στο σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες οι οποίες είναι οι εξής: 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 1% w/v γλυκογόνο, υποστρώματα $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ από 2 mM έως 20 mM, η θερμοκρασία είναι 30° C και το pH 6.8. Ανά τακτά και καθορισμένα χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού), λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το διάλυμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωληνίες που περιέχουν 50 μL SDS 1%. Το SDS, είναι απορρυπαντικό και προκαλεί την αποδιάταξη και την αδρανοποίηση του ενζύμου. Έπειτα, γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) στα δείγματα. Εκτός από αυτά τα δείγματα, ο προσδιορισμός του φωσφόρου γίνεται και σε τυφλά

δείγματα, όπως α-D-Glc-1-P, λόγω της υδρόλυσης και στο γλυκογόνο λόγω της παρουσίας των φωσφορικών.

Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b

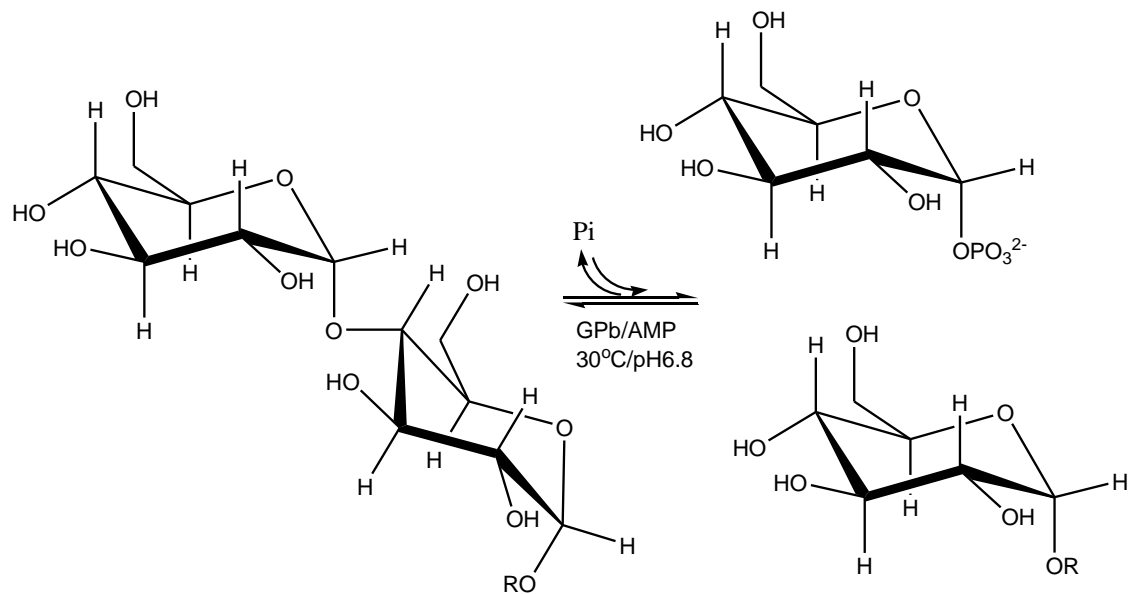
Το ένζυμο φυλάσσεται σε εναιώρημα γλυκερόλης. Από το εναιώρημα αυτό παίρνουμε 10 μL και το αραιώνουμε με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Στη συνέχεια το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ο προσδιορισμός γίνεται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

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

2. Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten(K_m)

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

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



Εικόνα 6: Σχηματική παρουσίαση της αντίδρασης στην οποία βασίζεται η κινητική μελέτη της GPb.

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

Η V_{max} δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια και κατά συνέπεια ούτε η K_m . Έτσι, οι τιμές V_{max} και K_m προσδιορίζονται γραφικά με χρήση του προγράμματος Grafit (Letherbarrow, 1990). Για τον προσδιορισμό της

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

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

Οι τιμές των αρχικών ταχυτήτων (v) και το τυπικό τους σφάλμα (σ^2) 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

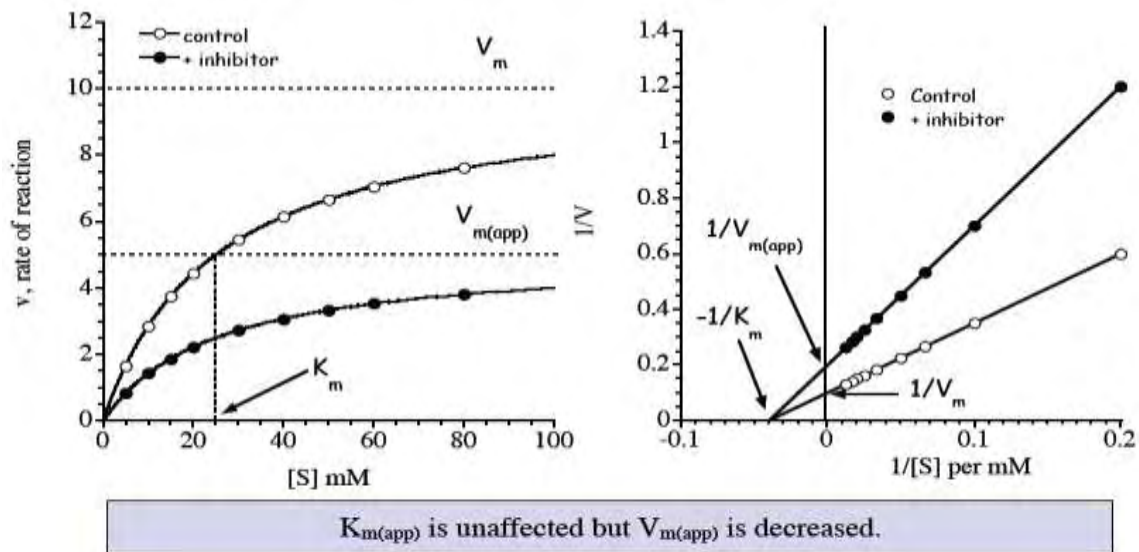
όριο: προκύπτει από το γινόμενο της συγκέντρωσης της Glc-1-P που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος επί τον όγκο του δείγματος επί την μέγιστη υδρόλυση της Glc-1-P στην ισορροπία της αντίδρασης.

4. Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων Vmax και Km 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 Vmax και

K_m , (εικόνα 7) 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, $K_i = [E][I]/[EI]$

Εικόνα 7: 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).

Προσδιορισμός της K_i

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

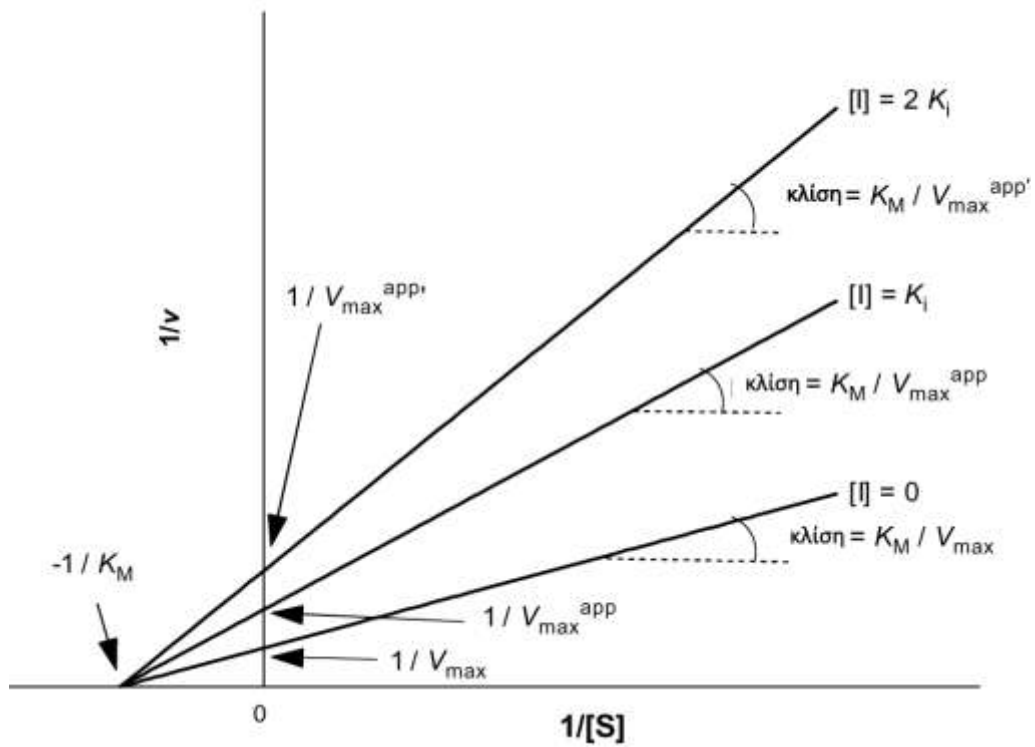
Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας της σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των φωσφορικών ιόντων P_i . Η μείωση αυτή εκφράζεται ως αναστολή, σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

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

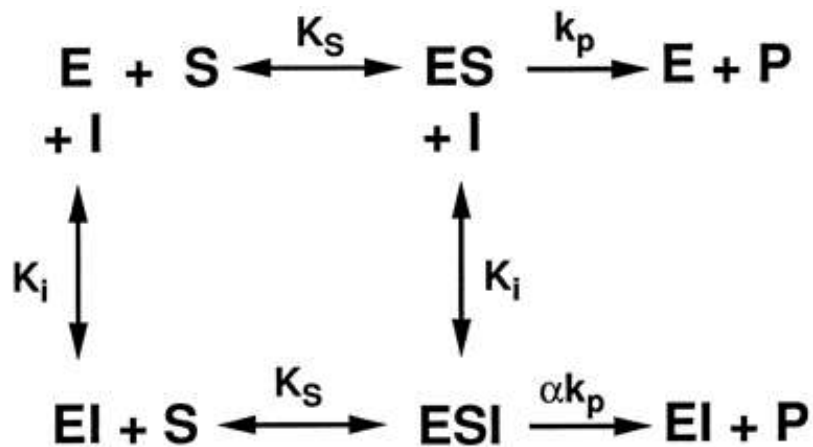
Σε συστήματα καθαρής μη συναγωνιστικής αναστολής, ο υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K_i υπολογίζεται από τη σχέση:

