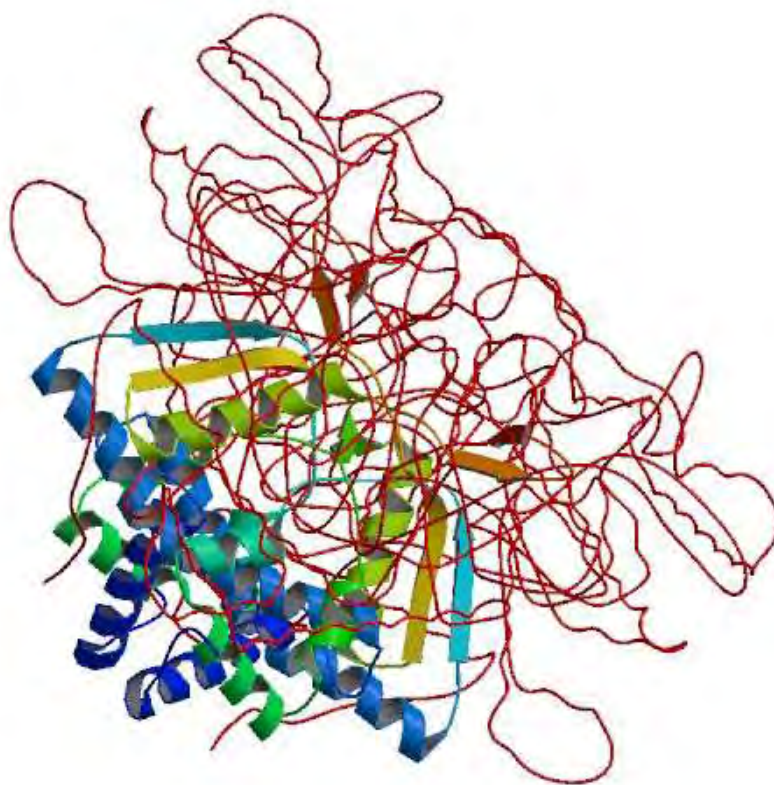




Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ  
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΣΤΟΧΟ  
ΤΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**



**ΕΛΕΝΗ ΜΑΥΡΙΔΟΥ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2012**

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ  
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΟ  
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

Υπεύθυνος καθηγητής:

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας,  
τμήματος Βιοχημείας και βιοτεχνολογίας, Π.Θ

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας,  
τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

**Κοριώτης Δημήτριος**, Αναπληρωτής καθηγητής Οργανικής  
Χημείας, τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

**Κοντού Μαρία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας,  
τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

## 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

Περίληψη _____	6
Abstract _____	7
1. Εισαγωγή _____	8
1.1. Σακχαρώδης διαβήτης: μια σύγχρονη επιδημία _____	8
1.2. Ο επιπολασμός του σακχαρώδη διαβήτη _____	9
1.3. Τι είναι ο σακχαρώδης διαβήτης _____	11
1.3.1. Ινσουλίνη και γλυκόζη _____	12
1.3.2. Γλυκαγόνη και γλυκόζη _____	13
1.3.3. Ισορροπία ινσουλίνης-γλυκαγόνης _____	14
1.4. Κύριοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη _____	15
1.5. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος διαβητικών φαρμάκων _____	20
2. Θεωρητικό μέρος _____	21
2.1. Γλυκόζη _____	21
2.2. Γλυκογόνο _____	22
2.2.1. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου _____	24
2.2.2. Μεταβολισμός του γλυκογόνου _____	26
2.2.3. Ο ρόλος της γλυκόζης _____	27
2.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου _____	27
2.3.1. Γενικά _____	27
2.3.2. Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις _____	30
2.3.3. Η δομή της GP _____	35
2.3.4. Κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου _____	37
2.3.5. Ενζυμική αναστολή _____	39
3. Υλικά και μέθοδοι _____	43
3.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κουνελιού _____	43
3.2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου _____	47
3.2.1. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας Grb _____	47
3.2.2. Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b _____	48
3.4. Υπολογισμός ταχυτήτων $v$ και τυπικών αποκλίσεων ( $\sigma_2$ ) _____	51
3.5. Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων $V_{max}$ και $K_m$ και των τυπικών αποκλίσεων ( $\sigma_2$ ) _____	51
3.6. Προσδιορισμός της $K_i$ _____	53

3.7. Συσχέτιση IC50-Ki	53
3.8. Παρασκευή τυφλών	57
3.9. Επεξεργασία δεδομένων κινητικών παραμέτρων- πρόγραμμα Grafit	62
4. Αποτελέσματα-συζήτηση	63
4.1. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων	63
4.2. Κινητική μελέτη αναστολέα	66
Βιβλιογραφία	68

## 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 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 ενός νουκλεοτιδικού αναλόγου γλυκοκυρανόζης. Οι μελέτες έδειξαν πως η ένωση αυτή παρουσίασε είναι αναστολέας του ενζύμου μέτριας ισχύος με σταθερά αναστολής  $IC_{50} = 2.75 \pm 0.14$  mM. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης που αποτελούν μέρος ενός ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου με στόχο το σχεδιασμό νέων αντιδιαβητικών σκευασμάτων παρέχουν σημαντικές πληροφορίες 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 report, we purified glycogen phosphorylase b (GPb) from rabbit skeletal muscles and studied by kinetic experiments, the effect of a nucleotide glucopyranose analogue. The kinetic studies showed that this compound is a moderate inhibitor of the enzyme with an  $IC_{50}$  value of  $2.75 \pm 0.14$  mM. The results of this study, which are part of a research program with the aim to design new hypoglycaemic agents, provide new information which can assist in the design of more potent compounds.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

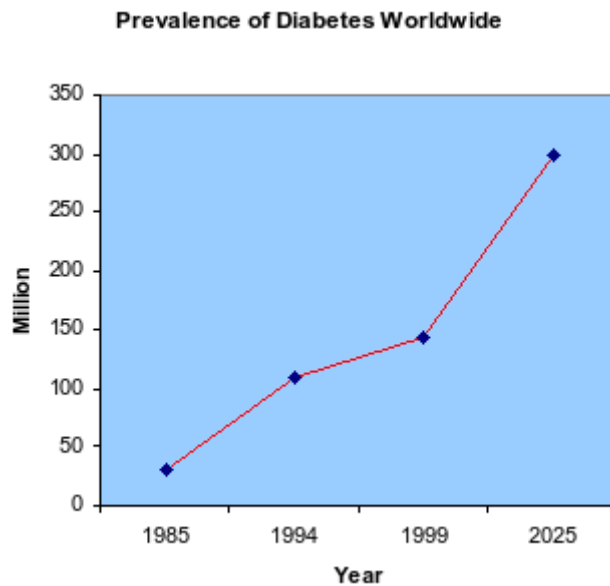
### 1.1. Σακχαρώδης διαβήτης: Μια σύγχρονη επιδημία

Ο Σακχαρώδης διαβήτης ήταν γνωστός από την αρχαιότητα. Ο πρώτος που ονόμασε τη νόσο «διαβήτη» ήταν ο μεγάλος γιατρός της αρχαιότητας, Αρεταίος ο Καππαδόκης. Ο Αρεταίος δίνει στη νόσο το όνομα «διαβήτης» από το ρήμα «διαβαίνω». Έτσι με τον όρο αυτό αναφέρεται σε ένα από τα κύρια συμπτώματα της νόσου, την πολουρία, καθώς ο όρος διαβήτης σημαίνει πως το νερό που πίνει ακατάπαυστα ο άρρωστος για να κατασιγάσει το έντονο αίσθημα της δίψας του, «διαβαίνει» σαν μέσα από σιφόνιο αναλλοίωτο. Το 1675 ο Thomas Willis πρόσθεσε την λέξη 'Mellitus', όταν διαπίστωσε πως τα ούρα και το αίμα ενός διαβητικού έχουν γλυκιά γεύση.

Παρά όμως τις σύγχρονες προσπάθειες τις ερευνητικής κοινότητας για την αντιμετώπιση του, ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα σύγχρονα ιατρο-κοινωνικο-οικονομικά προβλήματα. Χαρακτηρίζεται ως «μάστιγα» που ο περιορισμός της απαιτεί την εγρήγορση των κρατικών και κοινωνικών φορέων υγείας, ευαισθητοποίηση του κοινού και των ιατρικών υπηρεσιών και προσπάθεια κατάρτισης προγραμμάτων ενημέρωσης και πρόληψης στις ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού.

Για να συνειδητοποιηθεί το μέγεθος και η σοβαρότητα του προβλήματος αρκεί να αναφερθούν κάποιοι αποκαλυπτικοί αριθμοί. Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας εκτιμά ότι ο συνολικός αριθμός των διαβητικών σε παγκόσμια κλίμακα από 135 εκατ. που ήταν ο 1995 θα ανέλθει στον αστρονομικό αριθμό 333 εκατ. το έτος 2025! (εικόνα 1)





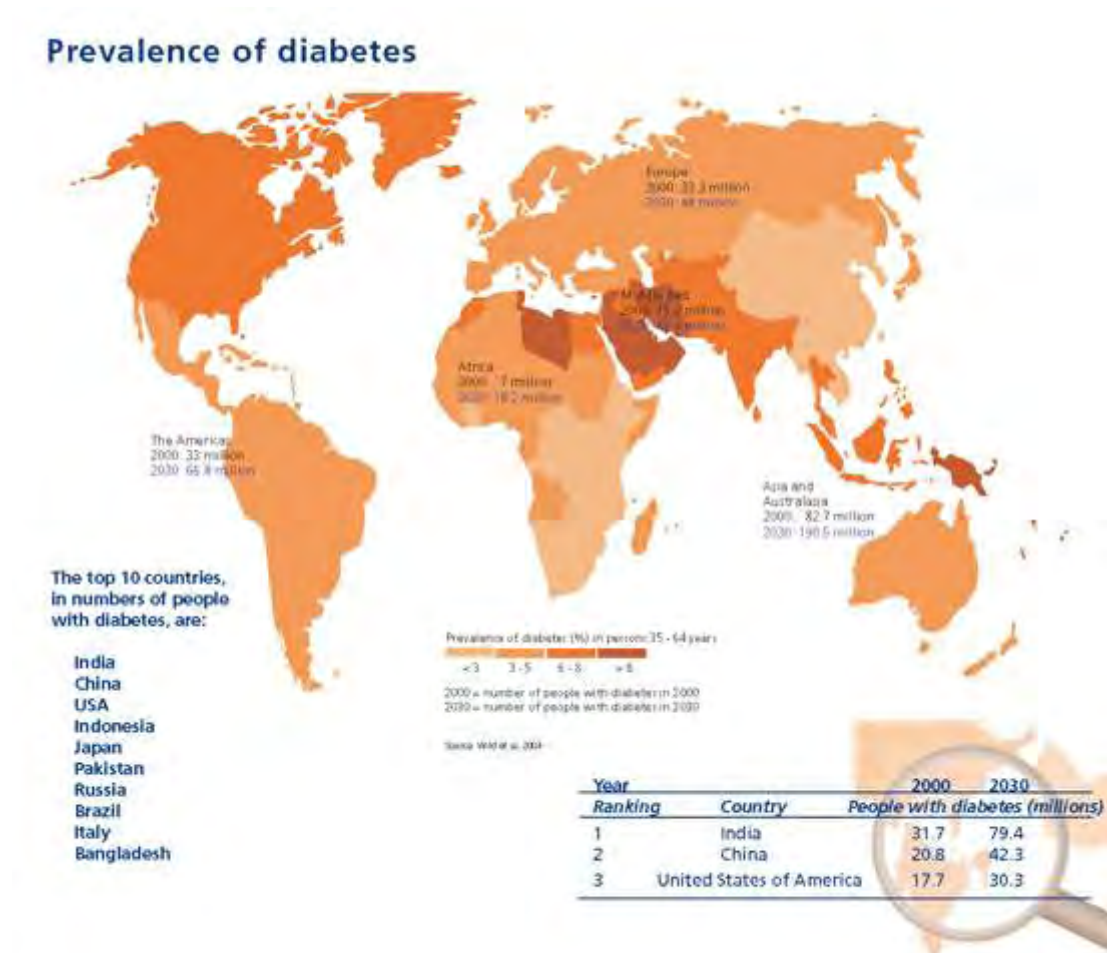
*Εικόνα 1:* η αύξηση του σακχαρώδη διαβήτη από το 1985 ως το 2025

Η μέγιστη αύξηση θα γίνει στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου η αύξηση θα είναι 170% και από 84 εκατ. θα ανέλθουν στα 224 εκατ., χωρίς όμως και οι ανεπτυγμένες χώρες να αποτελούν εξαίρεση σ' αυτήν την σύγχρονη επιδημία. Στη χώρα μας περίπου το 6-7% του πληθυσμού που πάσχει από Σ.Δ. το γνωρίζει ενώ το 4-5% έχει το πρόβλημα και το αγνοεί. Το 20% περίπου των ατόμων άνω των 60 ετών, κυρίως παχύσαρκοι, πάσχουν από Σ.Δ. τύπου 2 και μόνο ένα ποσοστό 15-20% από αυτούς φροντίζουν να επιτύχουν το στόχο του γλυκαιμικού ελέγχου.

