

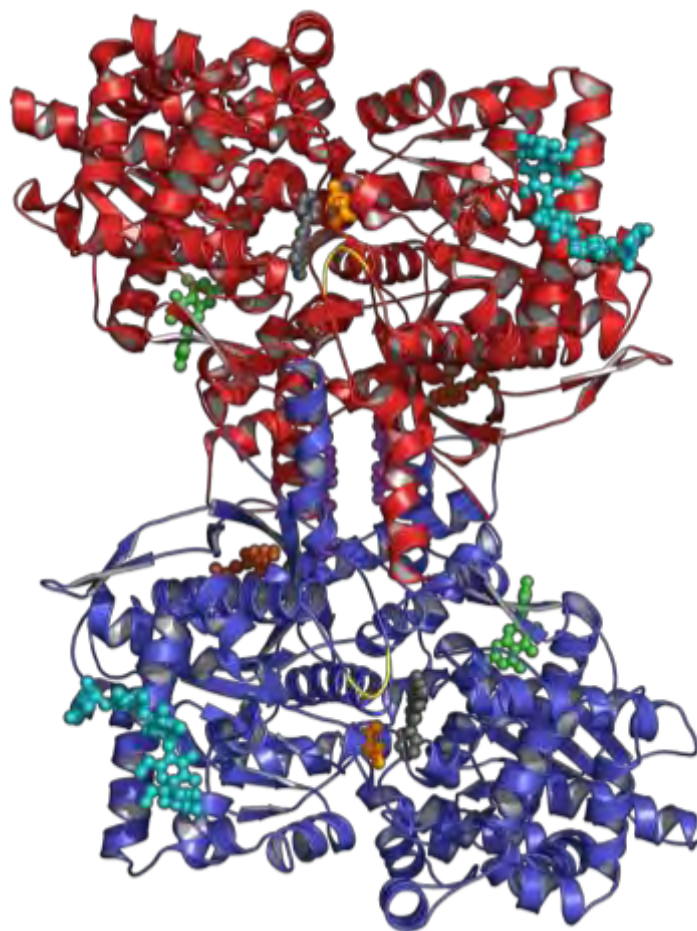


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

---

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ  
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ  
ΝΕΟΙ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ  
ΑΝΤΙΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

---



Κοκολάκη Μαρία  
Λάρισα 2016



## Διπλωματική εργασία

*Μελέτη αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως νέοι  
εν δυνάμει αντιπεργλυκαιμικοί παράγοντες*

---

*Study of glycogen phosphorylase inhibitors as new potential  
antihyperglycemic agents*

### Τριμελής επιτροπή

➤ Δρ Λεωνίδας Δ. Δημήτριος (επιβλέπων)

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Σχολής Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

➤ Δρ Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Σχολής Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

➤ Δρ Μπαλατσός Νικόλαος

Επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Σχολής Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα



# Περιεχόμενα

I. Περίληψη.....	7
II. Abstract.....	7
III. Ευχαριστίες.....	8
1. Σακχαρώδης διαβήτης.....	9
1.1. Γενικά.....	9
1.1.1. Ινσουλίνη : ρόλος, έκκριση και δράση.....	9
1.1.2. Είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα.....	10
1.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I.....	10
1.2.1. Υπεργλυκαιμία.....	11
1.2.2. Μεταβολική κετοξέωση.....	11
1.2.3. Διαχείριση του διαβήτη τύπου I.....	11
1.3. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II.....	12
1.3.1. Αντίσταση στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης.....	12
1.3.2. Διαχείριση του διαβήτη τύπου II.....	13
2. Γλυκογόνο: δομή, ρόλος, σύνθεση και αποικοδόμηση.....	14
2.1. Γενικά.....	14
2.2. Δομή γλυκογόνου.....	14
2.3. Πλεονεκτήματα γλυκογόνου.....	15
2.4. Σύνθεση του γλυκογόνου.....	15
2.5. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	17
2.6. Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου.....	18
3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	20
3.1. Γενικά.....	20
3.2. Δομή.....	20
3.3. Μηχανισμός δράσης.....	21
3.3.1. Φωσφορική πυριδοξάλη.....	22
3.4. Η φωσφορυλάση ως αλλοστερικό ένζυμο.....	23
3.5. Ομοιοπολική τροποποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	23
3.5.1. Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	24
3.6. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος φαρμάκων έναντι του διαβήτη τύπου II.....	25
4. Σκοπός.....	27
5. Υλικά και Μέθοδοι.....	28
5.1. Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου <i>b</i> από σκελετικούς μύες κουνελιών ποικιλίας <i>Oryctolagus cuniculus</i> .....	29
5.2. Απομόνωση της $\gamma$ -υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης μύος κουνελιού από βακτήρια ( <i>rmPhK-<math>\gamma</math>-trunc</i> ).....	32
5.2.1. Παρασκευή των θρεπτικών υλικών, καλλιέργεια των μετασχηματισμένων βακτηρίων και συλλογή του συνόλου των πρωτεϊνών των βακτηρίων.....	32
5.2.2. Καθαρισμός και απομόνωση του επιθυμητού ενζύμου από το σύνολο των πρωτεϊνών.....	35

5.3.Φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .....	42
5.4.Κινητικές μελέτες έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου <i>a</i> .....	43
5.4.1.Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος.....	44
5.4.2.Διαλύματα αναστολέων <i>KS461</i> και <i>KS510</i> .....	44
5.4.3.Παρασκευή διαλυμάτων υποστρώματος 1-φωσφορικής γλυκόζης.....	45
5.4.4.Πειραματική διαδικασία.....	46
5.4.5.Προσδιορισμός φωσφορικών .....	47
5.4.6.Προσδιορισμός της επιτυχίας της φωσφορυλίωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου <i>b</i> ( <i>rmGPb</i> ) από την $\gamma$ -υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης ( <i>rmPhK-<math>\gamma</math>-trunc</i> ) .....	48
5.4.7.Προσδιορισμός σταθεράς <i>Michaelis-Menten</i> ( $K_M$ ).....	48
5.4.8.Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής ( $K_i$ ) .....	50
5.4.8.1.Προσδιορισμός $K_i$ του αναστολέα <i>KS461</i> .....	50
5.4.8.2.Προσδιορισμός $K_i$ του αναστολέα <i>KS510</i> .....	51
6.Αποτελέσματα- Συζήτηση .....	52
6.1.Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου <i>b</i> από σκελετικούς μύες κουνελιών ποικιλίας <i>Oryctolagus cuniculus</i> .....	52
6.2.Απομόνωση της $\gamma$ -υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης μύος κουνελιού από βακτήρια ( <i>rmPhK-<math>\gamma</math>-trunc</i> ) .....	53
6.3.Φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου <i>rmGPb</i> από τη $\gamma$ -υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης ( <i>rmPhK-<math>\gamma</math>-trunc</i> ) .....	57
6.4.Προσδιορισμός της σταθεράς <i>Michaelis-Menten</i> .....	57
6.5.Προσδιορισμός της $K_i$ του αναστολέα <i>KS461</i> .....	59
6.6.Προσδιορισμός $K_i$ του αναστολέα <i>KS510</i> .....	60
6.7.Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων .....	61
7.Βιβλιογραφία.....	62

## I. Περίληψη

Σύμφωνα με τα τελευταία στοιχεία από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, εκτιμάται ότι 422 εκατομμύρια ενηλίκων ζουν με σακχαρώδη διαβήτη. Επομένως, αποτελεί βασική και επιτακτική ανάγκη η ανακάλυψη μιας αποτελεσματικής θεραπείας για την ασθένεια αυτή. Στο πλαίσιο της έρευνας του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μελέτη της αντι-υπεργλυκαιμικής δράσης δύο συνθετικών μορίων. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η ανασταλτική του δράση στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, ενός ενζύμου - κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και κατ' επέκταση της ρύθμισης των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Βασικό χαρακτηριστικό που μπορεί να καθορίσει τη δραστηριότητα ενός αναστολέα αποτελεί η σταθερά αναστολής  $K_i$ . Οι κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής πραγματοποιήθηκαν έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου  $a$ , που απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κονίκλων στη μορφή  $b$  ( $rmGPb$ ) και στη συνέχεια φωσφορυλιώθηκε από την καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης μυός κουνελιού, η οποία απομονώθηκε από μετασχηματισμένα βακτήρια. Οι δύο αναστολείς που μελετήθηκαν, είναι δύο συνθετικά μόρια, που συντέθηκαν ως πιθανοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αφού είναι ανάλογα της γλυκόζης και έχουν σχεδιαστεί σύμφωνα με την αρχιτεκτονική της τρισδιάστατης δομής του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου. Για τον αναστολέα  $KS461$  η τιμή της σταθεράς αναστολής ( $K_i$ ) προσδιορίστηκε στα  $2,1 \pm 0,18 \mu M$  και για τον αναστολέα  $KS510$  η τιμή της σταθεράς αναστολής ( $K_i$ ) προσδιορίστηκε στα  $0,98 \pm 0,04 \mu M$ .