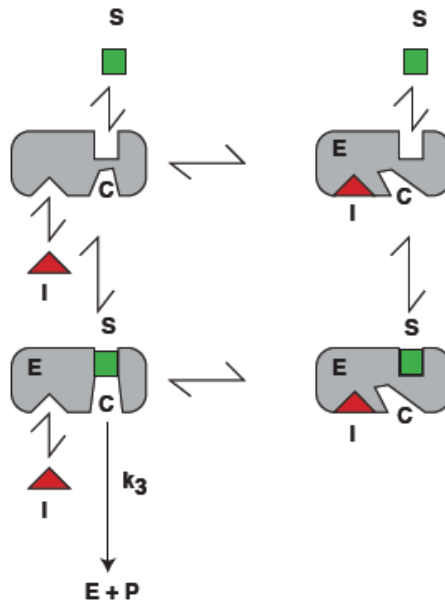
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Η αντίστοιχη γραφική παράσταση είναι η ακόλουθη:



Εικόνα 8: Το διάγραμμα απεικονίζει το αντίστροφο της ειδικής δραστηριότητας σε συνάρτηση με το αντίστροφο της συγκέντρωσης του υποστρώματος.



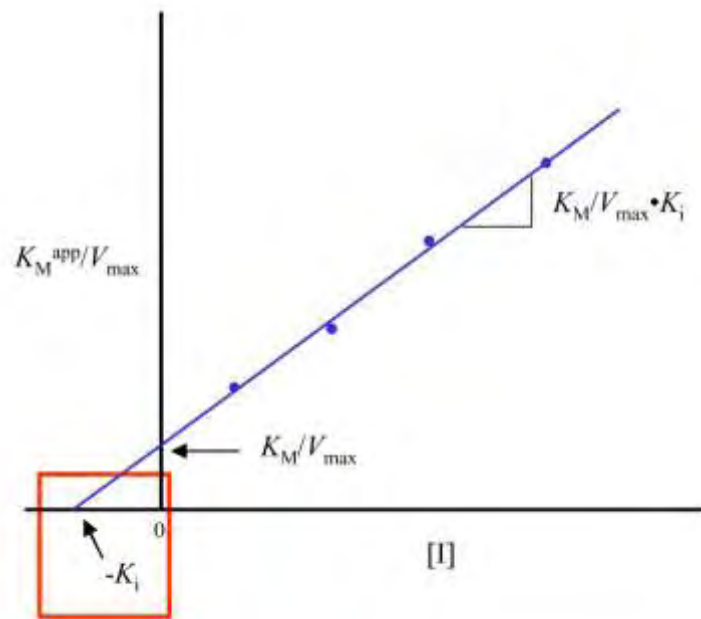


Εικόνα 9: Κινητικό διάγραμμα μη συναγωνιστικής αναστολής. Εξ ορισμού δεν υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ S και I για δέσμευση στα αντίστοιχα κέντρα τους. Συνεπώς, μπορούν να δεσμευτούν ταυτόχρονα σχηματίζοντας ένα τριπλό σύμπλοκο του τύπου ES ..

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

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

Από την παραπάνω σχέση προκύπτει το διάγραμμα της K_{app}/V_{max} σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναστολέα, από το οποίο μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά αναστολής K_i , όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 10: Διάγραμμα της K_{Mapp}/V_{max} σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναστολέα.

ΥΛΙΚΑ

- Απιονισμένο νερό
- Ενζυμικό διάλυμα
- Διάλυμα α-D-Glc-1-P
- Διάλυμα AMP 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου 50:50:1
- Γλυκογόνο 1% (w/v)
- Διάλυμα SDS 1%
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων Pi 1mM pH 6,8
- Διάλυμα αναστολέα

ΟΡΓΑΝΑ

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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

	Σωλήνας 1	Σωλήνας 2	Σωλήνας 3	Σωλήνας 4	Σωλήνας 5
α-D-Glc-1-P	200 μL 2μM	200 μL 4μM	200 μL 6μM	200 μL 10μM	200 μL 20μM
AMP 50mM	18 μL	18 μL	18 μL	18 μL	18 μL
Αναστολέας	X μL	X μL	X μL	X μL	X μL
νερό	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL
Τελικός όγκος	720 μL	720 μL	720 μL	720 μL	720 μL

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

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

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

Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στη βιοχημεία και κυρίως στο προσδιορισμό της δραστηριότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης, η ελευθέρωση των φωσφορικών ιόντων κατά την πορεία της αντίδρασης, επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου.