## **1.2. Ο επιπολασμός του Σακχαρώδη διαβήτη**

Σύμφωνα με εκτιμήσεις βασισμένες σε δεδομένα του WHO (World health organization) 171 εκατ. άνθρωποι έπασχαν από διαβήτη το 2000, ενώ το 1994 ο αντίστοιχος πληθυσμός ήταν 100 εκατ. Ο αριθμός των διαβητικών αναμένεται να ανέβει στα 366 εκατ. μέχρι το 2030. Ο διαβητικός πληθυσμός στις αστικές περιοχές των αναπτυσσόμενων χωρών αναμένεται να διπλασιαστεί μέχρι το 2030. Οι δημογραφικές αλλαγές λαμβάνουν υπόψη τους μόνο τις δημογραφικές αλλαγές που αναμένονται με την προϋπόθεση ότι οι

ηλικίες στις οποίες ο διαβήτης έχει μεγαλύτερη συχνότητα παραμένουν σταθερές. Η μεγαλύτερη αύξηση αφορά την Ινδία, με δεύτερη τη Κίνα και τρίτες τις Η.Π.Α.. Στις αναπτυσσόμενες χώρες το μεγαλύτερο τμήμα του διαβητικού πληθυσμού ανήκει στις ηλικίες 45-64 ενώ στις ανεπτυγμένες χώρες η αντίστοιχη ηλικία είναι άνω των 64. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2: Ο σακχαρώδης διαβήτης παγκοσμίως.

Σήμερα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε) υπολογίζεται ότι 25.000.000 άνθρωποι πάσχουν από διαβήτη, με τον μέσο επιπολασμό, για την ευρωπαϊκή ένωση να είναι 7,5% για άτομα άνω των 20 ετών. Επιπλέον εκτιμάται ότι το 50% του διαβητικού πληθυσμού δεν έχουν διαγνωστεί. Η τάση και εδώ φαίνεται να είναι αυξητική, αφού στην Γερμανία ο επιπολασμός του διαβήτη που βρίσκεται υπό θεραπεία είχε 43% άνοδο από το 1988 στο 2001.

Σύμφωνα με τον WHO, στην Ε.Ε αναμένεται αύξηση 21% μέσα στα επόμενα 20 χρόνια. Η αύξηση θα οφείλεται κυρίως στην αύξηση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Αυτή η ανοδική τάση φαίνεται να είναι ίδια και για την Ελλάδα, αφού μελέτη σε αστικό πληθυσμό έδειξε αύξηση από 8,7% το 2002 σε 10,3% το 2006.

### **1.3. Τι είναι ο Σακχαρώδης διαβήτης**

Ο Σακχαρώδης διαβήτης είναι η πιο συχνή χρόνια μεταβολική νόσος κατά την οποία το σώμα δεν παράγει ή δεν χρησιμοποιεί σωστά την ινσουλίνη. Η ινσουλίνη παράγεται από τα β-κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος και είναι η ορμόνη που είναι υπεύθυνη για τον μετασχηματισμό της των σακχάρων , του αμύλου και άλλων τροφών σε ενέργεια, απαραίτητη για καθημερινές ανάγκες.

Ο Σ.Δ. θεωρείται πρόβλημα πολυπαραγοντικής αιτιολογίας και οφείλεται κυρίως σε γενετικούς αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η παχυσαρκία και η έλλειψη άσκησης. Αυτή η χρόνια πάθηση η οποία μπορεί να παραμείνει «σιωπηλή» για μεγάλα χρονικά διαστήματα χαρακτηρίζεται από αύξηση συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης είτε λόγω ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω της ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη.

Ο Σακχαρώδης διαβήτης έχει χρόνια πορεία και μπορεί να προκαλέσει μια σειρά σοβαρών προβλημάτων υγείας, τα οποία είναι τα ακόλουθα:

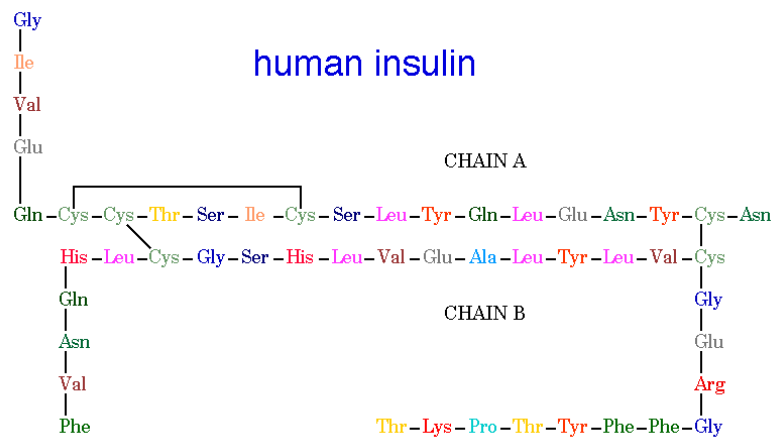
1. Καρδιακές ασθένειες
2. Νεφρικές ασθένειες
3. Έλκη που δεν επουλώνονται
4. Προβλήματα στα μάτια, θαμπή όραση
5. Στυτικές δυσλειτουργίες στους άντρες

6. Μολύνσεις
7. Αγγειακά προβλήματα, κακή κυκλοφορία του αίματος και ιδιαίτερα στα πόδια
8. Υψηλή πίεση
9. Εγκεφαλικά επεισόδια

Η διάγνωση του σακχαρώδη διαβήτη είναι εύκολη όταν υπάρχουν τα κλασικά συμπτώματα και αρκεί η επιβεβαίωση με τη μέτρηση του σακχάρου του αίματος. Τα διαγνωστικά κριτήρια που έχουν θεσπιστεί για την διάγνωση του είναι τα ακόλουθα:

- Παρουσία κλασικών συμπτωμάτων του διαβήτη και τιμή γλυκόζης >200mg/dl σε τυχαία μέτρηση
- Τιμή σακχάρου νηστείας (που λαμβάνεται μετά από 8 ώρες τουλάχιστον αποχής από τροφή) >126mg/dl
- Τιμή σακχάρου 2 ώρες μετά από φόρτιση με 75g γλυκόζης από του στόματος > 200mg/dl

### 1.3.1. Ινσουλίνη και γλυκόζη



Εικόνα 3: η δομή της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη (εικόνα 3) παράγεται και εκκρίνεται από τα β κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος, που είναι μικρά ενδοκρινικά κύτταρα στο πάγκρεας. Η ινσουλίνη είναι μια πρωτεϊνική ορμόνη που περιέχει 51 αμινοξέα. Είναι απαραίτητη

σχεδόν για όλα τα κύτταρα του σώματος, αλλά κύριοι στόχοι της είναι τα κύτταρα του ήπατος, τα λιπώδη κύτταρα και τα μυϊκά κύτταρα. Στα συγκεκριμένα κύτταρα η ινσουλίνη κάνει τα ακόλουθα:

- Διεγείρει τα κύτταρα του ήπατος και των μυών να αποθηκεύσουν γλυκόζη σε μορφή γλυκογόνου
- Διεγείρει τα λιπώδη κύτταρα έτσι ώστε να δημιουργήσουν λίπη από λιπαρά οξέα και γλυκερόλη
- Διεγείρει το ήπαρ και το μυ να δημιουργήσουν πρωτεΐνες από αμινοξέα
- Αποτρέπει τα κύτταρα του ήπατος και των νεφρών να δημιουργήσουν γλυκόζη από ενδιάμεσες ενώσεις μεταβολικών μονοπατιών (γλυκονεογένεση)

Η ινσουλίνη αποθηκεύει συστατικά αμέσως μετά από ένα γεύμα μειώνοντας τις συγκεντρώσεις γλυκόζης, λιπαρών οξέων και αμινοξέων στο αίμα.

### 1.3.2. Γλυκαγόνη και γλυκόζη



Εικόνα 4: η δομή της γλυκαγόνης

Όταν ο οργανισμός δεν έχει καταναλώσει τροφή, το πάγκρεας εκκρίνει γλυκαγόνη (εικόνα 4) έτσι ώστε το σώμα να μπορεί να παράγει γλυκόζη. Η γλυκαγόνη είναι μια άλλη πρωτεϊνική ορμόνη η οποία παράγεται από τα α κύτταρα των νησιδίων του

παγκρέατος. Η γλυκαγόνη δρα στα ίδια κύτταρα που δρα και η ινσουλίνη, αλλά έχει τα αντίθετα αποτελέσματα.