## II. Abstract

According to the latest data from the World Health Organization, it is estimated that 422 million adults are living with diabetes. Therefore, the discovery of an effective treatment for this disease is an essential and imperative need. In this study, as a part of the research performed in the laboratory of Structural and Functional Biochemistry, the anti-hyperglycaemic action of two synthetic molecules was evaluated. In particular, the inhibitory potential of two compounds was assessed in glycogen phosphorylase ( $GP$ ).  $GP$  is the key-enzyme of glycogen metabolism and has an essential role in blood glucose homeostasis. A key feature that can determine the potency of an inhibitor is the inhibition constant  $K_i$ . The kinetic studies for determining the inhibition constant were performed using the muscle glycogen phosphorylase  $a$ , which was purified from rabbit muscles in the inactive form  $b$  ( $rmGPb$ ) which was then activated by phosphorylation by the catalytic  $\gamma$ -subunit of rabbit muscle phosphorylase kinase, produced by recombinant bacteria. Both inhibitors are molecules designed and synthesized as potential inhibitors of glycogen phosphorylase. They are glucose analogs and were designed according to the architecture of the three dimensional structure of the catalytic center of the enzyme. The inhibition constant ( $K_i$ ) of the inhibitor  $KS461$  was found  $2,1 \pm 0,18 \mu M$  and the inhibition constant ( $K_i$ ) of the inhibitor  $KS510$  was  $0,98 \pm 0,04 \mu M$ .

### **III. Ευχαριστίες**

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και της συγγραφής αυτής της εργασίας, υπήρξαν αρκετοί άνθρωποι οι οποίοι συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της, ο καθένας με το δικό του τρόπο. Θεωρώ απαραίτητο λοιπόν να αφιερώσω μερικές γραμμές σε αυτούς, ώστε να τους απευθύνω τις ευχαριστίες μου.

Ξεκινώντας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή βιοχημείας Δρ Δημήτριο Δ. Λεωνίδα υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποίησα την διπλωματική μου εργασία. Η επιστημονική γνώση, η υπομονή και καθοδήγηση που μου πρόσφερε, αποτέλεσαν βασικό παράγοντα για την ομαλή και ευχάριστη διεκπεραίωση της εργασίας αυτής. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για την προσφορά της συνεργασίας του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ακόμα, θερμές ευχαριστίες οφείλω να δώσω στον υποψήφιο διδάκτορα, Ευθύμιο Κυριάκη. Η συνεργασία μαζί του ήταν μεγάλη τιμή για μένα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την υπομονή του, την ψυχολογική ενθάρρυνση και την πρόθεση του να απαντήσει σε όλες τις ερωτήσεις μου. Με την βοήθεια του κατάφερα να οδηγηθώ στην επίτευξη του στόχου μου και να ανταπεξέλθω στις συνθήκες του εργαστηρίου που ήταν πρωτόγνωρες για εμένα.

Στην ομαλή ένταξη μου στο εργαστήριο βοήθησε και το ιδιαίτερα φιλικό και επαγγελματικό κλίμα που έχει δημιουργηθεί από όλους μέσα σε αυτό. Θα ήθελα, λοιπόν, να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας που ήταν πάντα πρόθυμα να απαντήσουν σε κάθε ερώτησή μου και έδειξαν την απαραίτητη υπομονή μέχρι την προσαρμογή και την ένταξη μου, ως νέο μέλος, σε αυτή την ομάδα.

Συνεχίζοντας δε μπορώ να μην αναφερθώ στην οικογένεια και τους φίλους μου. Είναι οι άνθρωποι στους οποίους οφείλω το πιο μεγάλο ευχαριστώ γιατί όποτε χρειάστηκε στάθηκαν δίπλα μου δίνοντας μου δύναμη καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και σε όλα τα χρόνια των προπτυχιακών σπουδών μου.



# 1.Σακχαρώδης διαβήτης

## 1.1. Γενικά

Ο σακχαρώδης διαβήτης (*Diabetes Mellitus*) αποτελεί την πιο κοινή μεταβολική ασθένεια στον κόσμο που έχει προσβάλλει και συνεχίζει να προσβάλλει καθημερινά εκατομμύρια ανθρώπους. Ο Αρεταίος, ένας γιατρός του 2ου μ.Χ. αιώνα από την Καππαδοκία, έδωσε μια πιο σαφή εικόνα για τον διαβήτη σε σχέση με τις μελέτες που είχαν ήδη γίνει. Για το λόγο αυτό, το όνομά του είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με αυτή τη νόσο. Ο ίδιος μάλιστα έδωσε σε αυτή τη μεταβολική ασθένεια το όνομα διαβήτης. Το όνομα διαβήτης προέκυψε από το ελληνικό ρήμα «διαβαίνω», το οποίο σημαίνει «περνάω, τρέχω μέσα από κάτι», θέλοντας να αποδώσει ένα από τα σημαντικότερα συμπτώματα του διαβήτη, την πολυουρία. Χαρακτηριστικά έγραψε «το επίθετο διαβήτης έχει αποδοθεί στη νόσο διότι μοιάζει σαν να περνάει νερό μέσα από σιφώνιο».[1,3]

Ο διαβήτης χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών, το οποίο προκύπτει από ελλιπή έκκριση ινσουλίνης ή από ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη [3]. Η χρόνια υπεργλυκαιμία, η οποία αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του σακχαρώδη διαβήτη, σχετίζεται με μακροχρόνια βλάβη, δυσλειτουργία και ανεπάρκεια διαφόρων οργάνων, όπως τα μάτια, οι νεφροί, τα νεύρα, η καρδιά και τα αιμοφόρα αγγεία. Τα συμπτώματα της υπεργλυκαιμίας περιλαμβάνουν πολυουρία, πολυδιψία, απώλεια βάρους και μερικές φορές πολυφαγία και θολή όραση.[2]

### 1.1.1. Ινσουλίνη: ρόλος, έκκριση και δράση

Η ινσουλίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Συντίθεται στα β-κύτταρα των παγκρεατικών νησίδων του *Langerhans* και μετά τη σύνθεση της εκκρίνεται στο αίμα όπου και έχει χρόνο ημιζωής έξι λεπτά. Μετά την έκκριση της στο αίμα, φτάνει στα κύτταρα στόχους μέσω της κυκλοφορίας όπου και συνδέεται στους κατάλληλους υποδοχείς. Η υπόλοιπη, υφίσταται κυρίως διάσπαση από το ένζυμο ινσουλινάση στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό, στους νεφρούς, στους μυς και σε άλλους ιστούς.

Η έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος επάγεται από την υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα. Η ινσουλίνη μετά την έκκριση και την πρόσδεση της στους υποδοχείς προκαλεί ταχεία πρόσληψη, εναποθήκευση και χρησιμοποίηση της γλυκόζης από όλους σχεδόν τους ιστούς του σώματος, αλλά ιδιαίτερα από τους μύες, τον λιπώδη ιστό και το ήπαρ.

Η δράση της ινσουλίνης επάγεται μέσω της σύνδεσής της σε έναν πρωτεϊνικό υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης. Μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα ακολουθεί μια σειρά από γεγονότα. Αρχικά όταν αναφερόμαστε στον υποδοχέα της ινσουλίνης μιλάμε για ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα με 4 υπομονάδες, δύο υπομονάδες που βρίσκονται εντελώς έξω από την κυτταρική μεμβράνη και δυο β-

υπομονάδες που διαπερνούν τη μεμβράνη και έχουν άκρα ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα, δηλαδή στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι α-υπομονάδες συνδέονται μεταξύ τους και με τις β- με δισουλφιδικούς δεσμούς. Με την πρόσδεση της ινσουλίνης στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, δηλαδή στις α-υπομονάδες, ξεκινάει η σηματοδότηση. Τα τμήματα των β-υπομονάδων που προεξέχουν προς το εσωτερικό του κυττάρου υφίστανται αυτοφωσφορυλίωση, αφού η δράση κινάσης τυροσίνης της μιας β-υπομονάδας ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει την άλλη. Με την αυτόφωσφορυλίωση ενεργοποιείται μια κινάση τυροσίνης που είναι συνδεδεμένη με τον υποδοχέα, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει άλλα ενδοκυτταρικά ένζυμα όπως τα υποστρώματα του υποδοχέα ινσουλίνης (*IRS*). Αυτό επιτρέπει την αλληλεπίδραση και με άλλες πρωτεΐνες με τελικό σκοπό την διέγερση της κίνησης των μεταφορέων της γλυκόζης *GLUT4* στην πλασματική μεμβράνη.[3,5]