Μέθοδος του ασκορβικού οξέος

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

- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε δοχείο πολυαιθυλενίου και μακριά από το φως). Μολυβδαινικό αμμώνιο, 15mM Οξικός ψευδάργυρος, 100mM
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα)

Υλικά:

- Διάλυμα μολυβδαινίου με ρύθμιση pH στο 5, με τη χρήση αμιζοντος HCl 10M (Το διάλυμα φυλάσσεται σε δοχείο πολυαιθυλενίου και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v) με ρύθμιση pH στο 5, τη χρήση διαλύματος NaOH 10M (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα)

Στη συνέχεια αναμιγνύουμε τα διαλύματα με αναλογία όγκων 4:1, δηλ 4 όγκους αντιδραστήριου μολυβδαινικού και έναν όγκο ασκορβικού. Το διάλυμα φυλάσσεται από το φως και χρησιμοποιείται 15 λεπτά από την παραγωγή του.

Διαδικασία

Στα δείγματα που έχουν προκύψει από το κινητικό πείραμα, προστίθενται 2.5 mL από το παραπάνω αντιδραστήριο. Μετά από ισχυρή ανάδευση, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται στο υδατόλουτρο για 15 λεπτά στους 30° C. Έπειτα ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm.

Ακολουθεί η περιγραφή των συνθηκών των κινητικών πειραμάτων που έγιναν για τις ενώσεις που περιλαμβάνονται στην παρούσα εργασία:

Αναστολέας φθορίου

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

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

Αναστολέας ιωδίου

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

Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν: 10 μ M, 15 μ M, και 30 μ M.

Αναστολέας χλωρίου

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

Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν: 3 μ M, 5 μ M, και 10 μ M.

Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μετά από τον προσδιορισμό φωσφόρου στα δείγματα του κινητικού πειράματος, επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Grafit [Leatherbarrow, 1990].

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

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol)

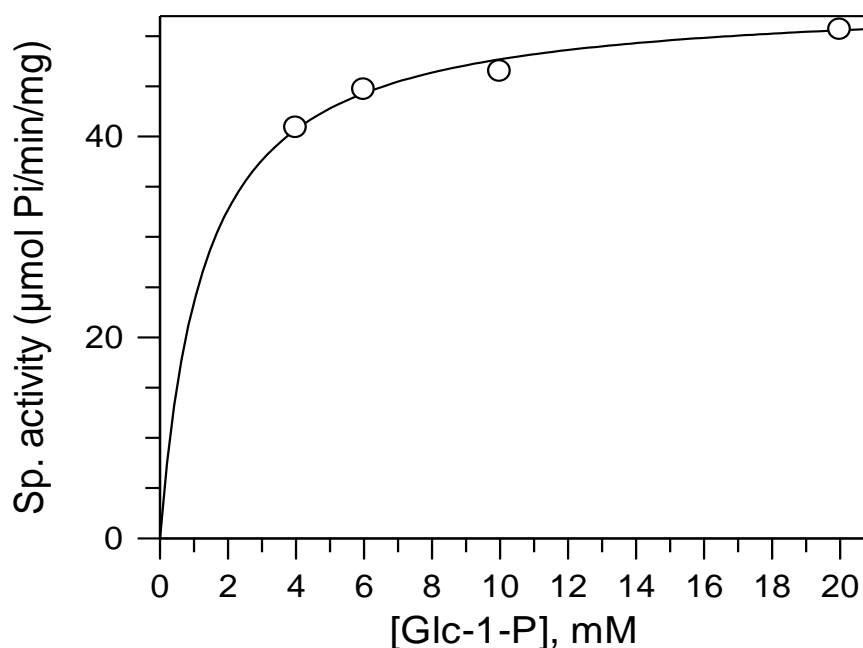
χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten, $v=V_{\max}[S]/K_m + [S]$ (οπού v : ταχύτητα, V_{\max} : μέγιστη ταχύτητα, $[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος, K_m : σταθερά Michaelis-Menten). Γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί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

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

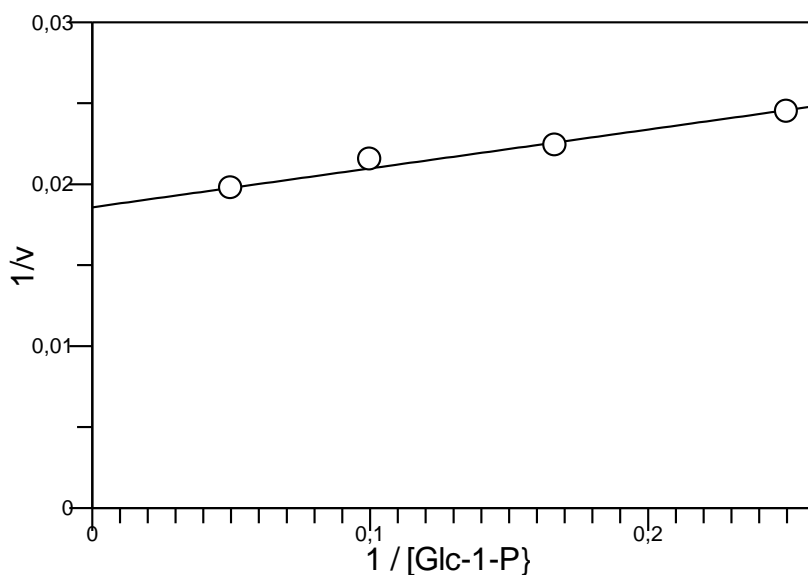
Κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η δράση τριών τροποποιημένων στη 5' θέση νουκλεοζιτών της γλυκόζης. Ο ενώσεις αυτές είχαν στην 5' θέση χλώριο, ιώδιο ή φθόριο. Για κάθε ένα από τους τρεις παραπάνω αναστολείς προσδιορίστηκε η σταθερά K_i , ακολουθώντας τη μεθοδολογία προσδιορισμού της K_i . Όπως αναφέρθηκε και πιο πριν, η K_i είναι η σταθερά αναστολής, ή σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα, EI , και ισούται προς $[E][I]/[EI]$. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή της σταθεράς K_i , τόσο πιο ισχυρά συνδέεται ο αναστολέας με το ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης και προκαλεί μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης φωσφορικών ιόντων.