- διεγείρει το ήπαρ και τους μύες να κινητοποιήσουν το αποθηκευμένο γλυκογόνο και να απελευθερώσουν γλυκόζη
- διεγείρει την γλυκονεογένεση στο ήπαρ και τους νεφρούς

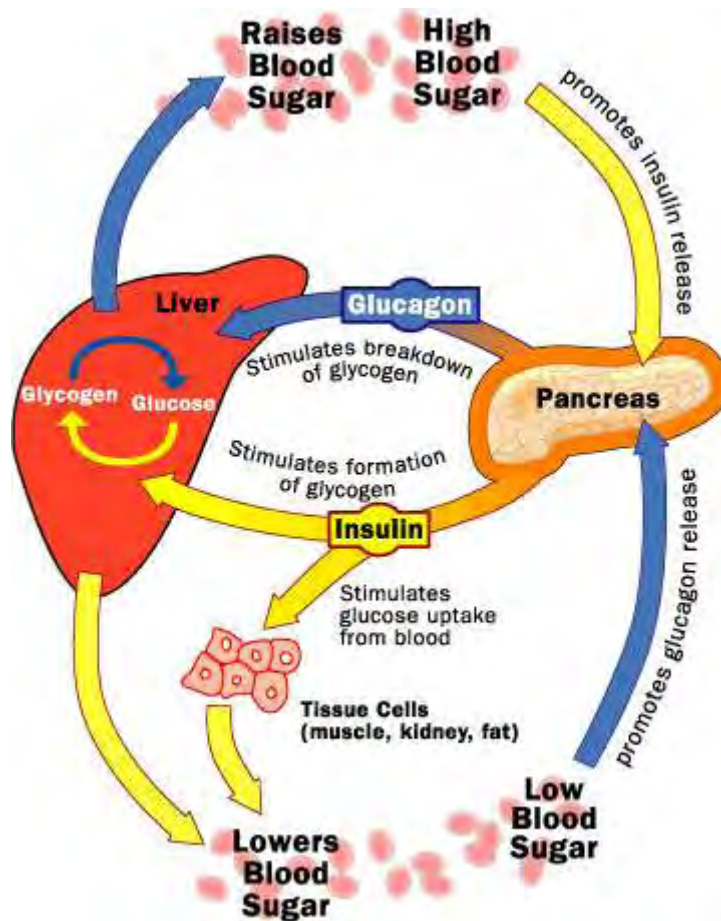
Σε αντίθεση με την ινσουλίνη, η γλυκαγόνη «συναρμολογεί» γλυκόζη από αποθήκες μέσα στο σώμα και αυξάνει τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης στο αίμα, διαφορετικά η γλυκόζη του αίματος μπορεί να πέσει σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

### **1.3.3. Ισορροπία ινσουλίνης - γλυκαγόνης**

Φυσιολογικά τα επίπεδα της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης είναι εξισορροπημένα στο αίμα. Για παράδειγμα, μετά από ένα γεύμα το σώμα είναι έτοιμο να προσλάβει γλυκόζη, λιπαρά οξέα και αμινοξέα από την τροφή. Η παρουσία αυτών των ουσιών στο έντερο διεγείρουν τα παγκρεατικά β κύτταρα να εκκρίνουν ινσουλίνη στο αίμα και να καταστείλουν τα α κύτταρα από το να εκκρίνουν γλυκαγόνη. Τα επίπεδα της ινσουλίνης στο αίμα αρχίζουν να ανεβαίνουν και να δρουν στα κύτταρα (ήπατος, λιπώδη, μυϊκά) ώστε να απορροφήσουν τα εισερχόμενα μόρια γλυκόζης, λιπαρών οξέων και αμινοξέων. Αυτή η δράση της ινσουλίνης εμποδίζει την άνοδο στη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Μ' αυτόν τον τρόπο το σώμα διατηρεί σταθερά τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα.

Σε αντίθεση, μεταξύ γευμάτων ή ύπνου, το σώμα «πεινάει». Τα κύτταρα χρειάζονται γλυκόζη από το αίμα για να λειτουργήσουν. Μεταξύ αυτών των ωρών, μικρές πτώσεις στο σάκχαρο του αίματος διεγείρουν την έκκριση γλυκαγόνης από τα παγκρεατικά α κύτταρα και αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης από τα β κύτταρα. Τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα αυξάνονται. Η ορμόνη αυτή δρα στο συκώτι, τους μύες και τον νεφρό ώστε να συνθέσουν γλυκόζη

από το γλυκογόνο ή να φτιάξουν γλυκόζη η οποία απελευθερώνεται στο αίμα. (εικόνα 5)



Εικόνα 5: η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη έχουν αντίθετες επιδράσεις στο σукώτι αλλά και σε άλλους ιστούς για τον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος.

#### 1.4. Κύριοι τύποι Σακχαρώδους Διαβήτη

**1. Διαβήτης τύπου 1 ή IDDM.** Ο διαβήτης τύπου 1 ή νεανικός ινσουλινοεξαρτώμενος ΣΔ αποτελεί το 5% του συνόλου των περιστατικών της Ελλάδας και έχουμε 400-500 παιδιά σε ηλικία κάτω των 20 ετών ετησίως, που εκδηλώνουν το διαβήτη τύπου 1 κυρίως στις μεγαλουπόλεις και στα μεγάλα αστικά κέντρα.

##### Παθοφυσιολογία του διαβήτη τύπου 1

Ο διαβήτης τύπου 1, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, οφείλεται σε γρήγορη καταστροφή των β κυττάρων του

παγκρέατος με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια της ινσουλίνης και την μη παραγωγή ινσουλίνης. Η αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων μπορεί να προκληθεί από ένα περιβαλλοντικό ερέθισμα, όπως μια ιογενή λοίμωξη. Επιπλέον, γενετικοί παράγοντες αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης τέτοιων αυτοάνοσων φαινομένων.

Η εμφάνιση του διαβήτη τύπου 1 είναι συνήθως απότομη. Εμφανίζεται πριν από τα 30 χρόνια αλλά μπορεί να διαγνωσθεί σε κάθε ηλικία. Οι περισσότεροι διαβητικοί τύπου 1 έχουν φυσιολογικό βάρος ή είναι λεπτοί στην κατασκευή του σώματος. Εφόσον το πάγκρεας δεν παράγει ινσουλίνη ο διαβητικός τύπου 1 είναι απόλυτα εξαρτημένος από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης για την επιβίωση του. Οι διαβητικοί τύπου 1 είναι επιρρεπείς στην διαβητική κετοξέωση, αφού το πάγκρεας δεν παράγει ινσουλίνη, και η γλυκόζη δεν μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα και παραμένει στο αίμα.

Για να ικανοποιήσει το κύτταρο τις ενεργειακές του ανάγκες, τα λίπη διασπώνται μέσω τις λιπόλυσης, ελευθερώνοντας γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η γλυκερόλη μετατρέπεται σε γλυκόζη για τις κυτταρικές ενεργειακές ανάγκες. Τα λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε κετόνες, αυξάνοντας τα επίπεδα κετονών στα υγρά του σώματος και μειώνουν την συγκέντρωση υδρογονοκατιόντων (pH). Οι κετόνες απεκκρίνονται από τα ούρα συνοδευόμενες από μεγάλες ποσότητες νερού. Η ύπαρξη κετονών στα σωματικά υγρά, το μειωμένο pH, η απώλεια ηλεκτρολυτών οδηγούν στην διαβητική κετοξέωση (DKA), η οποία οδηγεί σε κώμα ή και θάνατο.

### Συμπτώματα διαβήτη τύπου 1

Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 1 συνήθως εμφανίζονται και εξελίσσονται σε μικρό χρονικό διάστημα και τις περισσότερες φορές είναι θορυβώδη. Τα κλασικά συμπτώματα περιλαμβάνουν



πολυουρία, πολυδιψία, πολυφαγία απώλεια βάρους, καταβολή δυνάμεων και διαταραχές στην όραση.

	<b>Διαβήτης τύπου 1</b>	<b>Διαβήτης τύπου 2</b>
<b>Ηλικία εμφάνισης</b>	Συνήθως κάτω των 30 ετών	Συνήθως άνω των 40 ετών
<b>Συχνότητα</b>	Περίπου 0.03%	4 - 6%
<b>Κληρονομικότητα</b>	(+)	(+++)
<b>Εκδήλωση</b>	Θορυβώδης	Ύπουλη
<b>Παραγωγή ινσουλίνης</b>	Πλήρης ή σχεδόν πλήρης έλλειψη	Μερική έλλειψη και αντίσταση στην ινσουλίνη
<b>Θεραπεία</b>	Δίαιτα και ινσουλίνη	Δίαιτα και δισκία, πιθανώς αργότερα ινσουλίνη

*Εικόνα 6:* βασικές διαφορές μεταξύ διαβήτη τύπου 1 και τύπου 2.

**2. Διαβήτης τύπου 2 ή NIDDM.** Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 ή μη ινσουλινοεξαρτόμενος διαβήτης είναι ο συχνότερος τύπος διαβήτη. Περιλαμβάνει το 80-90% των διαβητικών και συνοδεύεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 60% από παχυσαρκία. Είναι μια πολύπλοκη και προοδευτικά εξελισσόμενη διαταραχή της λειτουργίας των β κυττάρων του παγκρέατος η οποία οδηγεί σε μερική έλλειψη ινσουλίνης ή αδυναμία του οργανισμού να χρησιμοποιεί σωστά την ινσουλίνη με αποτέλεσμα να καταλήξει σε αδυναμία του σώματος να χρησιμοποιήσει τα σάκχαρα ως πηγή ενέργειας.

### Παθοφυσιολογία του διαβήτη τύπου 2

Οι περισσότεροι ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 είναι ενήλικες και υπέρβαροι. Η γενετική επιρροή στο διαβήτη

τύπου 2 είναι μεγαλύτερη από το διαβήτη τύπου 1. Σε αντίθεση με τα γενετικά ερεθίσματα, οι παράγοντες κινδύνου για τον διαβήτη τύπου 2 περιλαμβάνουν παχυσαρκία, προχωρημένη ηλικία και καθιστικό τρόπο ζωής.

Η παθοφυσιολογία που βρίσκεται πίσω από αυτόν τον τύπο διαβήτη δεν περιλαμβάνει αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων. Αντιθέτως χαρακτηρίζεται από 3 διαταραχές: (1) περιφερική αντίσταση στην ινσουλίνη και ιδιαίτερα στα μυϊκά κύτταρα, (2) αυξημένη παραγωγή γλυκόζης και (3) παραλλαγή στην έκκριση παγκρεατικής ινσουλίνης. Το πάγκρεας παράγει ινσουλίνη αλλά η αντίσταση στην ινσουλίνη αποτρέπει τη σωστή χρήση της από τα κύτταρα. Η γλυκόζη δεν μπορεί να εισέλθει σε κύτταρα στόχους και παραμένει στο αίμα με αποτέλεσμα την υπεργλυκαιμία. Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης συχνά προκαλούν μια αύξηση στην παραγωγή ινσουλίνης όμως με την πάροδο του χρόνου η παραγωγή της παγκρεατικής ινσουλίνης μειώνεται σε χαμηλά επίπεδα. Σε αντίθεση με την υπεργλυκαιμία οι διαβητικοί τύπου 2 εμφανίζουν ένα σύνολο διαταραχών που ονομάζεται «σύνδρομο αντίστασης στην ινσουλίνη».

Η παχυσαρκία συμβάλει αρκετά στην αντίσταση στην ινσουλίνη ακόμα και απουσία διαβήτη. Στην πραγματικότητα, η απώλεια βάρους είναι ο πρώτος στόχος στα πλαίσια της θεραπείας των παχύσαρκων ατόμων με διαβήτη τύπου 2. Η αντίσταση στην ινσουλίνη μειώνεται με την απώλεια βάρους.

Ο διαβήτης αυτός εμφανίζεται αργά και μπορεί να μην έχει διαγνωστεί για χρόνια. Τα μισά άτομα από αυτά που πάσχουν μένουν αδιάγνωστα και κινδυνεύουν από τις διαβητικές επιπλοκές. Οι διαβητικοί τύπου 2 δεν απαιτούν χορήγηση ινσουλίνης για την επιβίωση τους αφού μπορούν να παράγουν ινσουλίνη. Ωστόσο, η ινσουλίνη αποτελεί θεραπευτική επιλογή σε διαβητικούς τύπου 2 που δε ρυθμίζονται πλέον με δισκία. Αντίθετα με τον τύπο 1, οι διαβητικοί τύπου 2 δεν εμφανίζουν DKA επειδή η παραγωγή παγκρεατικής ινσουλίνης είναι αρκετά

ικανοποιητική έτσι ώστε να εμποδίζει την παραγωγή κετονών. Το στρες μπορεί να προκαλέσει DKA. Μεγάλες περιόδους με υπεργλυκαιμία έχουν ως αποτέλεσμα την υπερωσμωτική μη κετονική οξέωση. Η υπεργλυκαιμία έχει ως αποτέλεσμα την απέκκριση μεγάλων ποσοτήτων γλυκόζης στα ούρα με μεγάλη απώλεια νερού. Αν τα υγρά δεν αντικατασταθούν, η αφυδάτωση προκαλεί διαταραχή ηλεκτρολυτών και οξέωση.

### Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 2

Τα συμπτώματα του NIDDM εισβάλλουν σταδιακά και δεν είναι τόσο θορυβώδη όπως αυτά του τύπου 1. Αδυναμία κόπωση, συχνουρία, δίψα, θολή όραση, συχνές λοιμώξεις, αργή επούλωση των πληγών είναι μερικά από τα συμπτώματα που μπορεί να υποκρύπτουν την διάγνωση του διαβήτη τύπου 2.

### Φαρμακευτική αγωγή

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 τα οποία έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης είναι:

- ινσουλίνη
- σουλφονουρίες
- διγουανιδίνες
- αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης
- θειαζολιδινεδιόνες

Οι θεραπείες αυτές έχουν αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών αποδεικνύονται και ανεπαρκείς. Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην διερεύνηση άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων όπως για παράδειγμα ανταγωνιστές των υποδοχέων του γλυκογόνου, αναστολείς της ηπατικής παραγωγής ινσουλίνης καθώς και συνδυαστικές θεραπείες. Υπάρχει λοιπόν, σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών μέσων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας των επιπλοκών της νόσου.

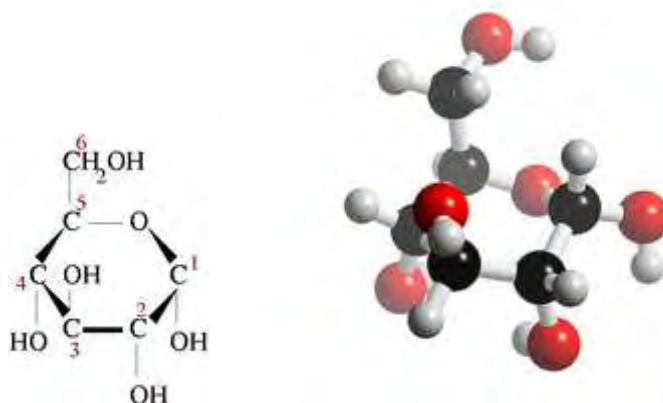
### 1.5. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος αντιδιαβητικών φαρμάκων

Καθώς οι νέες θεραπείες για τον διαβήτη τύπου 2 δεν είναι πάντα ικανοποιητικές, τα τελευταία χρόνια έχει εκδηλωθεί ένα ενδιαφέρον για την εύρεση ενός άλλου δραστικού τρόπου ρύθμισης των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Μια μοριακή προσέγγιση στοχεύει στην μείωση παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ με αναστολή της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP). Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι το ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην έκλυση γλυκόζης στο αίμα. Εξαιτίας αυτού του ρόλου της, χρησιμοποιείται ως στόχος για την παρασκευή αναστολέων οι οποίοι θα μπορούσαν να εμποδίζουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της GP αποτελεί συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας

## 2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1. Γλυκόζη

Η γλυκόζη (εικόνα 7) είναι μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μία αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται περισσότερο στη φύση είναι η αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϊδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μια ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμερής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείτε πυρανόζη λόγω της ομοιότητας του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν 2 στεροεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη.



Εικόνα 7: η δομή της γλυκόζης (συντακτική και τρισδιάστατη μορφή)

Η γλυκόζη υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πολλών υδατανθράκων. Είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για την λειτουργία του εγκεφάλου, αφού ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί την γλυκόζη ως βασικό καύσιμο

υλικό, ενώ τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν μόνο γλυκόζη. Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ποικίλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ρυθμίζει την πρόσληψη ή την απελευθέρωση γλυκόζης.

Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται μέσα στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωση της και από την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και από την παρουσία ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν ινσουλίνη μόνο με την βοήθεια ινσουλίνης.

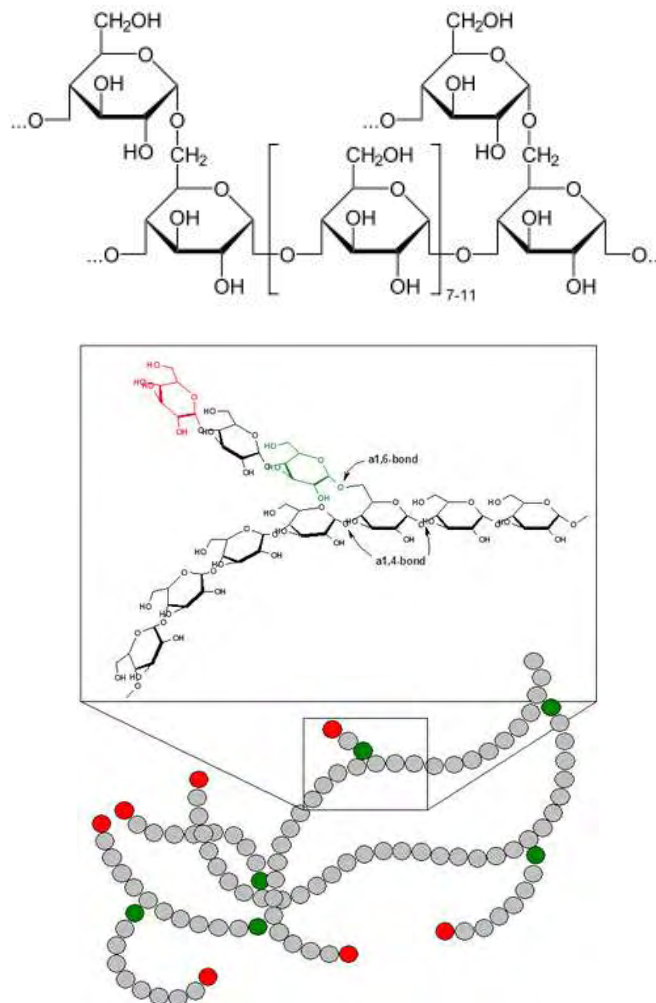
Τέλος, το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει τα αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη. Η πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση των τελικών προϊόντων και την διαιτητική κατάσταση του οργανισμού.

## **2.2. Γλυκογόνο**

Το γλυκογόνο είναι ανάλογο του αμύλου, που είναι το πολυμερές της γλυκόζης στα φυτά και μερικές φορές αναφέρεται και ως *το άμυλο των ζώων*. Το γλυκογόνο έχει παρόμοια δομή με την αμυλοπηκτίνη αλλά είναι σε μεγαλύτερο βαθμό διακλαδισμένο και πιο συμπαγές από το άμυλο.

Το γλυκογόνο αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης και είναι η κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ

τους με  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης. (εικόνα 8)



*Εικόνα 8:* η δομή του γλυκογόνου.

Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση της γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες . Η

συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό τι στους μύες, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται περισσότερο γλυκογόνο.

Η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς ρυθμίζουν το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα και παρέχουν αποθέματα γλυκόζης σε περίπτωση έντονης εξαντλητικής μυικής εργασίας. Τα διάφορα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στο 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.

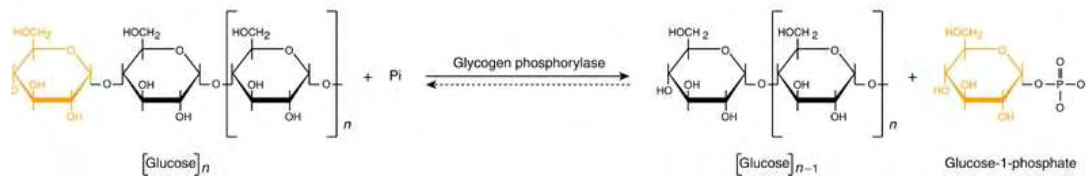
### **2.2.1. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου**

Η αποδοτική αποικοδόμηση του γλυκογόνου για να προμηθεύσει 6-φωσφορική γλυκόζη χρειάζεται τέσσερις ενζυμικές δραστηριότητες:

- μια να αποικοδομεί το γλυκογόνο
- δυο να ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο ώστε να παραμένει ένα υπόστρωμα για αποικοδόμηση
- μια να μετατρέπει το προϊόν του καταβολισμού του γλυκογόνου σε μια μορφή κατάλληλη για περαιτέρω μεταβολισμό.

Καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου αποτελεί η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP). Η GP διασπά το υπόστρωμα της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1- φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού ιόντος αναφέρεται ως φωσφορόλυση. (Εικόνα 9)





**Εικόνα 9:** η αντίδραση φωσφορόλυσης που καταλύεται από το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

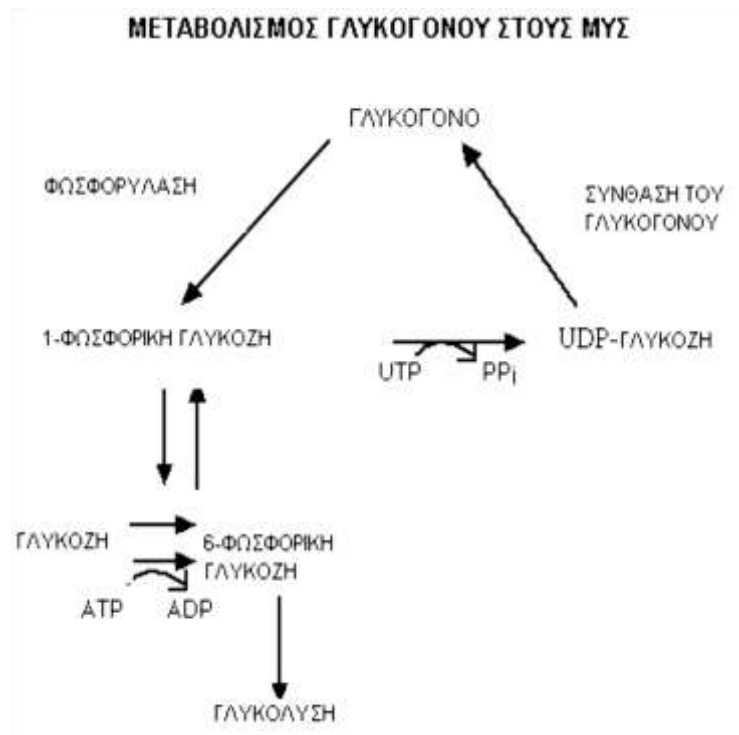
Η φωσφορυλάση καταλύει την διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης και πριν από το σημείο διακλάδωσης. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στην διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C1) και του τέταρτου άνθρακα (C4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται.

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 φωσφορική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο (γλυκόζη), είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη) το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στην γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από

φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με την γλυκόζη.

### 2.2.2. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου



**Σχήμα 1.** μεταβολισμός γλυκογόνου. Το γλυκογόνο αποικοδομείται από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου και συντίθεται από την συνθάση. Η σύνθεση του γλυκογόνου γίνεται με μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε UDP-γλυκόζη (υπόστρωμα στο οποίο δρα η συνθάση) και κατανάλωση του ATP. 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 της γλυκογόνου στο ήπαρ είναι βασικό στοιχείο για την ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα. Όταν εγχύεται γλυκόζη στην κυκλοφορία η ποσότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στο αίμα μειώνεται αισθητά.

Στο ήπαρ, η γλυκόζη δρα συνεργιστικά με την ινσουλίνη και αναστέλλει τη δράση της GPa, με αποτέλεσμα την ελάτωση 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 την μετατροπή της GPa σε GPb, καθώς και την αποφωσφορυλίωση (ενεργοποίηση) της συνθάσης του γλυκογόνου, αυξάνοντας την σύνθεση γλυκογόνου. Ενώσεις, συνεπώς, με ισχυρότερη ανασταλτική δράση είναι δυνατόν να μετατοπίζουν την ισορροπία αποικοδόμησης και σύνθεσης του γλυκογόνου προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και ως εκ τούτου, να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στην αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2, όπου η υπεργλυκαιμία αποτελεί σοβαρό πρόβλημα.