### **1.1.2. Είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα**

Η είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα δεν είναι μια διαδικασία απλής διάχυσης, αλλά απαιτείται η συμμετοχή μιας πρωτεΐνης-μεταφορέα ώστε να διευκολυνθεί η κίνηση της γλυκόζης κατά μήκος της πλασματικής μεμβράνης ενός κυττάρου. Στα θηλαστικά, έχουν αναγνωρισθεί πέντε πρωτεΐνες ως μεταφορείς της γλυκόζης και έχουν ονομαστεί με το όνομα *GLUT* και αριθμό από το 1 έως το 5. Αν και αυτές οι πρωτεΐνες διευκολυνόμενης μεταφοράς της γλυκόζης έχουν δομικές ομοιότητες, τα μέλη της κάθε οικογένειας έχουν διαφορετική κατανομή στους ιστούς και διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς ώστε να μπορούν να ανταπεξέλθουν στις διαφορετικές απαιτήσεις κάθε ιστού. Οι μεταφορείς *GLUT4* βρίσκονται κατά κύριο λόγο στα ερυθροκύτταρα, στους μύες και το λιπώδη ιστό. Οι μεταφορείς *GLUT1* επίσης βρίσκονται στα ερυθροκύτταρα ενώ οι μεταφορείς *GLUT2* επάγουν κυρίως τη μεταφορά της γλυκόζης στα β-κύτταρα του παγκρέατος [6]. Η συντριπτική πλειοψηφία των μεταφορέων *GLUT4* βρίσκεται ενδοκυτταρικά. Μετά τη διέγερση του κυττάρου από την ινσουλίνη μέσω του υποδοχέα της ινσουλίνης που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη, ο *GLUT4* μεταφέρεται στην μεμβράνη ώστε να βοηθήσει τη γλυκόζη να εισέλθει στο κύτταρο. Στους σκελετικούς μύες, τόσο οι μεταφορείς *GLUT4* όσο και οι *GLUT1* μετατοπίζονται από το εσωτερικό του κυττάρου στην μεμβράνη σε απόκριση στην ινσουλίνη. Ωστόσο, η ινσουλινοεξαρτώμενη μετατόπιση του *GLUT4* είναι πολύ ευρύτερη σε σχέση με εκείνη του *GLUT1*. Παρόμοια αποτελέσματα με τη δράση της ινσουλίνης έχει και η άσκηση, αφού διεγείρει την μετατόπιση του *GLUT4* από το εσωτερικό του κυττάρου στην πλασματική μεμβράνη. Αφού μετατοπιστεί στην μεμβράνη μέσω μηχανισμού διευκολυνόμενης διάχυσης βοηθούν τη γλυκόζη να εισέλθει στο κύτταρο [3,5].

### **1.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I**

Ο σακχαρώδης διαβήτης διακρίνεται σε δύο γενικούς τύπους. Ο πρώτος προκύπτει λόγω της έλλειψης ινσουλίνης για αυτό και ονομάζεται ινσουλινοεξαρτώμενος. Συχνά καλείται και νεανικός σακχαρώδης διαβήτης, διότι η συνήθης ηλικία ανάπτυξης του είναι τα 14 χρόνια. Αυτό όμως έχει αλλάξει αφού έχει φανεί ότι η

ηλικία δεν παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνισή του [4]. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I αντιπροσωπεύει περίπου το 5% με 10% όλων των περιπτώσεων του διαβήτη. Η έλλειψη της ινσουλίνης μπορεί να προκληθεί από καταστροφή των β-κυττάρων των παγκρεατικών νησίδων του *Langerhans* ή από νόσους που περιορίζουν την σύνθεση της. Η καταστροφή των β-κυττάρων στους ασθενείς με διαβήτη τύπου I συνήθως οφείλεται σε ιογενείς λοιμώξεις ή σε αυτοάνοση διαταραχή. Σε μερικές περιπτώσεις υπάρχει κληρονομική προδιάθεση για εκφύλιση των β-κυττάρων ακόμα και χωρίς την παρουσία ιογενών λοιμώξεων ή αυτοάνοσων διαταραχών. Η ανεπάρκεια ινσουλίνης οδηγεί σε αύξηση της γλυκόζης του πλάσματος γεγονός που επηρεάζει τον οργανισμό σε πολλά σημεία.[3]

### **1.2.1. Υπεργλυκαιμία**

Η αύξηση της γλυκόζης στο αίμα είναι το βασικό χαρακτηριστικό του σακχαρώδους διαβήτη. Τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα προκαλούν το φαινόμενο της γλυκοζουρίας. Η αυξημένη γλυκόζη στα ούρα ενισχύει τη διήθησή της στα νεφρικά σωληνάκια σε επίπεδα μεγαλύτερα από αυτά που μπορούν να επαναρροφηθούν, με αποτέλεσμα η περίσσεια της γλυκόζης να αποβάλλεται με τα ούρα. Επίσης λόγω της αύξησης της γλυκόζης μπορεί να προκληθεί κυτταρική αφυδάτωση αφού λόγω αυξημένης οσμωτικής πίεσης και δυσκολίας της γλυκόζης να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, νερό εξέρχεται από τα κύτταρα. Η πολουρία αποτελεί κι αυτή ένα αποτέλεσμα αφυδάτωσης του οργανισμού αφού λόγω της αυξημένης γλυκόζης βλέπουμε μείωση της σωληναριακής επαναρρόφησης των υγρών στα νεφρά με αποτέλεσμα την απομάκρυνση τους με τα ούρα. Επομένως, η πολουρία, η εξωκυτταρική και ενδοκυτταρική αφυδάτωση και η πολυδιψία είναι κλασσικά συμπτώματα του σακχαρώδους διαβήτη. Επιπλέον, η χρόνια υπεργλυκαιμία προκαλεί ιστική βλάβη στους περισσότερους ιστούς όπως τα αιμοφόρα αγγεία και τα νεύρα.[3]

### **1.2.2. Μεταβολική κετοξέωση**

Η ενίσχυση του καταβολισμού των λιπών αυξάνει την απελευθέρωση των κετοοξέων στο πλάσμα ταχύτερα από το ρυθμό πρόσληψης και οξείδωσης τους από τα ιστικά κύτταρα. Ως αποτέλεσμα, οι ασθενείς αναπτύσσουν σοβαρή οξέωση λόγω της περίσσεια των κετοοξέων, η οποία σε συνδυασμό με την αφυδάτωση που οφείλεται σε υπέρμετρη παραγωγή ούρων μπορεί να προκαλέσει σοβαρή οξέωση. Αν αυτή η κατάσταση δεν αντιμετωπιστεί άμεσα με μεγάλες δόσεις ινσουλίνης, ο ασθενής εισέρχεται σε διαβητικό κώμα και καταλήγει.[3]

### **1.2.3. Διαχείριση του διαβήτη τύπου I**

Για τη διαχείριση του διαβήτη απαραίτητη κρίνεται η σωστή ενημέρωση και στήριξη του ασθενή αλλά και της οικογένειας. Επίσης απαραίτητη κρίνεται και η σωματική άσκηση αλλά και η απώλεια βάρους με σκοπό την παροχή βοήθειας στον οργανισμό να αντιμετωπίσει αυτό το μεταβολικό σύνδρομο. Βασική θεραπευτική αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου I αποτελεί η χορήγηση ινσουλίνης αφού βασικό αίτιο είναι η έλλειψη ινσουλίνης. Όμως, η χορήγηση ινσουλίνης δεν αποτελεί τη βέλτιστη

θεραπεία αφού η ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα με τη χορήγηση ινσουλίνης δεν μπορεί να συγκριθεί με τη φυσιολογική ρύθμιση από τα κύτταρα του παγκρέατος και επομένως υπάρχει κίνδυνος για παρενέργειες. Εξαιτίας αυτού, γεννήθηκε η ανάγκη για μια λύση πιο κοντά στο φυσιολογικό. Η επιλογή της μεταμόσχευσης του παγκρέατος ή των νησίδων των β-κυττάρων δεν ήταν μια καλή επιλογή αφού οι μεταμοσχεύσεις συνοδεύονται από πολλά προβλήματα. Λύση σε αυτά τα προβλήματα θα μπορούσε να δώσει η χρήση βλαστικών κυττάρων και συγκεκριμένα μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων με σκοπό την αναγέννηση των β-κυττάρων του παγκρέατος.[3,9]