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}) [Γεωργάτσος, 2001]. Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m .

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=1.29 \pm 0.12 \text{ mM}$ και $V_{max}=53.8 \pm 0.5 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, sp. activity, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (Glc-1-P).



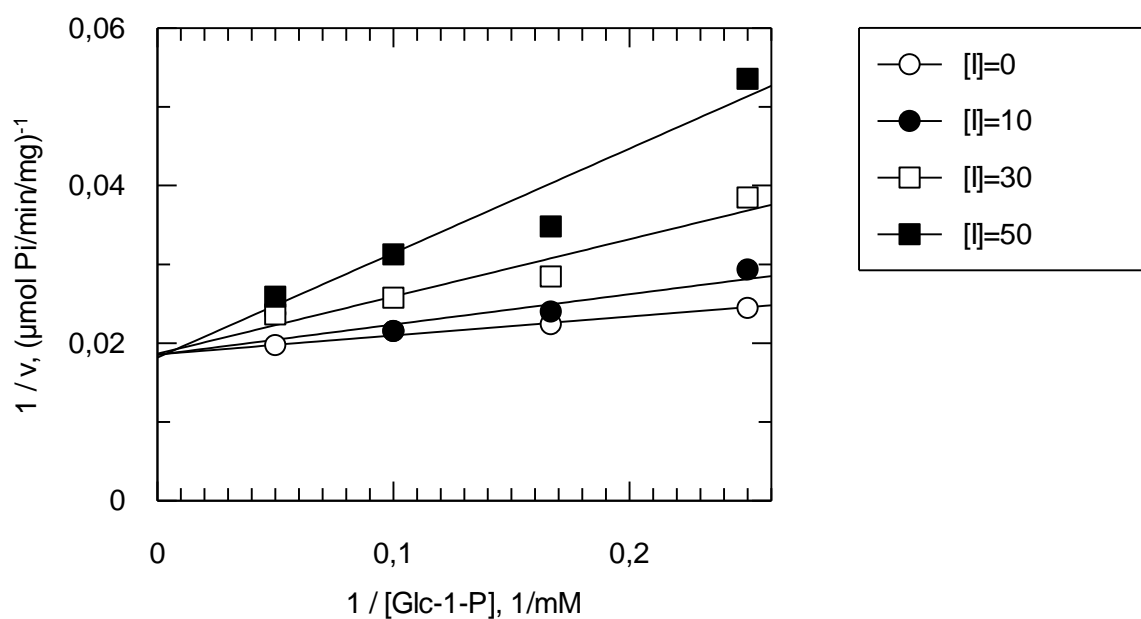
Εικόνα 11: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης (4.0, 6.0, 10.0, 20.0 mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση AMP (1.0mM) και γλυκογόνου (0.2%w/v). Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.



Εικόνα 12: Αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk της σχέσης του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης.