## **2.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου**

### **2.3.1. Γενικά**

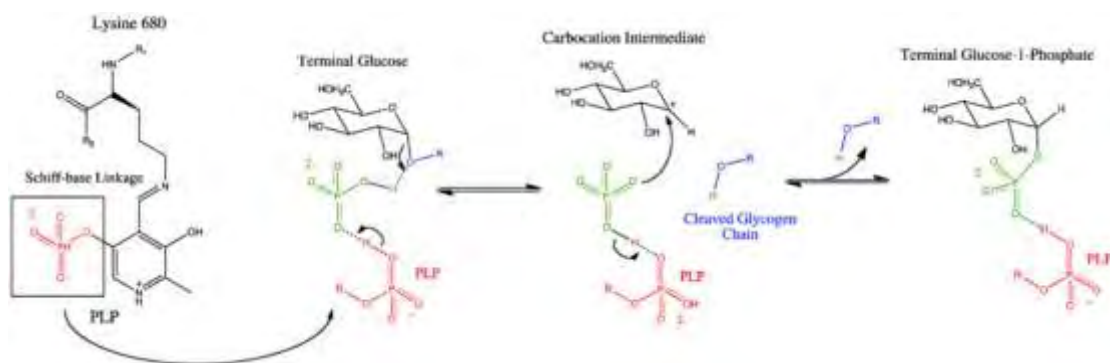
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης, ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, των μυών και του ήπατος. Οι τρεις αυτές ισομορφές εμφανίζουν 80% ομολογία στην αλληλουχία τους και κάθε μια ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στο μεταβολισμό

του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη στον εγκέφαλο κατά περιόδους έντονης υποξείας και υπογλυκαιμίας, ενώ αυτή των μυών παρέχει ενέργεια στους μύες. Αντίθετα με τις προηγούμενες ισομορφές, αυτή του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο καθώς ρυθμίζει την συγκέντρωση της γλυκόζης.

Όσον αφορά την δομή της, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από δύο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kD και από το συνένζυμο 5-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου και το κέντρο αναστολής.

Η δράση της φωσφορυλάσης επιτυγχάνεται μέσω της προσθετικής ομάδας. Η PLP σχηματίζει βάση Schiff με την εαμινομάδα της λυσίνης 680 της φωσφορυλάσης. Όταν η φωσφορυλάση έρχεται σε επαφή με ένα μόριο γλυκόζης του γλυκογόνου, η PLP δρα ως μεταφορέας ηλεκτρονίων και βοηθά στην δημιουργία ενός ενδιάμεσου καρβοκατιόντος (εικόνα 10). 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.



**Εικόνα 10:** η πορεία βημάτων για την απόσπαση ενός μορίου γλυκόζης παρουσία της PLP.

Η κατάλυση της φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό κέντρο που εντοπίζεται σε μια κοιλότητα που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινοτελική και την καρβοξυτελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Η κοιλότητα αυτή φέρνει σε γειτνίαση τα υποστρώματα (γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ιόν) ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια  $H_2O$ . 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  $\alpha$ -D-γλυκόζη) ( $\alpha$  ανωμερές), που οφείλεται πιθανότατα στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη πυρινόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου φωσφορική πυριδοξάλη, που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την  $\epsilon$ -αμινομάδα της λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα ως δότης αλλά και ως δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση [Stryer,1997].

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση ρυθμίζοντας φυσιολογικά την δραστηριότητα της GP. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP<sub>a</sub> (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μια ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G, (PP-1G) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η

φωσφορυλάση μεταπίπτει στην μορφή GPb (μη φωσφορυλιωμένη GP).

### **2.3.2. Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις**

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. Ως αλλοστερικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τουλάχιστον δύο 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 κέντρο 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 εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή.

Γενικά θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από την συγκεκριμένη δομή του ίδιου μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωση του που επάγεται από την σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή.

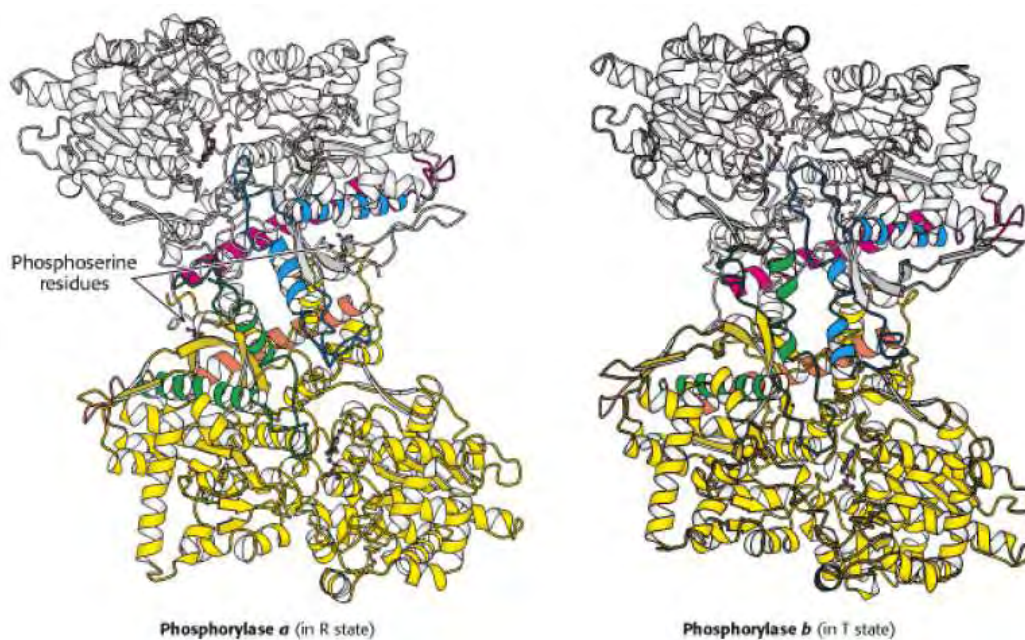
Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται σε ομοτροπικές και ετεροτροπικές, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να

καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Δηλαδή, το μόριο να έχει τουλάχιστον ένα άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δύο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την T μορφή και την R μορφή, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά L. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται κατά την διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από την μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγένεια τους με συγκεκριμένους υποκαταστάτες μεταβάλλεται. Η σύνδεση του υποστρώματος σε οποιοδήποτε μονομερές δεν επηρεάζει με κανένα τρόπο την σύνδεση του στα υπόλοιπα μονομερή (δηλαδή οι μικροσκοπικές σταθερές διάστασης στα σύμπλοκα μεταξύ των μονομερών T ή R διαμόρφωσης είναι αντίστοιχα ίδιες).

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δύο 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. Συνέπεια της σύνδεσης αυτής είναι η αύξηση ή αντίστοιχα μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η 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 προκαλείτε από αναστολέα ή ενεργοποιητή του ενζύμου. Η σιγμοειδής συμπεριφορά είναι χαρακτηριστικό των αλλοστερικών πρωτεϊνών.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman [Monod et al., 1963]. Έτσι κάθε μια από τις δύο μορφές της βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση α ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για

την φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση Tα (εικόνα ). Η μετάβαση από την κατάσταση T στην R συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α-έλικες , οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για τι ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανομένη.



**Εικόνα 11 : η φωσφορυλάση a και b.** Η φωσφορυλάση a είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί την μετάβαση στην περισσότερο ενεργή διαμόρφωση R. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για την ρύθμιση φαίνονται με μπλε ή κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί ή πράσινο. Η φωσφορυλάση b δεν είναι φωσφορυλιωμένη και απαντάται στην T διαμόρφωση.

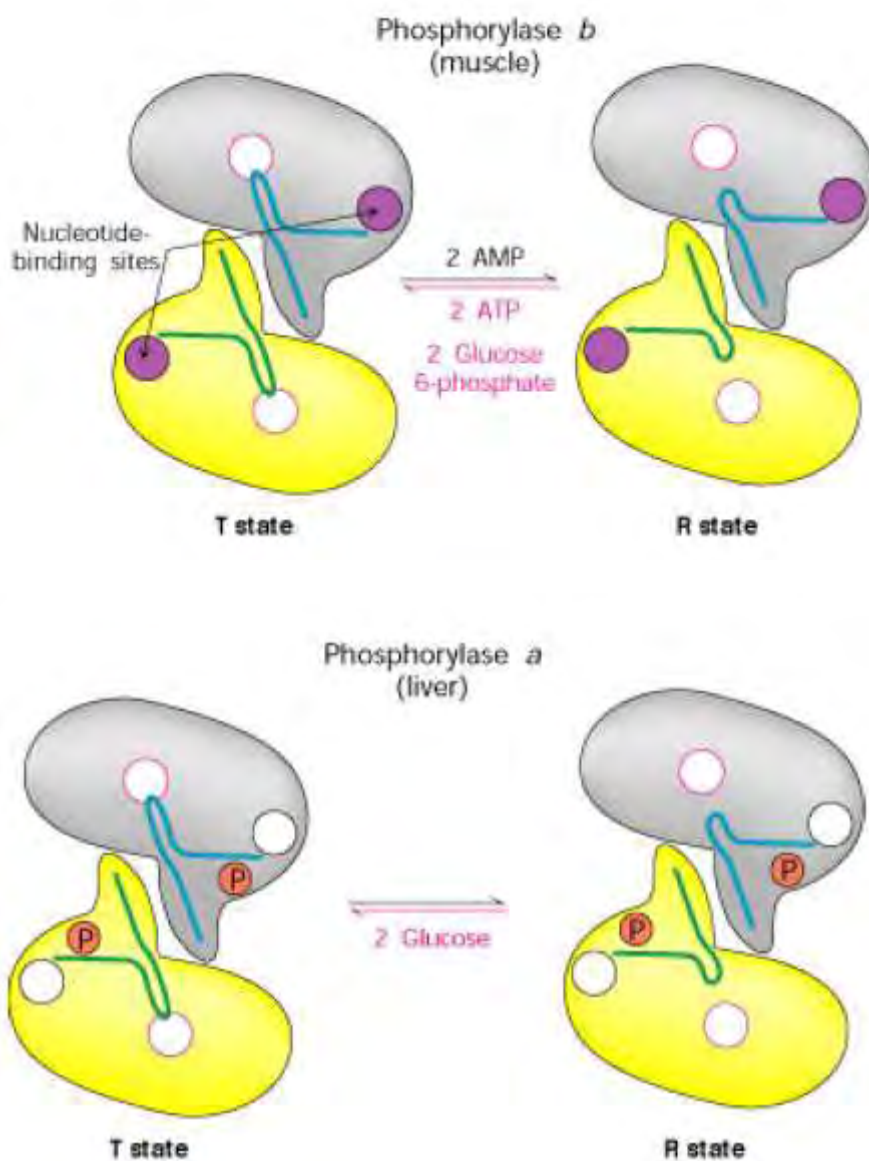


Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης του νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί την στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα η φωσφορυλάση a είναι ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα AMP και ATP.

Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται από αναστολές και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, το 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 την λιγότερο δραστική T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων ) προκαλώντας μπλοκάρισμα του ενεργού κέντρου. Τέλος, στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη, προκαλώντας μετατόπιση προς την T διαμόρφωση. Το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας προς την R κατάσταση και το ATP που απλά ανταγωνίζεται το AMP [Οικονομακος, 2002].