### ***1.3. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II***

Αυτή η μορφή διαβήτη, η οποία αντιπροσωπεύει το 90-95% των ατόμων με διαβήτη, οφείλεται σε ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης (αντίσταση στην ινσουλίνη). Η νόσος αυτή αποκαλείται και σακχαρώδης διαβήτης της ενηλικίωσης διότι στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζεται στην ηλικία των 30 και αρκετά συχνά στην ηλικία των 50 ή 60, έχοντας σταδιακή εξέλιξη. Τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της αύξησης του ποσοστού της παχυσαρκίας, έχουμε αύξηση της εμφάνισης της νόσου σε μικρότερες ηλικίες. Παρά το γεγονός ότι ο τρόπος ζωής και η υπερκατανάλωση τροφής φαίνεται να αποτελούν τους παθογόνους παράγοντες ενεργοποίησης της ασθένειας, γενετικά στοιχεία εμπλέκονται επίσης στην παθογένεση του διαβήτη τύπου II. Θετικό οικογενειακό ιστορικό προδιαθέτει για 2 με 4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο για παρουσίαση διαβήτη τύπου II. [3,7]

#### ***1.3.1. Αντίσταση στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης***

Τα φυσιολογικά β-κύτταρα του παγκρέατος προσαρμόζονται στις αλλαγές της δράσης της ινσουλίνης στον ιστό. Μία μείωση της δράσης της ινσουλίνης θα οδηγήσει τα β κύτταρα να αυξήσουν την έκκριση της ινσουλίνης και το αντίστροφο[7]. Επομένως σε περίπτωση αντίστασης στην ινσουλίνη έχουμε αύξηση της συγκέντρωσης της ινσουλίνης στο αίμα, μια κατάσταση γνωστή ως υπερινσουλιναιμία. Κατ' επέκταση, η δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος είναι ένα κρίσιμο στοιχείο της παθογένειας του διαβήτη τύπου II. Όπως αναφέρθηκε, όταν η δράση της ινσουλίνης μειώνεται (όπως με την αύξηση της παχυσαρκίας) το σύστημα συνήθως αντισταθμίζει αυτή τη μείωση με την αύξηση της δραστηριότητας των β-κυττάρων. Ωστόσο, την ίδια στιγμή, σε περίοδο νηστείας αλλά και 2 ώρες μετά τη νηστεία, η συγκέντρωση της γλυκόζης θα παρουσιάσει μέτρια αύξηση. Αυτή η αύξηση μπορεί να είναι μικρή, αλλά με την πάροδο του χρόνου καθίσταται επιζήμια για τον οργανισμό και η ίδια η γλυκόζη αποτελεί αιτία της δυσλειτουργίας των β-κυττάρων.[3,7]

Η αντίσταση στην ινσουλίνη οφείλεται κυρίως στην παχυσαρκία και στην εναπόθεση λίπους στα εσωτερικά όργανα. Επίσης, άλλες μεταβολικές δυσλειτουργίες όπως η περίσσεια γλυκοκορτικοειδών, αυξητικής ορμόνης και το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών μπορούν να επιφέρουν το ίδιο αποτέλεσμα. Σε μοριακό και

κυτταρικό επίπεδο, μεταλλάξεις στον υποδοχέα της ινσουλίνης αλλά και σε άλλα μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού που ακολουθεί την ενεργοποίηση του υποδοχέα, έχουν ως αποτέλεσμα την μειωμένη ανταπόκριση στην δράση της ινσουλίνης.[3,7]

### ***1.3.2. Διαχείριση του διαβήτη τύπου II***

Όπως και στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, η σωστή ενημέρωση και στήριξη αποτελούν τη βασική αρχή για την αντιμετώπιση του. Εκτός από αυτό βέβαια, για το λόγο ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην παθογένεια του διαβήτη, οι φαρμακευτικές παρεμβάσεις για την αντιμετώπιση του θα πρέπει αρχικά να στοχεύουν στη βελτίωση της ευαισθησίας των ιστών στην ινσουλίνη. Αρχικά βήματα για την επίτευξη αυτού του στόχου αποτελούν οι παρεμβάσεις στον τρόπο ζωής κάτι που ισχύει και στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου I. Με μέτρια άσκηση και απώλεια βάρους μειώνεται σαφώς ο κίνδυνος εξέλιξης της διαταραγμένης αντίστασης στην ινσουλίνη σε έκδηλο σακχαρώδη διαβήτη και μπορεί να βελτιώσει πολλές από τις ακόλουθες επιπτώσεις αυτού του μεταβολικού συνδρόμου. Όμως, η φαρμακευτική αγωγή αποτελεί ένα βασικό βήμα ειδικά σε πιο προχωρημένα στάδια του διαβήτη. Η χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης είναι το πρώτο βήμα. Η επαρκής διαθεσιμότητα ινσουλίνης είναι ουσιώδης για την βέλτιστη δράση των υπόλοιπων φαρμάκων, ενώ επίσης μπορεί να έχει και σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις στη μείωση των φλεγμονών και ειδικά στο αγγειακό σύστημα [7]. Παραδείγματα φαρμακευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για την διαχείριση του διαβήτη τύπου II είναι η σουλφονουλουρία και η μεταφορμίνη οι οποίες έχουν ως στόχο την ενίσχυση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη, μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα αλλά και την μείωση των επακόλουθων προβλημάτων στα οποία οδηγεί ο διαβήτης [8]. Πρόσφατες προσπάθειες γίνονται για τη στόχευση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II με τη χρήση αναστολέων του ενζύμου αυτού για το οποίο θα γίνει λόγος παρακάτω.

## 2. Γλυκογόνο: δομή, ρόλος, σύνθεση και αποικοδόμηση

### 2.1. Γενικά

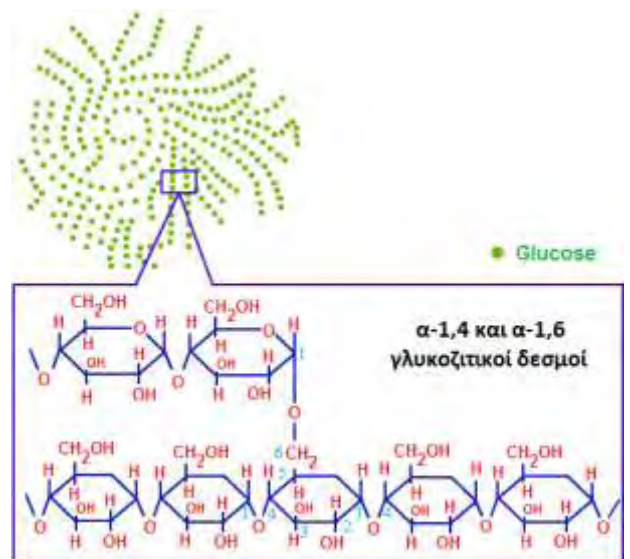
Το γλυκογόνο είναι μια άμεση κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Είναι ένα πολύ μεγάλο, διακλαδισμένο πολυμέρες καταλοίπων γλυκόζης, το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει γλυκόζη όταν απαιτείται ενέργεια. Η γλυκόζη αποτελεί ένα σημαντικό και κοινό καύσιμο για τους οργανισμούς και συγκεκριμένα στα θηλαστικά αποτελεί το μοναδικό καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος κάτω από συνθήκες ανεπάρκειας τροφής και το μοναδικό που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε οποιαδήποτε περίπτωση. Μέσω της γλυκολυτικής πορείας, δηλαδή του μεταβολισμού της γλυκόζης παράγεται ενέργεια για τον οργανισμό[10].

Οι δυο κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου στον οργανισμό είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ σε σχέση με του μύες (10% w/w και 2% w/w αντίστοιχα). Το γλυκογόνο βρίσκεται στο κυτοσόλιο των κυττάρων με τη μορφή κοκκίων. Στους σκελετικούς μύς, τα κοκκία που περιέχουν γλυκογόνο έχουν διάμετρο 10-44 nm, ενώ στο ήπαρ περίπου 110-290 nm[11]. Το γλυκογόνο μέσα στα κύτταρα μπορεί να προσδιοριστεί με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Στο ήπαρ η σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού. Αντίθετα, στους μύς οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών μόνο[10].

### 2.2. Δομή γλυκογόνου

Στις γραμμικές αλυσίδες γλυκογόνου τα κατάλοιπα γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4. Οι διακλαδώσεις που σχηματίζονται περίπου σε κάθε δέκατο κατάλοιπο γλυκόζης σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6. Οι διακλαδώσεις εντός των γραμμικών αλυσίδων γλυκογόνου διανέμονται σε σταθερά διαστήματα με αποτέλεσμα μια δομή με σφαιρικό σχήμα[11].