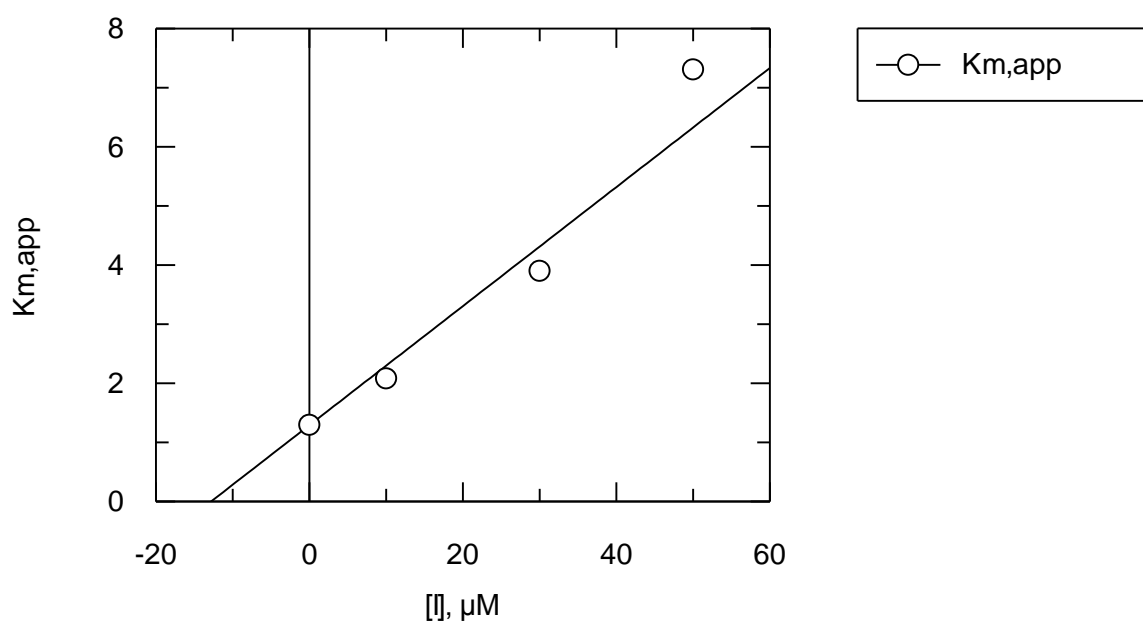
Κινητική μελέτη αναστολέων

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



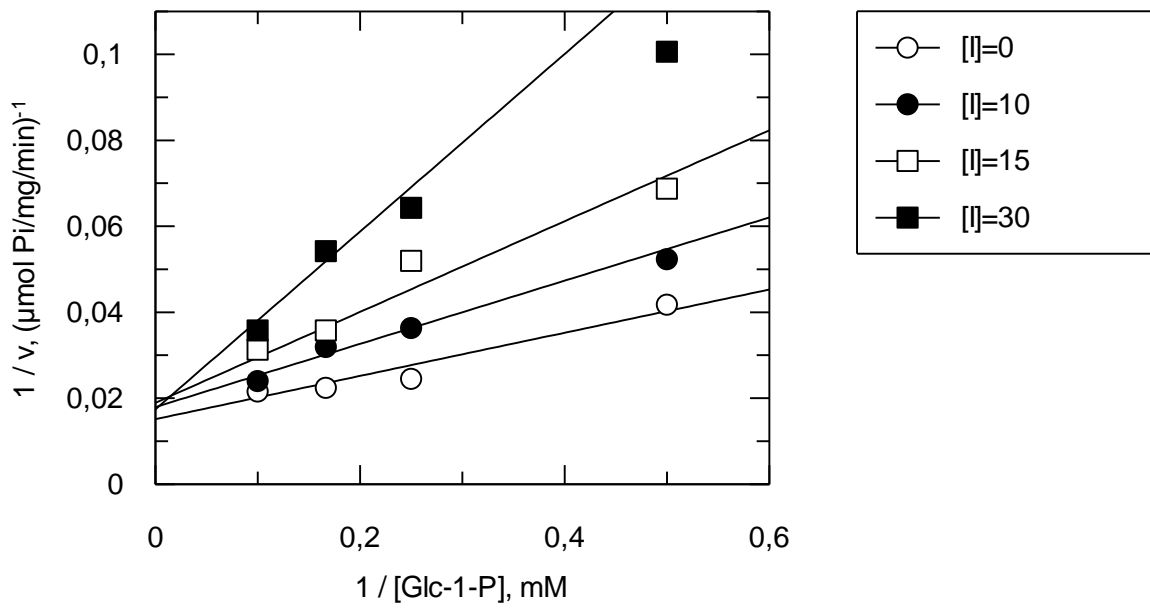
Εικόνα 13: Διάγραμμα του αντίστροφο της ειδικής δραστηριότητας (Sp.Act.) σε συνάρτηση με το αντίστροφο της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε διαφορετικές συγκέντρωσης αναστολέα

Η σταθερά αναστολής, K_i , για την ένωση αυτή βρέθηκε από παρακάτω διάγραμμα $12.79 \pm 1.65 \mu\text{M}$



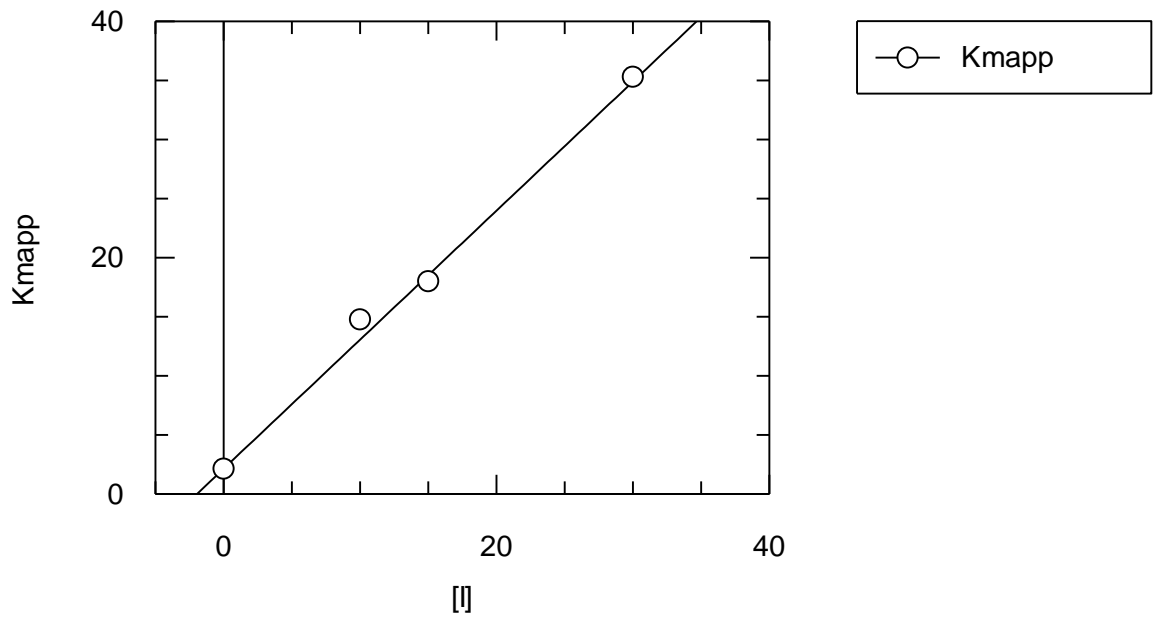
Εικόνα 14: Διάγραμμα της $K_{m,app}$ ως προς τη συγκέντρωση του αναστολέα.