Η ανενεργή μορφή της φωσφορυλάσης b μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική δράση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την α-D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν in vitro να προκαλέσουν ενεργοποίηση του

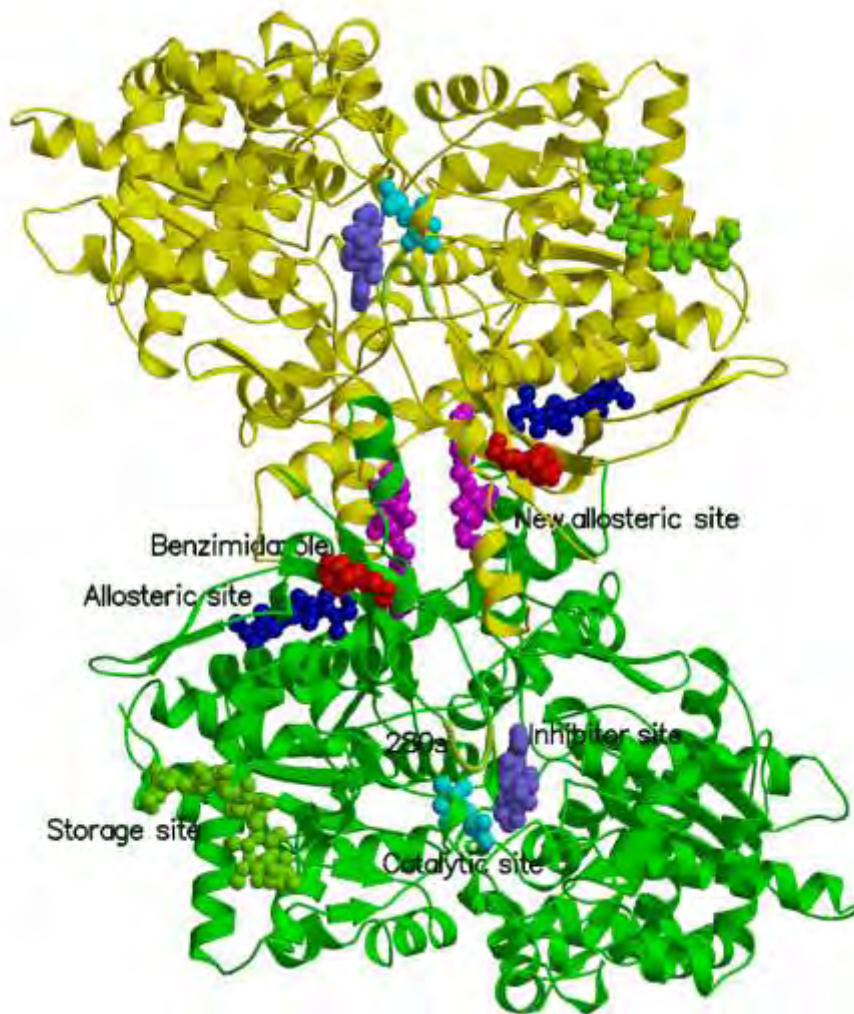
ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ . Η μετατροπή της  $\text{GPb}$  σε  $\text{GPa}$  έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ανενεργό απουσία  $\text{AMP}$ . Η  $\text{GPa}$  επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το  $\text{AMP}$  συγκριτικά με την  $\text{GPb}$  (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα  $\text{ATP}$ ,  $\text{ADP}$  και την  $\text{G6P}$  [Οικονομακος, 2002].



Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιόσταση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση *a*, αλλά όχι 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 κατάσταση T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίστανται τις εντοπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο [Oikonomakos, 2002].

### **2.3.3. Η δομή της GP**

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου μπορεί να χωριστεί σε δύο 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 φωσφορυλίωσης 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 [Oikonomakos, 2002].



*Εικόνα 12 : Σχηματική απεικόνιση της δομής του διμερούς μορίου της GPb. Το διμερές μόριο της GPb όπως φαίνεται κατά μήκος του μοριακού άξονα συμμετρίας δεύτερης τάξης στον οποίο υποδεικνύονται τα κέντρα σύνδεσης των διαφόρων τροποποιητών. Με μωβ χρώμα απεικονίζεται το κέντρο αναστολής (φλαβοπυριδόλη), με κυανό το καταλυτικό κέντρο (GlucNac), με μπλε το αλλοστερικό κέντρο (acurea), με πράσινο το αποθηκευτικό κέντρο (μαλτοτετραόζη) και με ροζ το νέο αλλοστερικό κέντρο (CP320626).*

### 2.3.4. Τα κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

#### 1. Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14

Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από την μορφή α στην μορφή β. Το κέντρο σχηματίζεται κατά την ενεργοποίηση της GPβ με φωσφορυλίωση. Η φωσφορική ομάδα συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με δυο 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 την συμμετρική υπομονάδα. Η φωσφορική ομάδα αλληλεπιδρά επίσης με το άζωτο της κύριας αλυσίδας της Val 15 και της Gln 72 μέσω ενός μορίου ύδατος [Οικονομακος, 2002].

#### 2. Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, περίπου 32Å από την Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις δυο πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, T και R, της GPβ και της GPα. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από τρία υπο-κέντρα:

A) το υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας

B) το υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων (ριβόζης)

Γ) το υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρίνης)

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, Glc-1-P, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, Glc-6-P, UDP-Glc, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν, NADH). Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP, όταν συνδέεται, εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 (αμινοξέα 47-78 και 289-314

αντίστοιχα) και είναι κοντά στην διεπιφάνεια των υπομονάδων [Oikonomakos, 2002].

### 3. Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από την 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 15Å από τη επιφάνεια περίπου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP.

### 4. Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30Å από το καταλυτικό κέντρο και 40Å 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 δύο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας.

Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί ως επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψη του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης.

### 5. Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής (ή νουκλεοζιτικό κέντρο) είναι ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12Å 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 ινοσίνη), τα νουκλεοτίδια (όπως το AMP, το IMP και το ATP) το NADH καθώς και συγκεκριμένες ετεροκυκλικές ενώσεις όπως η ριβοφλαβίνη και φλαβοπυριδόλη δένονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GP<sub>a</sub> και GP<sub>b</sub>, όχι όμως (όλες οι ενώσεις) και στην ηπατική GP<sub>a</sub>, η οποία παρουσιάζει τη 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 εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων [Oikonomakos, 2002].

#### 6. Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δύο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GP<sub>b</sub>. Κατά την σύνδεση μιας ένωσης δημιουργούνται αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις στην T διαμόρφωση της GP<sub>b</sub>. Αντιθέτως οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GP<sub>a</sub> [Oikonomakos et al., 2000].

#### 2.3.5. Ενζυμική αναστολή

Γενικά είναι αποδεκτό ότι μόνο μια περιοχή (ενεργός περιοχή) του συνολικού ενζυμικού μορίου εμπλέκεται άμεσα στην καταλυτική διεργασία. Ο κύριος ρόλος του υπόλοιπου μορίου είναι να διατηρεί την ενεργό περιοχή σε στερεοδιατάξεις καταλυτικά δραστικές ώστε να δεσμεύει και να δρα στα υποστώματα. Συνέπεια τούτου είναι το ένζυμο, στην πράξη να

εμφανίζει δύο άριστες (βέλτιστες) συνθήκες. Μια που αφορά στην 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, ελλατώνουν 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 σε μη αντιστρεπτούς (irreversible). Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται κατά τρόπο αντιστρέψιμο με το ένζυμο οπότε το τελευταίο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστικότητά 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 του αναστολέα, ενζύμου και υποστρώματος.

Αντίθετα οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται κατά τρόπο μόνιμο οπότε το ένζυμο αδρανοποιείται 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 ιόντα 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 ένα 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 πρόσδεση του στο ενεργό κέντρο. Ελλατώνει την ταχύτητα της αντίδρασης με το να ελλατώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Στη μη συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας, ελλατώνει τον αριθμό μετατροπής.
- Η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να διακριθεί από την μη συναγωνιστική, 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 ενεργότητας. 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 την 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 την μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από ένα ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου αναστολέα.

Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδένει το υπόστρωμα ή τον αναστολέα αλλά όχι και τα δύο. Πολλοί συναγωνιστικοί αναστολείς μοιάζουν με το υπόστρωμα και προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελλατώνει την ταχύτητα της

κατάλυσης με το να ελλατώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα 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 σε ένα μόριο ενζύμου. Αυτό σημαίνει ότι οι περιοχές πρόσδεσης τους δεν επικαλύπτονται. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελλατώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελλατώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα με το υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή σε αντίθεση με την 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.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κουνελιού.

Η μέθοδος των Fisher & Krebs (1962) είναι αυτή που χρησιμοποιήθηκε ώστε να απομονωθεί η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιών, με μικρές μόνο τροποποιήσεις (χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) [Melridou & Oikonomakos, 1983].

#### Υλικά

- Κουνέλια (3 μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, / HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT-διθειοτριόλης)
- Κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO<sub>3</sub>)
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου) / HCl 0.001 M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0 M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH 7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH 7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH 7.0
- Διάλυμα (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 1.0M
- Γλυκερόλη

- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  και 10mM EDTA στους 100°C και συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από την χρήση τους)

## Όργανα

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

## Πορεία

Βήμα 1<sup>ο</sup>: παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μύες από 3 κουνέλια. Οι μύες αυτοί αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με απιονισμένο νερό εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο νερού ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο νερού 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<sup>ο</sup>: όξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων.

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των

πρωτεϊνών, η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000 rpm) για 30 min σε θερμοκρασία 0-4 °C. 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  $\text{KHCO}_3$  και ογκομέτρηση του διαλύματος.

#### Βήμα 3<sup>ο</sup>: καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 41% w/v, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% w/v ίσο προς 0.837 για κάθε L πρωτεϊνικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4° C για 24 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με την χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 30 min σε θερμοκρασία 4° C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4° C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M με pH 7.5 για 16 ώρες.

#### Βήμα 4<sup>ο</sup>: θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5500rpm για 30min στους 0-4° C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH7.0 όγκου ίσο με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1M pH 7.0 ίσο με το  $5 \times 10^{-3}$  του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στα 8.8. μετά από επώαση του μίγματος στους 37° C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 0-4° C. και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετράται.

### Βήμα 5<sup>ο</sup>: κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1mL AMP 0.1M (pH 7.0) και  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$  (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης (το AMP και το  $(\text{CHCOO})_2\text{Mg}$  διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 4° C. για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 0-4° C. και διαλυτοποιούνται στους 30° C. με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραιώσης (β-GP/Merc/EDTA,50:50:1 pH 6.8)

Το εναιώρημα υπερφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 25-30° C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6 ωρών. Τα στάδια συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία της AMP.

### Βήμα 6<sup>ο</sup>: συλλογή και αποθήκευση ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30° C σε ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20° C.

## 3.2. Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

### 3.2.1. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb

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

#### **Πορεία:**

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

Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση για  $15$  λεπτά στους  $30^\circ \text{C}$ . Μετά την επώαση, για την εκκίνηση της αντίδρασης,  $180 \mu\text{L}$  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:  $5.0 \text{ mg}$  ενζύμου ανά  $\text{mL}$ ,  $1.0 \text{ mM AMP}$ ,  $1\%$  w/v γλυκογόνο, υποστρώματα  $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$  από  $2 \text{ mM}$  έως  $20 \text{ mM}$ , η θερμοκρασία είναι  $30^\circ \text{C}$  και το  $\text{pH}$   $6.8$ . Ανά τακτά και καθορισμένα χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού), λαμβάνονται δείγματα των  $200 \mu\text{L}$  από το διάλυμα της αντίδρασης και

προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50  $\mu\text{L}$  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  $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ , λόγω της υδρόλυσης και στο γλυκογόνο λόγω, της παρουσίας των φωσφορικών.

### **3.2.2. Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b**

Το ένζυμο φυλάσσεται σε εναιώρημα γλυκερόλης. Από το εναιώρημα αυτό αφαιρούνται 10  $\mu\text{L}$  και αραιώνονται 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.