**Εικόνα 1:** Πάνω μέρος: η σφαιρική δομή του γλυκογόνου λόγω της ύπαρξης των διακλαδώσεων. Κάτω μέρος: φαίνονται οι α-1,4 γλυκοζιτικοί δεσμοί των γραμμικών αλυσίδων και ένας α-1,6 γλυκοζιτικός δεσμός στη διακλάδωση.

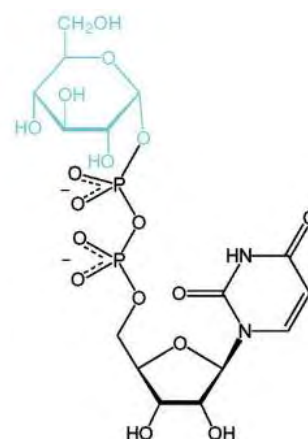
### 2.3. Πλεονεκτήματα του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο αποτελεί ένα πολύ σημαντικό απόθεμα καυσίμων μορίων και κατ' επέκταση ενέργειας για τον οργανισμό. Παρόλο που δεν είναι τόσο πλούσιο σε ενέργεια όσο τα λιπαρά οξέα, τα ζώα αποθηκεύουν έστω και μια μικρή ποσότητα της περίσσειας καυσίμων με τη μορφή του γλυκογόνου. Αυτό αποκαλύπτει σημαντικούς ρόλους του γλυκογόνου ως απόθεμα καυσίμων μορίων.

Αρχικά, το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση της γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Ο ρόλος αυτός του γλυκογόνου είναι ιδιαίτερα σημαντικός διότι η γλυκόζη είναι ουσιαστικά το μόνο καύσιμο από τον εγκέφαλο, εκτός από την περίπτωση παρατεταμένης αστίας. Επιπλέον, η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Τέλος, σε αντίθεση με τα λιπαρά οξέα, η απελευθερούμενη γλυκόζη μπορεί να προμηθεύει ενέργεια απουσία οξυγόνου και έτσι μπορεί να τροφοδοτεί με ενέργεια αναερόβιες δραστηριότητες.[10]

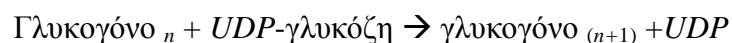
### 2.4. Σύνθεση του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο συντίθεται από το ένζυμο που ονομάζεται συνθάση του γλυκογόνου χρησιμοποιώντας την ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (*UDP-γλυκόζη*) ως ενεργοποιημένο δότη γλυκόζης. Το ένζυμο αυτό της σύνθεσης του γλυκογόνου αποτελεί ένα καθοριστικό ρυθμιστικό ένζυμο της σύνθεσής του. Ο άνθρακας C-1 της γλυκοζιτικής μονάδας στη *UDP-γλυκόζη* είναι ενεργοποιημένος διότι το υδροξύλιο του είναι εστεροποιημένο με τη μονάδα διφωσφορικού της *UDP* (διφωσφορική ουριδίνη)[10,11].

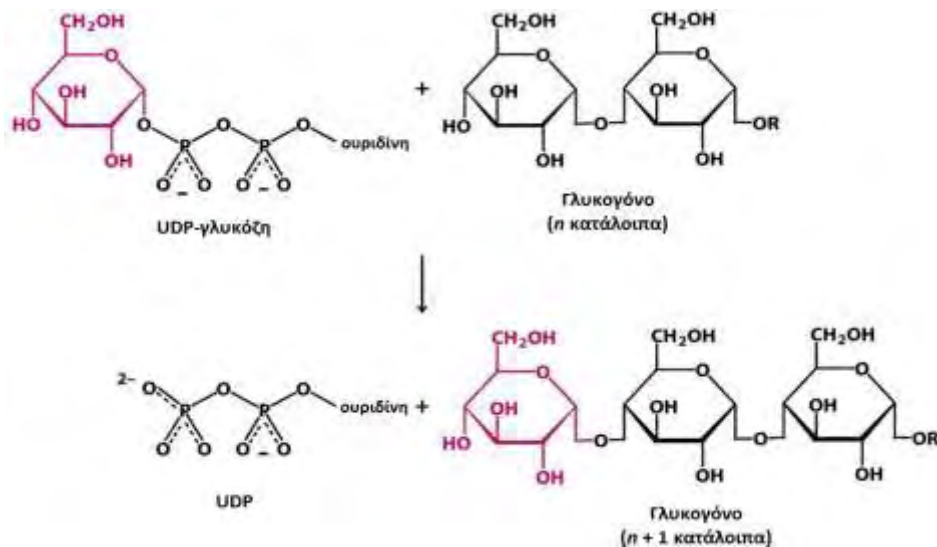


**Εικόνα 2:** Δομή της ουριδινοδιφωσφορικής γλυκόζης

Η αντίδραση που καταλύει η συνθάση του γλυκογόνου είναι η εξής:



Πιο αναλυτικά, νέες γλυκοζυτικές ομάδες προστίθενται στα κατάλοιπα των μη αναγωγικών άκρων του γλυκογόνου. Η ενεργοποιημένη γλυκοζυτική μονάδα της *UDP-γλυκόζης* μεταφέρεται στο υδροξύλιο του C-4 ενός άκρου του γλυκογόνου προς σχηματισμό ενός γλυκοζιτικού δεσμού α-1,4. Κατά την επιμήκυνση, η *UDP* αντικαθίσταται από την τελική υδροξυλική ομάδα του αυξανόμενου μορίου του γλυκογόνου[10,11].



**Εικόνα 3:** Η σύνθεση του γραμμικού μορίου του γλυκογόνου πραγματοποιείται με τη μεταφορά της γλυκοζυτικής μονάδας της UDP-γλυκόζης στο υδροξύλιο του C-4 του καταλοίπου γλυκόζης στο άκρο της αλυσίδας του γλυκογόνου και το σχηματισμό ενός α-1,4 γλυκοζιτικού δεσμού

Η συνθάση του γλυκογόνου μπορεί να προσθέσει κατάλοιπα γλυκόζης μόνον εάν η πολυσακχαρική αλυσίδα αποτελείται ήδη από περισσότερα από τέσσερα κατάλοιπα. Για το λόγο αυτό η σύνθεση του γλυκογόνου χρειάζεται ένα εκκινητή. Η γλυκογονίνη, που παίζει το ρόλο του εκκινητή, είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από δυο πανομοιότυπες υπομονάδες 37 kD η οποία παρέχει στη συνθάση του γλυκογόνου τους ολιγοσακχαρίτες που απαιτούνται ώστε να συνεχίσει να επεκτείνει το μόριο του γλυκογόνου[10,11].

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο §2.2 το μόριο του γλυκογόνου αποτελείται από διακλαδώσεις που σχηματίζονται με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6. Η ύπαρξη αυτών των διακλαδώσεων είναι σημαντική για δύο λόγους. Αρχικά με τη δημιουργία και την αύξηση των διακλαδώσεων αυξάνεται η διαλυτότητα του γλυκογόνου. Επιπλέον, ο σχηματισμός διακλαδώσεων αυξάνει τον ρυθμό σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου αφού δημιουργείται ένας μεγάλος αριθμός τελικών καταλοίπων, τα οποία είναι θέσεις δράσης της φωσφορυλάσης και της συνθάσης το γλυκογόνου[10].