Η ένωση με το ίδιο όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της εικόνας 15, είναι επίσης συναγωνιστικός αναστολέας ως προς την Glc-1-P της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.



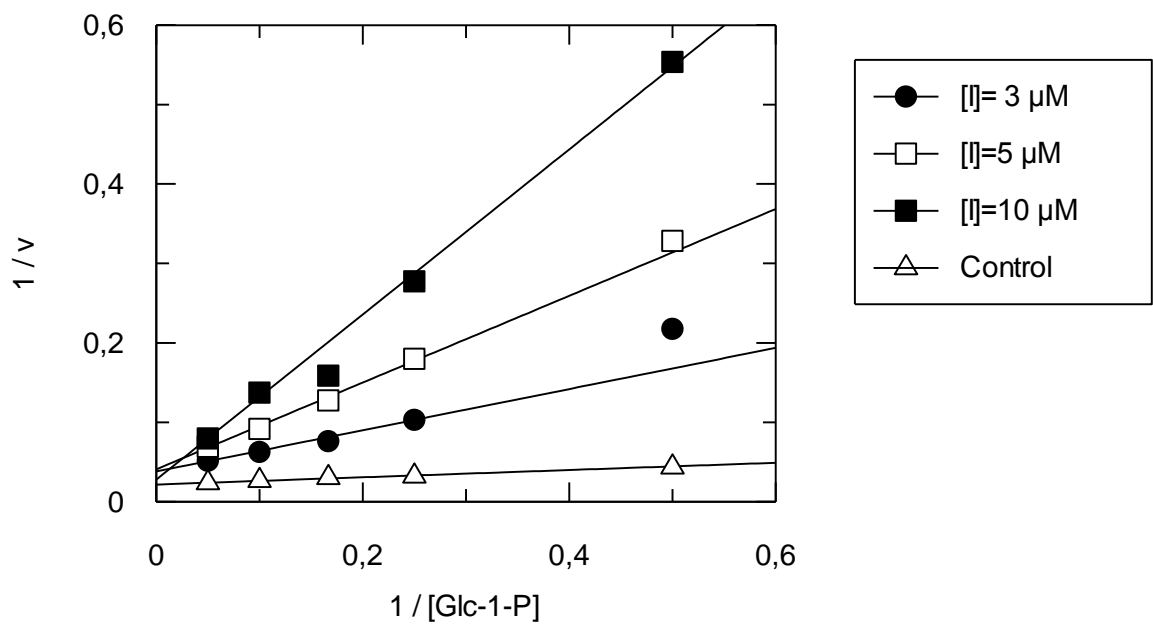
Εικόνα 15: Διάγραμμα του αντίστροφο της ειδικής δραστηριότητας (Sp.Act.) σε συνάρτηση με το αντίστροφο της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε διαφορετικές συγκέντρωσης αναστολέα.

Η σταθερά αναστολής, K_i , για την ένωση αυτή βρέθηκε από παρακάτω διάγραμμα $1.94 \pm 0.09 \mu\text{M}$.