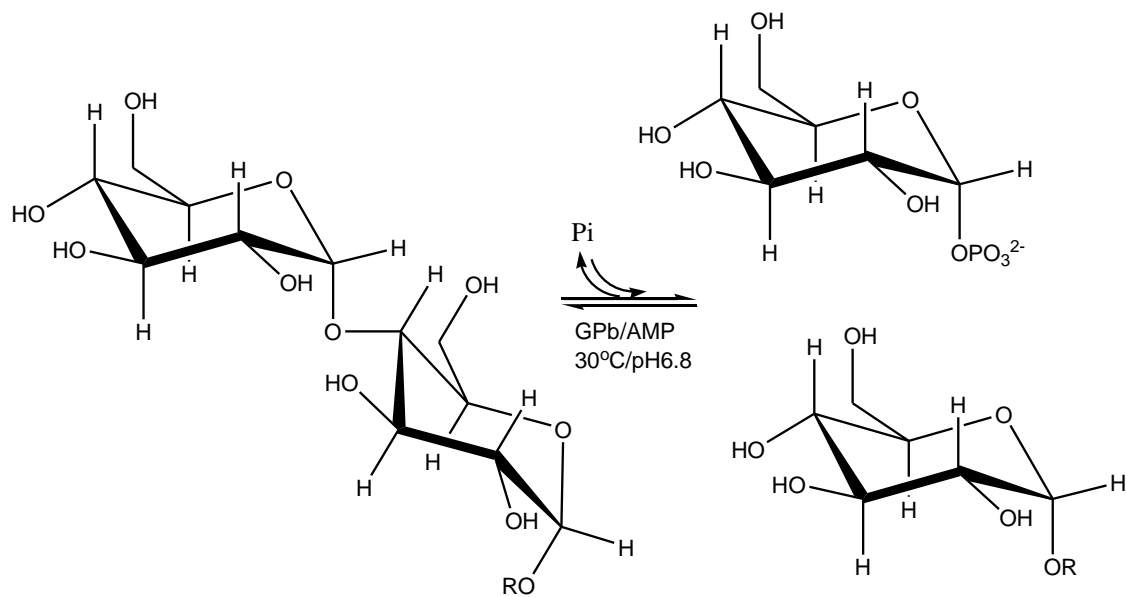
Στη συνέχεια παρασκευάζεται το ενζυμικό διάλυμα σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιέχει 25  $\mu\text{g}$  ενζύμου /mL, γλυκογόνο 5%(w/v), νερό καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου 5% (v/v), έτσι ώστε με την προσθήκη του διαλύματος με το υπόστρωμα, η αντίδραση να λαμβάνει χώρα σε συνθήκες 5.0  $\mu\text{g}$  ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο. Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση με θερμοκρασία 30° C για 15 λεπτά.



### 3.3. 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  $\alpha$ -D-Glc-1-P.

Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου βασίζεται στην ακόλουθη αντίδραση:



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

Στην αντίδραση αυτή η λιγότερο ενεργή μορφή του ενζύμου (T 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 0.2% w/v 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 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].

Έτσι, Οι τιμές  $V_{max}$  και  $K_m$  προσδιορίζονται γραφικά με χρήση του προγράμματος Grafit (Letherbarrow, 1990). Για τον προσδιορισμό της σταθεράς  $K_m$  της GPb πραγματοποιείται κινητική μελέτη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος G-1-P.

#### **3.4. Υπολογισμός των αρχικών ταχυτήτων (v) και των τυπικών αποκλίσεων ( $\sigma^2$ )**

Οι τιμές των αρχικών ταχυτήτων (v) και το τυπικό τους σφάλμα ( $\sigma^2$ ) 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

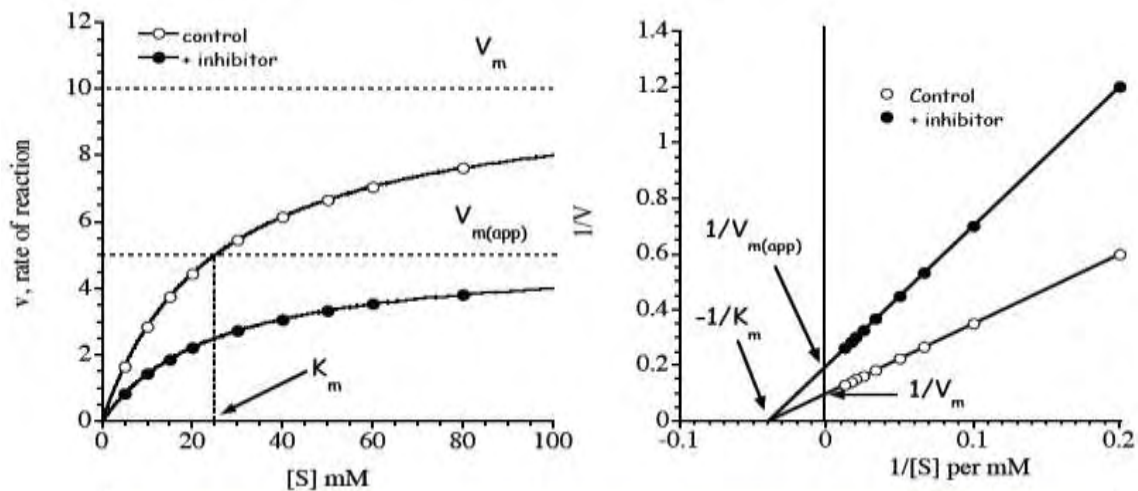
όριο: προκύπτει από το γινόμενο της συγκέντρωσης της Glc-1-P που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος επί τον όγκο του δείγματος επί την μέγιστη υδρόλυση της Glc-1-P στην ισορροπία της αντίδρασης (78%).

### **3.5. Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων Vmax και Km και των τυπικών αποκλίσεων (σ2)**

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  $K_m$ , (εικόνα 7) και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό αυτό χρησιμοποιείται η γνωστή εξίσωση Michaelis-Menten:

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



$K_{m(app)}$  is unaffected but  $V_{m(app)}$  is decreased.

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

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

**Εικόνα 13 :** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορύλασης 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).

### 3.6. 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. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτής της αναστολής, ο αναστολέας δεσμεύεται στο καταλυτικό κέντρο και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

### 3.7. Συσχέτιση IC50- $K_i$

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC50, οι ειδικές δραστηρότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηρότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηρότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{\text{s.a.}_{\text{control}} - \text{s.a.}_i}{\text{s.a.}_{\text{control}}} \times 100\%$$

Όπου: s.a.control : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

s.a.i : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία i συγκεντρώσεως αναστολέα

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC<sub>50</sub> θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC<sub>50</sub> προκύπτει από το διάγραμμα %αναστολή=f([I]). Από την τιμή της IC<sub>50</sub> προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής K<sub>i</sub> που αποτελεί όπως και η K<sub>m</sub> έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υποστρώμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

$$IC_{50} = \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

Όπου [S] η συγκέντρωση του υποστρώματος ως προς το οποίο εξετάζεται η GPb, δηλαδή η συγκέντρωση της Glc-1-P

## 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

### 3.8. Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της  $K_m$  του ενζύμου βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb, γι' αυτό τον λόγο θα πρέπει να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση φωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά:

- Τυφλό νερού για την ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με την μέγιστη συγκέντρωση Glc-1-P που χρησιμοποιείται και αναγωγή της τιμής της απορρόφησης που προκύπτει λόγω της φυσικής υδρόλυσης της Glc-1-P στις άλλες συγκεντρώσεις του πειράματος.
- Τυφλό ενζυμικού μίγματος
- Τυφλό γνωστού διαλύματος φωσφορικών από όπου προσδιορίζεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε  $\mu\text{mol Pi}$ .

Παρασκευάζονται τουλάχιστον από δύο τυφλά για κάθε περίπτωση εκτός του νερού και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους.



## Πορεία

Για να προσδιοριστεί η σταθερά της αναστολής, πραγματοποιούνται 5 πειράματα το καθένα με διαφορετική συγκέντρωση  $\alpha$ -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  $\mu$ 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
$\alpha$ -D-Glc-1-P	200 $\mu$ L 2 $\mu$ M	200 $\mu$ L 4 $\mu$ M	200 $\mu$ L 6 $\mu$ M	200 $\mu$ L 10 $\mu$ M	200 $\mu$ L 20M $\mu$
AMP 50mM	18 $\mu$ L	18 $\mu$ L	18 $\mu$ L	18 $\mu$ L	18 Ml
Αναστολέας	X $\mu$ L	X $\mu$ L	X $\mu$ L	X $\mu$ L	X $\mu$ L
Νερό	720-(218+x) $\mu$ L	720-(218+x) $\mu$ L	720-(218+x) $\mu$ L	720-(218+x) $\mu$ L	720-(218+x) Ml
Τελικός όγκος	720 $\mu$ L	720 $\mu$ L	720 $\mu$ L	720 $\mu$ L	720 $\mu$ L

Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος καθώς και των διαλυμάτων του υποστρώματος, μεταφέρονται 180  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα της αντίδρασης σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιέχουν από 50  $\mu\text{L}$  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  $30^\circ\text{C}$  και μετά ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των  $\mu\text{mol}$  φωσφορικών ιόντων ( $\text{P}_i$ ), 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 δραστικότητας 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 [Saheki et al, 1985]

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 Pi πρέπει να είναι μεταξύ 0,05-0,4  $\mu\text{M}$ , 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 ατμίζοντος 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.

### **Πορεία**

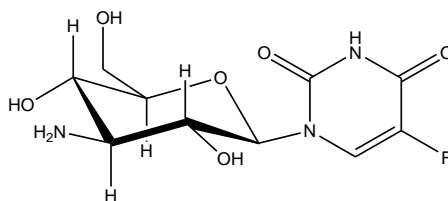
Στα δείγματα που έχουν προκύψει από το κινητικό πείραμα, προστίθενται 2.5 mL από το παραπάνω αντιδραστήριο. Μετά από ισχυρή ανάδευση, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται στο υδατόλουτρο για 15 λεπτά στους 30° C. Έπειτα ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm.