Ο σχηματισμός των διακλαδώσεων στο γλυκογόνο πραγματοποιείται με τη δράση μιας μεταφοράσης, διότι η συνθάση του γλυκογόνου καταλύει το σχηματισμό μόνο α-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών. Το ένζυμο αυτό του σχηματισμού των διακλαδώσεων δρα μέσω της μεταφοράς μια αλυσίδας μορίων γλυκόζης από μια σύνδεση με δεσμό α-1,4 σε ένα κατάλοιπο ασπαραγινικού του ενζύμου και στη συνέχεια από τη θέση αυτή σε μια πιο εσωτερική στο μόριο του γλυκογόνου προς σχηματισμό ενός δεσμού α-1,6. Μια ομάδα καταλοίπων ενωμένων μεταξύ τους, συνήθως επτά στον αριθμό, μεταφέρεται σε μια πιο εσωτερική θέση. Κατά το σχηματισμό της διακλάδωσης ένας δεσμός α-1,4 διασπάτε και δημιουργείται ένα α-1,6. Η ομάδα των επτά ή περισσότερων καταλοίπων πρέπει να περιλαμβάνει το μη αναγωγικό άκρο και να προέρχεται από μια αλυσίδα μήκους τουλάχιστον έντεκα καταλοίπων. Επιπλέον το σημείο διακλάδωσης πρέπει να απέχει τουλάχιστον τέσσερα κατάλοιπα από ένα προϋπάρχον. Αυτά δείχνουν ότι το ένζυμο σχηματισμού διακλαδώσεων που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι μεγάλης ακρίβειας.[10,11]



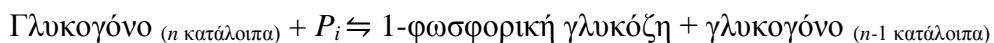
## 2.5. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο αποτελεί ένα πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης που έχει ως ρόλο την αποθήκευση της γλυκόζης και την απελευθέρωση της στον οργανισμό σε περίπτωση ανάγκης. Για την παροχή της γλυκόζης στον οργανισμό απαιτείται η αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου προκύπτει 1-φωσφορική γλυκόζη, η οποία με τη δράση του ενζύμου φωσφογλυκομουτάση μετατρέπεται γρήγορα σε 6-φωσφορική γλυκόζη που αποτελεί μεταβολικό ενδιάμεσο της γλυκόλυσης. Έτσι, η 6-φωσφορική γλυκόζη στους μύες εισέρχεται στην γλυκολυτική πορεία με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας ενώ στο ήπαρ μετατρέπεται σε ελεύθερη γλυκόζη από την φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του οργανισμού.[10]

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου λαμβάνει χώρα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων.[11] Για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου απαιτούνται τέσσερις ενζυμικές δράσεις:

- μια που αποικοδομεί το γλυκογόνο,
- δύο που ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο ώστε να παραμένει ένα υπόστρωμα για αποικοδόμηση και
- μια που μετατρέπει το προϊόν του καταβολισμού σε μια μορφή κατάλληλη για περαιτέρω μεταβολισμό.

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου πραγματοποιείται από το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η οποία διασπά το γλυκογόνο με την προσθήκη ορθοφωσφορικής ομάδας ( $P_i$ ) προς παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης.



Η διάσπαση αυτή του δεσμού με τη προσθήκη της ορθοφωσφορικής ομάδας αναφέρεται ως φωσφορόλυση. Η φωσφορόλυση είναι ένας ενεργειακά καλύτερος τρόπος για τη διάσπαση του γλυκογόνου σε σχέση με μια υδρολυτική διάσπαση. Με τη φωσφορόλυση, η απελευθερούμενη γλυκόζη είναι ήδη φωσφορυλιωμένη και με τη δράση μιας ισομεράσης μετατρέπεται στη κατάλληλη μορφή για την είσοδο στην γλυκολυτική πορεία. Αντίθετα, αν το απελευθερούμενο σάκχαρο δεν ήταν φωσφορυλιωμένο θα απαιτούνταν η κατανάλωση  $ATP$  για να φωσφορυλιωθεί. Επιπλέον, με την παρουσία τη φωσφορικής ομάδας, το μόριο της γλυκόζης είναι φορτισμένο αρνητικά και έτσι δεν μπορεί να διαχυθεί έξω από το κύτταρο.

Όμως, το γλυκογόνο δεν είναι ένα γραμμικό μόριο καταλοίπων γλυκόζης αλλά έχει και πολλές διακλαδώσεις. Οι διακλαδώσεις αυτές αποτελούν εμπόδιο για την φωσφορυλάση η οποία δεν μπορεί να συνεχίσει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, αφού οι γλυκοζιτικοί δεσμοί  $\alpha$ -1,6 της διακλάδωσης δεν διασπώνται από αυτήν. Όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο της διακλάδωσης σταματά. Για το λόγο αυτό απαιτούνται ενζυμικές δράσεις που να ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο ώστε να μπορεί να συνεχίσει να αποικοδομείται.[11]

Οι δραστηριότητες μεταφοράς και γλυκοζιτάσης δεσμού  $\alpha$ -1,6 είναι αυτές που απαιτούνται. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι δραστηριότητες αυτές

συνυπάρχουν σε μια πρωτεΐνη και ο γενετικός τόπος που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αυτή χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 1. Η μεταφορά μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη. Αυτή η μεταφορά αφήνει εκτεθειμένο ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6. Η γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6, γνωστή αλλιώς ως το ένζυμο αποδιακλάδωσης, υδρολύει το γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης. Αυτό το ελεύθερο μόριο γλυκόζης φωσφορυλιώνεται με το γλυκολυτικό ένζυμο, εξοκινάση.[10,11]

## **2.6. Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου**

Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου είναι απαραίτητο να ρυθμίζεται με μεγάλη ακρίβεια λόγω της μεγάλης σημασίας που έχει για τον οργανισμό. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί το βασικό σημείο ελέγχου του καταβολισμού του γλυκογόνου. Όμως και η συνθάση του γλυκογόνου παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης του γλυκογόνου. Και τα δύο ένζυμα υπόκεινται σε ορμονική ρύθμιση με τη μεσολάβηση και άλλων ενζύμων.

Η πρωτεϊνική κινάση A ενεργοποιεί με φωσφορυλίωση την κινάση της φωσφορυλάσης, η οποία με τη σειρά της με φωσφορυλίωση ενεργοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A, του πρώτου βήματος αυτής της ενζυμικής ενεργοποίησης, επάγουν οι ορμόνες επινεφρίνη και γλυκαγόνη. Αυτό συνεπάγεται με το ότι αυτές οι ορμόνες τελικά επηρεάζουν την αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Αντίθετα, η ινσουλίνη αναστέλλει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 και επάγει τη σύνθεση του, ενεργοποιώντας τη συνθάση του γλυκογόνου.

### Ινσουλίνη

Όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι υψηλά, η έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας αυξάνεται. Αυτή με τη σειρά της, διεγείρει τη σύνθεση του γλυκογόνου, διεγείροντας μια πορεία προς την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1. Η πρωτεϊνική φωσφατάση 1 όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο §3.5. καταλύει την αποφωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η οποία απενεργοποιείται. Εκτός από αυτήν την αντίδραση καταλύει και την αποφωσφορυλίωση της συνθάσης του γλυκογόνου, ενεργοποιώντας την, αλλά και την αποφωσφορυλίωση της κινάσης της φωσφορυλάσης απενεργοποιώντας την. Αυτά όλα οδηγούν στη αύξηση της σύνθεσης του γλυκογόνου και στη μείωση της αποικοδόμησης του, με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της γλυκόζης στο αίμα[10].

### Επινεφρίνη

Η επινεφρίνη (αδρεναλίνη) είναι μια ορμόνη της οικογένειας των κατεχολαμινών και εκκρίνεται από το μυελό των επινεφριδίων. Η επινεφρίνη διεγείρει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου με πιο έντονη επίδραση στους μύες από ότι στο ήπαρ. Η επινεφρίνη προσδέεται στον *GPCR* υποδοχέα της, τον αδρενεργικό υποδοχέα β στους μύες στην επιφάνεια του κυττάρου, και ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι όπου μέσω του κυκλικού *AMP* ενεργοποιείται η πρωτεϊνική κινάση A. Αυτή με τη σειρά της,

ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης όπου με φωσφορυλίωση στη *Ser-14* ενεργοποιεί την φωσφορυλάση με αποτέλεσμα την διέγερση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου. Επίσης, η ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση A με φωσφορυλίωση απενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου με αποτέλεσμα τη μείωση της σύνθεσης του γλυκογόνου. Τελικό επακόλουθο της δράσης την επινεφρίνης είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης[10].

### Γλυκαγόνη

Και η γλυκαγόνη διεγείρει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου αλλά δρα σε μεγαλύτερο βαθμό στο ήπαρ σε αντίθεση με την επινεφρίνη. Η γλυκαγόνη είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα α του παγκρέατος όταν η συγκέντρωση του σακχάρου στο αίμα είναι χαμηλή. Μέσω του υποδοχέα της, τον υποδοχέα της γλυκαγόνης, έναν *GPCR* υποδοχέα, ενεργοποιεί ένα μονοπάτι το οποίο μέσω του κυκλικού *AMP* έχει ακριβώς την ίδια δράση με το μονοπάτι που ενεργοποιεί η επινεφρίνη, την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης κι αυτή τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Τέλος, και η γλυκαγόνη όπως και η επινεφρίνη, με την ενεργοποίηση του ίδιου μονοπατιού απενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου με αποτέλεσμα την μείωση της σύνθεσης του γλυκογόνου. Η αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης είναι τελικό αποτέλεσμα της δράσης και αυτής της ορμόνης.[10]

## 3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

### 3.1. Γενικά

Καθοριστικό ένζυμο του καταβολισμού του γλυκογόνου είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*; *EC* 2.4.1.1.), η οποία διασπά το γλυκογόνο με την προσθήκη ορθοφωσφορικού (*P<sub>i</sub>*), δηλαδή μια αντίδραση φωσφορόλυσης με αποτέλεσμα την παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης.