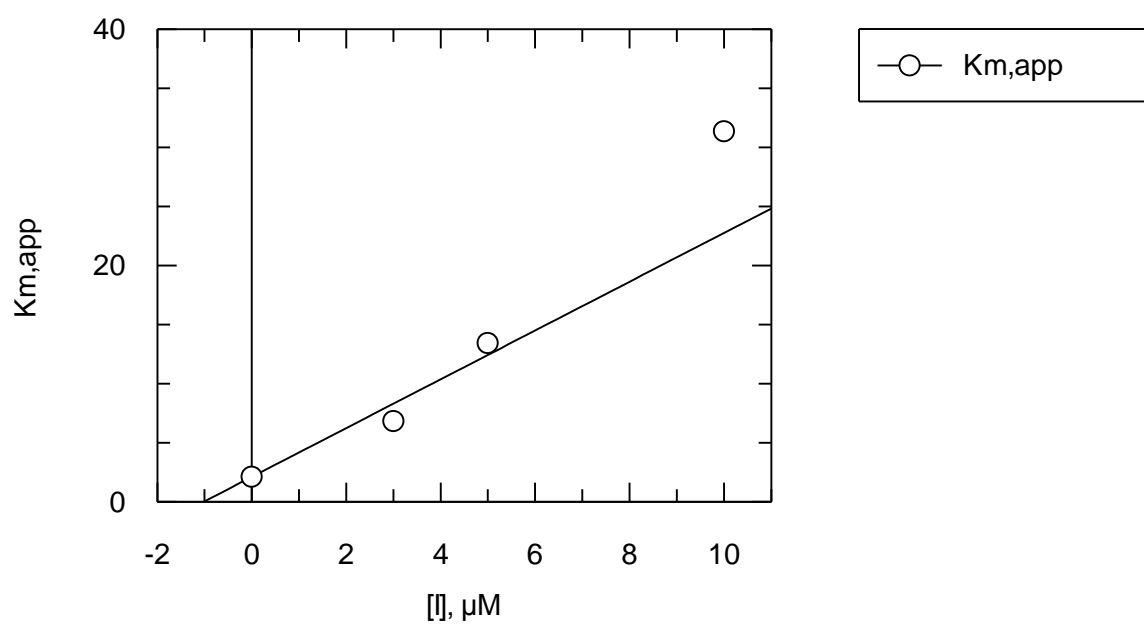
Εικόνα 16 : Διάγραμμα της K_{mapp} ως προς τη συγκέντρωση του αναστολέα.

Η ένωση με το φθόριο όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της εικόνας 17, είναι επίσης συναγωνιστικός αναστολέας ως προς την Glc-1-P της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.



Εικόνα 17: Διάγραμμα του αντίστροφο της ειδικής δραστικότητας (Sp.Act.) σε συνάρτηση με το αντίστροφο της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα

Η σταθερά αναστολής, K_i , για την ένωση αυτή βρέθηκε από παρακάτω διάγραμμα $1.02 \pm 0.15 \mu\text{M}$.



Εικόνα 18: Διάγραμμα της $K_{m,app}$ ως προς τη συγκέντρωση του αναστολέα.

Συμπεράσματα - Συζήτηση

Σύμφωνα με την κινητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την δράση των τριών αναστολέων και σε συνάρτηση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτήν, προκύπτει ότι ο καλύτερος αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, είναι ο τροποποιημένος νουκλεοζίτης που περιέχει το χλώριο. Αυτή η διαπίστωση προκύπτει από την τιμή της K_i η οποία είναι και η μικρότερη από τις άλλες τιμές της K_i που προσδιορίστηκαν. Πιο αναλυτικά ισχύει πως: $K_{i\text{χλωρίου}} < K_{i\text{φθορίου}} < K_{i\text{ιωδίου}}$.

Οι ενώσεις με χλώριο ή ιώδιο είναι πιο ισχυροί αναστολείς από αυτήν χωρίς υποκατάσταση στην 5' θέση της πυριμιδίνης ($K_i = 12.4 \mu\text{M}$), υποδεικνύοντας πως η υποκατάσταση με αυτά τα αλογόνα οδηγεί σε βελτιστοποίηση των αναστολέων ενώ αυτή με χλώριο είναι παρόμοιας ισχύος με την μητρική ένωση. Επιπροσθέτως, οι διαφορές στις τιμές της σταθεράς αναστολής αποκαλύπτουν πως τα χημικά χαρακτηριστικά του κάθε αλογόνου έχουν κάποιο ρόλο στην σύνδεση του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Εντούτοις, θα χρειαστούν κρυσταλλογραφικές μελέτες με τους αναστολείς αυτούς για περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου αυτού. Η παρούσα μελέτη μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στο σχεδιασμό νέων ενώσεων, χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο ένωση την ένωση του χλωρίου, οι οποίες θα συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο. Μελέτες μοντελισμού προς αυτήν την κατεύθυνση είναι σε εξέλιξη.

Βιβλιογραφία

- Stryer L, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, έκδοση 2, 1997:347-354
- Fletterick RJ, Madsen NB., The structures and related functions of phosphorylase a., *Annu Rev Biochem.*, 1980: 49:31-61.
- -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
- Leatherbarrow, R. J., 1990, Using linear and non-linear regression to fit biochemical data, *TIBS*, 15, 455-458.
- Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., 1963, Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, *J. Mol. Biol.*, 6, 306-329
- 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-Dglucopyranosylamine:a potent T-state inhibitor of glycogen phosphorylase. A comparison with alpha-D-glucose, *Protein Sci.*,4, 2469-2477.
- 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., Chrysina, 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
- Segel, L.H., 1975, *Enzyme kinetics*, Wiley interscience, New York.

- 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
- Somsák L, Nagya V, Hadady Z, Docsa T, Gergely P., 2003, Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments. No 9(15):1177-89.
- Tsirkone VG, Tsoukala E, Lamprakis C, Manta S, Hayes JM, Skamnaki VT, Drakou C, Zographos SE, Komiotis D, Leonidas DD., Institute of Organic & Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic Research Foundation, 2010, 1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. No 18(10):3413-25
- Stalmans W, Laloux M, Hers HG., *European J Biochem.*, The interaction of liver phosphorylase a with glucose and AMP., No 49(2):415-27.