Ακολουθεί η περιγραφή των συνθηκών των κινητικών πειραμάτων που έγιναν για την ένωση που περιλαμβάνονται στην παρούσα εργασία:

### Αναστολέας 11MS021 (1-(3' αμινο 3' δεοξυ β d γλυκοπυροσύλο-5' φλουορουρακίλη)

- G1P: 2mM
- AMP 1mM
- Γλυκογόνο 0,2% w/v

Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν: 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM



Σχήμα 2. Ο χημικός τύπος του αναστολέα 11MS021

### 3.9. 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  $V_{\max}$ .

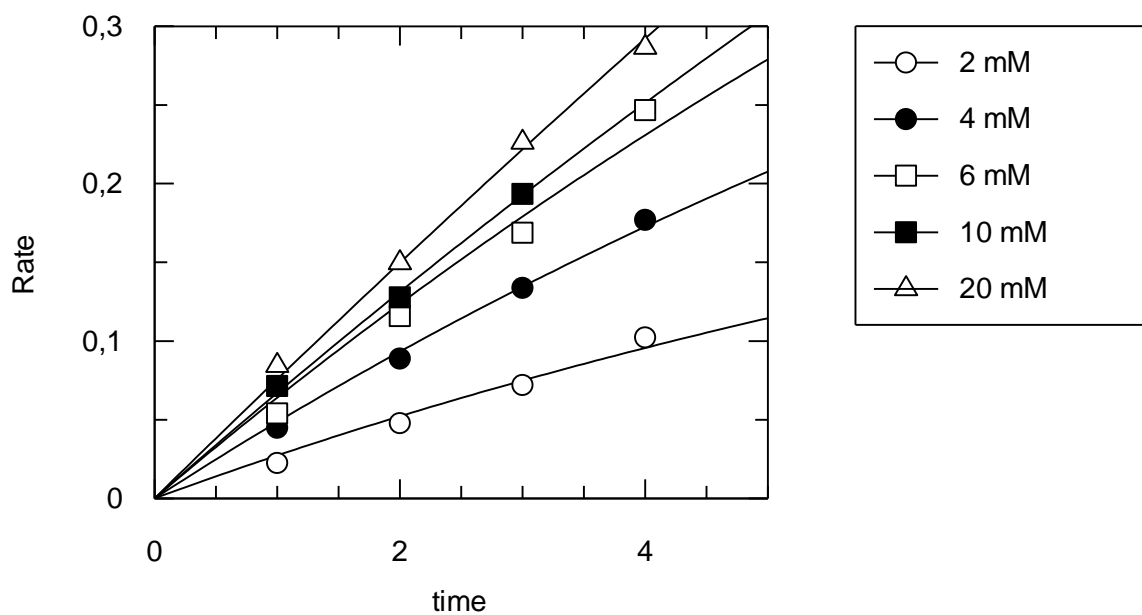
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία αφορά στη βιοχημική μελέτη της ένωσης 11MS021, ένα ανάλογο γλυκόζης, ως προς την ικανότητά της να αναστέλλει τη δράση του ενζύμου GPb. Η ένωση 11MS021 έχει σχεδιασθεί με τη μέθοδο του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού και έχει ως στόχο το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η σύνθεση της ένωσης 11MS021 πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Αν. καθ. Δ. Κομιώτη, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Σχήμα 2).

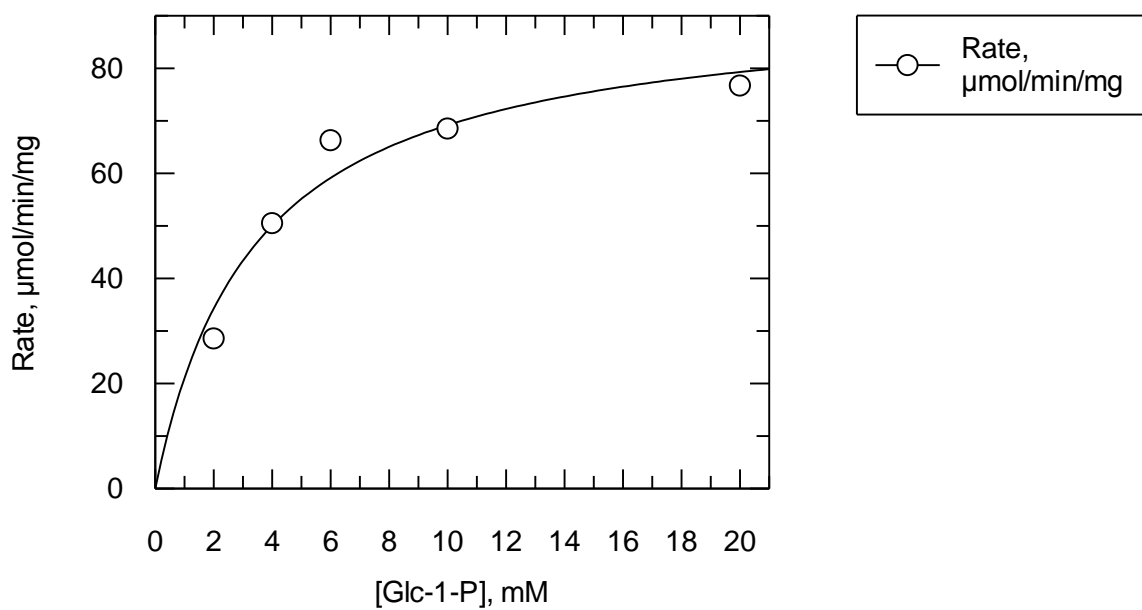
### 4.1. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

Η σταθερά  $K_m$  (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-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 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της  $K_m$ .

Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται η καμπύλη ειδικής δραστηριότητας, το διάγραμμα Michaelis Menten και το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk με  $K_m 3.4 \pm 1.0$  και  $V_{max} 92.8 \pm 8.7 \mu\text{mol Pi/mg/ min}$ .

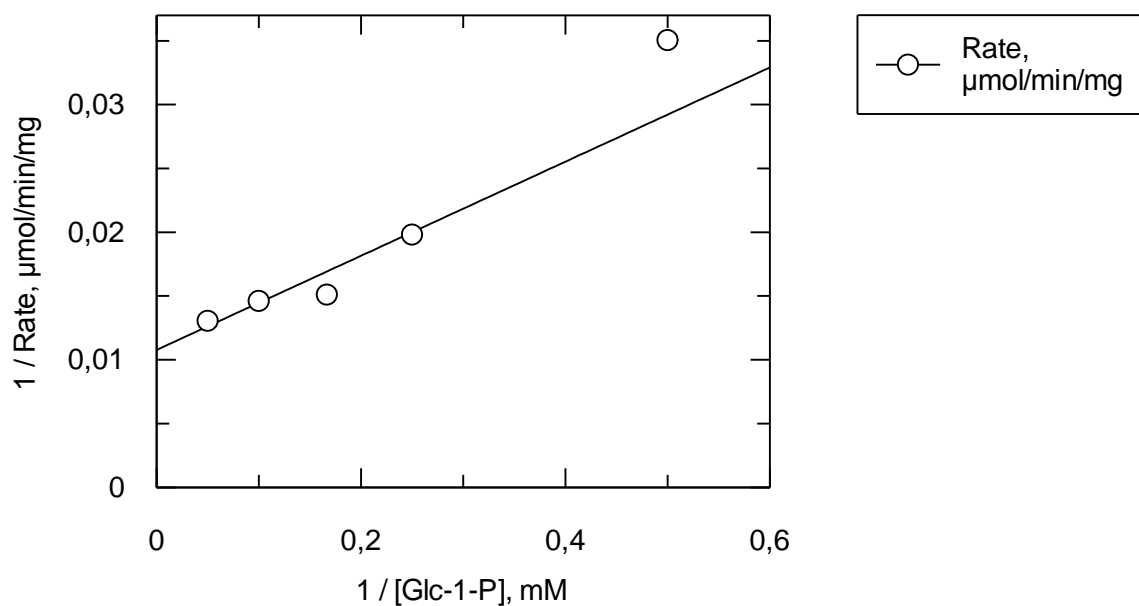


Εικόνα 15: Καμπύλες ειδικής δραστηριότητας φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.



Εικόνα 16: Διάγραμμα Michaelis Menten για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου



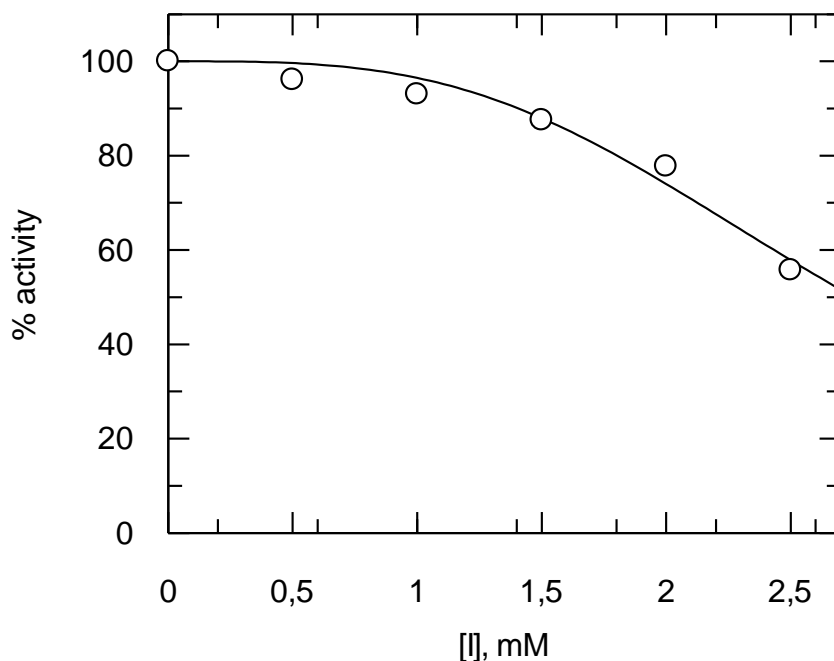


*Εικόνα 17:* Αντίστροφο διάγραμμα (Lineweaver-Burk) δραστηριότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από το οποίο προκύπτουν οι σταθερές  $K_m=3.4 \pm 1.0$  mM και  $V_{max}=92.8 \pm 8.7$   $\mu\text{mol Pi}/\text{mg}/\text{min}$

#### 4.2. Κινητική μελέτη αναστολέα

Η μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση είναι το μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας σε ένα αναστελλόμενο βιολογικό ή βιοχημικό σύστημα. Αποτελεί το μέτρο που δείχνει πόση ποσότητα αναστολέα χρειάζεται να δοθεί στο ένζυμο ώστε να υπάρξει αναστολή. Με άλλα λόγια είναι η μέγιστη συγκέντρωση αναστολής μιας ουσίας (50% IC ή  $IC_{50}$ ). Η  $IC_{50}$  αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση αναστολέα που απαιτείται για 50% αναστολή.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η  $IC_{50}$  του αναστολέα 11MS021 σε συγκεντρώσεις αναστολέα 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM και Glc-1-P στα 2mM



Εικόνα 18 :Διάγραμμα για τον υπολογισμό της σταθεράς  $IC_{50}=2.75 \pm 0.14$  mM του αναστολέα

Συγκρίνοντας τη σταθερά αναστολής της 11MS021 (2.75 mM) με την αντίστοιχη (7.9  $\mu$ M) της πρόδρομη ένωσης (αναστολέας που έχει την ίδια χημική δομή με την 11MS021 με υδροξύλιο στην 3' θέση της γλυκοπυρανόζης) (Manta et al, 2012) είναι φανερό πως η 11MS021 είναι πολύ πιο ασθενής αναστολέας. Συμπερασματικά, η μελέτη που πραγματοποιήθηκε έδειξε ότι ενώσεις στις οποίες η 3' υδροξυλική ομάδα της γλυκοπυρανόζης αντικαθίσταται από μία ομάδα όπως η αμινική (11MS021) η οποία μπορεί να δράσει μόνο ως δότης σε δεσμούς υδρογόνου και για τις οποίες έχει παρατηρηθεί σύνδεση στο καταλυτικό κέντρο δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόδρομες για το σχεδιασμό νέων ισχυρότερων αναστολέων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

<http://health.howstuffworks.com/diseases-conditions/diabetes/diabetes1.htm>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Diabetes\\_mellitus/](http://en.wikipedia.org/wiki/Diabetes_mellitus/)

[http://www.iatronet.gr/article.asp?art\\_id=1017](http://www.iatronet.gr/article.asp?art_id=1017)

<http://www.sanger.ac.uk/research/projects/metabolicdisease/>

<http://www.health.am/db/diabetes-pathophysiology/>

-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-( $\beta$ -Dglucopyranosyl)-4-phenyl-1,2,3-triazoleacetamide, an inhibitor of glycogen phosphorylase: comparison with  $\alpha$ -D-glucose, N-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosylamine and N-benzoyl-N'- $\beta$ -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.
- Chrysina E.D., Kosmopoulou, M.N., Tiraidis C., Kardakaris R., Bischler, N., Leonidas 103
- 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 Geneeskd*. 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 phosphorylase 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., 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-glucopyranosylureas 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 D60*, 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.