Υπάρχουν τρεις ισομορφές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στα θηλαστικά που πήραν το όνομα τους από τον ιστό που εκφράζονται. Οι τρεις αυτές ισομορφές είναι οι εξής:[12]

- > Φωσφορυλάση του γλυκογόνου του ήπατος
- > Φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών
- > Φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου

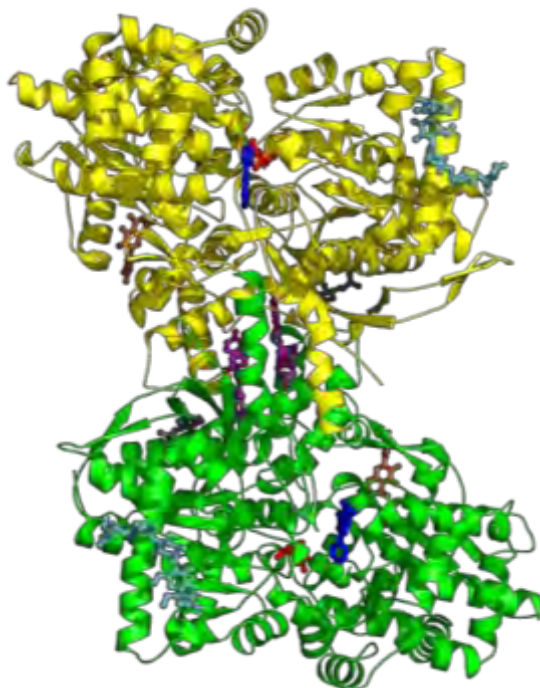
Κάθε ισομορφή έχει ένα ξεχωριστό φυσιολογικό ρόλο στον οργανισμό. Η ισομορφή των μυών παρέχει ενέργεια για τη σύσπαση των μυών μέσω της παραγωγής *ATP* από τη γλυκόζη. Η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει στον εγκέφαλο ενέργεια σε περιπτώσεις ανάγκης όπως σε περιπτώσεις εγκεφαλικής ανοξίας ή σοβαρής υπογλυκαιμίας. Τέλος, η ισομορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στο ήπαρ ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης στο αίμα από τα αποθέματα γλυκογόνου στο ήπαρ. Υπάρχει υψηλός βαθμός ομολογίας μεταξύ αυτών των τριών ισομορφών, και ιδιαίτερος σε κατάλοιπα κοντά στα καταλυτικά και τα αλλοστερικά κέντρα, με ομοιότητα των ακολουθιών γύρω στο 80% μεταξύ των ανθρώπινων ισομορφών.[13]

### 3.2. Δομή

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ομοδιμερές που αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες μοριακού βάρους 97 *kD* η κάθε μία. Το ένζυμο είναι δραστικό μόνο ως διμερές [15]. Περιέχει επίσης, ως συνένζυμο, τη φωσφορική πυριδοξάλη που αποτελεί βασικό παράγοντα της λειτουργίας της.

Κάθε υπομονάδα αποτελείται από δύο περιοχές, την αμινο-τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή. Η αμινο-τελική περιοχή αποτελεί και τη μεγαλύτερη περιοχή κάθε υπομονάδας. Περιέχει διάφορες ρυθμιστικές περιοχές. Η Ser-14 που είναι μία από αυτές, βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων 5 και 22 του ενζύμου και μπορεί να τροποποιηθεί με φωσφορυλίωση. Ανάλογα με την κατάσταση της φωσφορυλίωσης, η φωσφορυλάση αλλάζει διαμόρφωση. Μια ακόμα ρυθμιστική περιοχή του αμινο-τελικού μέρους κάθε υπομονάδας είναι η θέση αλλοστερικής ρύθμισης. Σε αυτή τη θέση δεσμεύεται η *AMP* και διάφοροι άλλοι προσδέτες όπως η 6-φωσφορική γλυκόζη, η *ATP* και η 1-φωσφορική φρουκτόζη. Τέλος, στην αμινο-τελική περιοχή έχουμε τη θέση αποθήκευσης του γλυκογόνου και το κέντρο αναστολής. Στη καρβοξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας είναι δεσμευμένη η φωσφορική

πυριδοξάλη στην *Lys680* με μια βάση *Schiff* μέσω της αλδεϋδικής της ομάδας. Η φωσφορική πυριδοξάλη βρίσκεται δίπλα στο ενεργό κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μια βαθιά σχισμή με μήκος 15Å και σχηματίζεται με κατάλοιπα και από τις αμινοτελικές και από τις καρβοξυ-τελικές δομικές περιοχές. Το ενεργό κέντρο καλύπτεται από μία κινητή πύλη που σχηματίζεται από κατάλοιπα της αμινο-τελικής περιοχής (βρόχος 280s). Στην επιφάνεια του ενζύμου και στην αρχή του καναλιού για το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το κέντρο αναστολής. Τέλος, η θέση πρόσδεσης του ινδολίου βρίσκεται κοντά στο κέντρο του ενζύμου δηλαδή κοντά στη σύνδεση με την άλλη υπομονάδα.

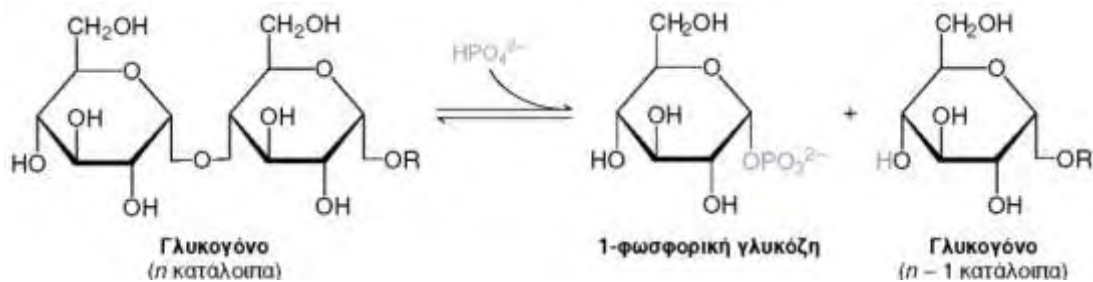


**Εικόνα 4:** Το διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Φαίνονται όλες οι θέσεις πρόσδεσης. Γαλάζιο: θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου. Μπλε: κέντρο αναστολής. Κόκκινο: καταλυτικό κέντρο. Μοβ: νέο αλλοστερικό κέντρο. Γκρι: αλλοστερικό κέντρο. Καφέ: θέση πρόσδεσης κερσετίνης.

Συνοψίζοντας, κάθε υπομονάδα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχει έξι διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης: το καταλυτικό, το αλλοστερικό, το νέο αλλοστερικό που είναι η θέση πρόσδεσης του ινδολίου, το κέντρο αναστολής, τη θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου[12,14,15] και μια θέση πρόσδεσης που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, τη θέση πρόσδεσης της κερσετίνης[23].

### 3.3. Μηχανισμός δράσης

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου. Τα κατάλοιπα της γλυκόζης των γραμμικών τμημάτων του μορίου του γλυκογόνου είναι ενωμένα μεταξύ τους με γλυκοζιτικό δεσμό. Ο δεσμός αυτός μεταξύ του άνθρακα C-1 του τελικού καταλοίπου και του άνθρακα C-4 του γειτονικού διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν[10].



**Εικόνα 5:** η αντίδραση φωσφορόλυσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου όπου το ορθοφωσφορικό ιόν διασπά τον α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό στο άκρο του γλυκογόνου και προκύπτει η 1-φωσφορική γλυκόζη και το γλυκογόνο με ένα λιγότερο κατάλοιπο γλυκόζης

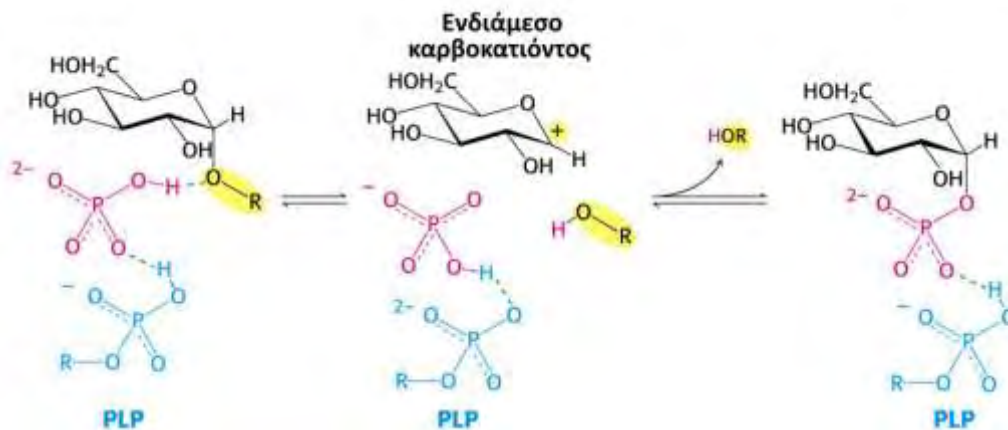
### 3.3.1. Φωσφορική πυριδοξάλη

Η φωσφορική πυριδοξάλη είναι απαραίτητη για το καταλυτικό μηχανισμό της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, δηλαδή τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο του ενζύμου δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της φωσφορικής πυριδοξάλης στη διεκπεραίωση της αντίδρασης. Η φωσφορυλάση έχει ως στόχο να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά και όχι με υδρόλυση με σκοπό την εξοικονόμηση ενέργειας από την φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης που θα απελευθερωθεί. Για το λόγο αυτό πρέπει να αποκλειστεί η είσοδος του νερού στο καταλυτικό κέντρο. Η φωσφορική πυριδοξάλη αποτελεί μια ένδειξη για τον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου. Μια πρώτη ένδειξη είναι η εξής. Το γλυκογόνο αλλά και το προϊόν της αντίδρασης, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Μια άμεση προσβολή της φωσφορικής ομάδας στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωσή του άνθρακα αυτού. Η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β κάτι που δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν (οξοκαρβονιόν)[10].

Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) από την άλλη αποτελεί ένα παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6). Η αλδεϋδική ομάδα του συνενζύμου αυτού σχηματίζει μια βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα της Lys680. Η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μια θέση μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό ιόν, λειτουργώντας ως δότης πρωτονίων και στη συνέχεια ως δέκτης, δηλαδή ως ένας γενικός οξοβασικός καταλύτης.

Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται ο μηχανισμός κατάλυσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Το ορθοφωσφορικό ιόν με τη μορφή  $HPO_4^{2-}$  (κόκκινο) που είναι προσδεμένο στην φωσφορική πυριδοξάλη (μπλε) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού, δίνοντας ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο, που είναι συνδεδεμένο στον άνθρακα 4 της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου (μαύρο). Κατά τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού, η αποχωρούσα γλυκόζη αποκτά ένα πρωτόνιο. Η αντίδραση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό ενός ενδιάμεσου καρβοκατιόντος. Το ενδιάμεσο αυτό καρβοκατιόν προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό ιόν, ένα βήμα που έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης,

με την επακόλουθη επιστροφή ενός ατόμου υδρογόνου στη φωσφορική πυριδοξάλη [10].



**Εικόνα 6:** Μηχανισμός κατάλυσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

### 3.4. Η φωσφορυλάση ως αλλοστερικό ένζυμο

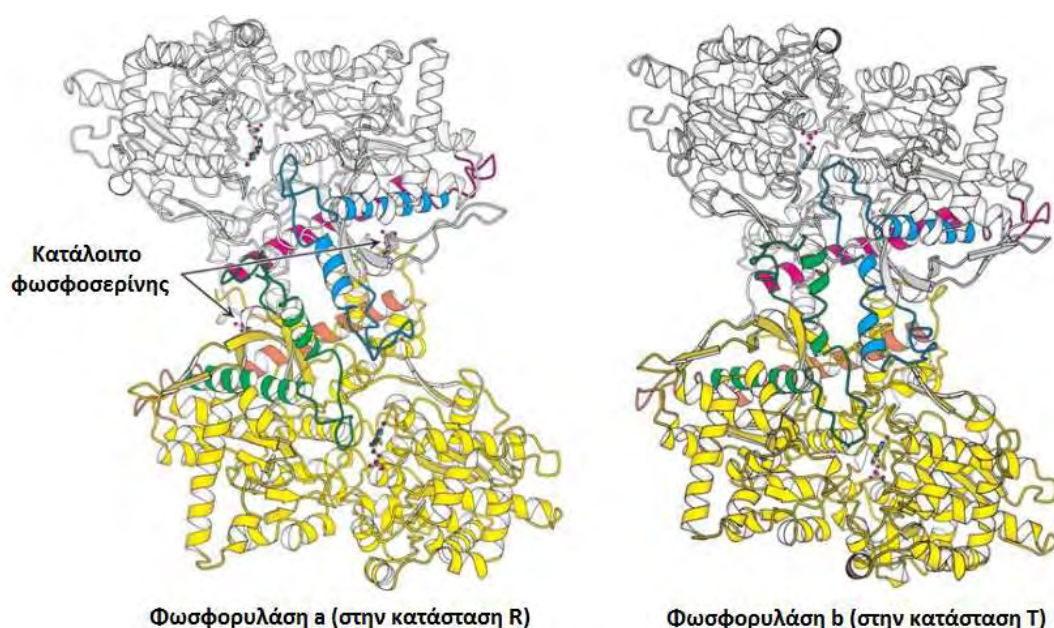
Η φωσφορυλάση είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο που ακολουθεί το μοντέλο των *Monod, Wyman* και *Changeux (MWC)*. Σε αυτό το μοντέλο, γίνεται η παραδοχή ότι οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή από αποτελούνται από πανομοιότυπα μονομερή. Το ένζυμο μπορεί να έχει μια από τις δύο διαμορφώσεις: την *T (Tense)* και την *R (Relaxed)*[16]. Έτσι ακριβώς και η φωσφορυλάση είναι ένα ένζυμο με δύο πανομοιότυπες υπομονάδες και μπορεί να βρεθεί είτε στην κατάσταση *T* είτε στην *R*. Η κατάσταση *R* είναι μια χαλαρή κατάσταση στην οποία το ένζυμο είναι ενεργό διότι έχει μεγάλη συγγένεια με το υπόστρωμα σε αντίθεση με την κατάσταση *T* που έχει χαμηλότερη συγγένεια με το υπόστρωμα και είναι μια λιγότερο ενεργή τεταμένη κατάσταση του ενζύμου. Η θέση ισορροπίας της φωσφορυλάσης μεταξύ των καταστάσεων *T* και *R* εξαρτάται από τις συνθήκες του κυττάρου. Στη θέση πρόσδεσης του αλλοστερικού τροποποιητή της φωσφορυλάσης μπορεί να προσδεθεί η *AMP*, η *ATP*, η 6-φωσφορική γλυκόζη, η 1-φωσφορική φρουκτόζη, η *ADP* και το *IMP*. Όλοι αυτοί οι αλλοστερικοί τροποποιητές που αντιπροσωπεύουν και φανερώνουν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου σταθεροποιούν την *T* κατάσταση εκτός της *AMP* που σταθεροποιεί την *R*. Οι δράσεις των *AMP* και *G6P* είναι αλληλοαποκλειόμενες επειδή οι φωσφορικές τους ομάδες συνδέονται με τα ίδια κατάλοιπα στην περιοχή πρόσδεσης και σταθεροποιούν την *R* και την *T* διαμόρφωση αντίστοιχα [12].

### 3.5. Ομοιοπολική τροποποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: τη φωσφορυλάση *a (GP<sub>a</sub>)* και την *b (GP<sub>b</sub>)*. Κάθε μία από τις δύο isoμορφές *a* και *b* βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ της κατάστασης *R* και της κατάστασης *T*. Παρ' όλο που η μετάβαση από την κατάσταση *R* στην *T* και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου, στις περισσότερες φυσιολογικές συνθήκες, η

ισορροπία για τη φωσφορυλάση *a* ευνοεί την κατάσταση *R*, ενώ η ισορροπία για την φωσφορυλάση *b* την κατάσταση *T*. Οπότε η φωσφορυλάση *a* είναι συνήθως ενεργή και η φωσφορυλάση *b* συνήθως ανενεργή. Η μετατροπή από την *GPb* στην *GPa* πραγματοποιείται με ομοιοπολική τροποποίηση και συγκεκριμένα μια αντιστρεπτή φωσφορυλίωση στη *Ser-14* κάθε υπομονάδας της φωσφορυλάσης. Η φωσφορυλίωση αυτή προκαλεί την περιστροφή 10° γύρω από τον άξονα συμμετρίας δευτέρας τάξεως του διμερούς, αλλάζοντας τη διαμόρφωση από την κατάσταση *T* στην *R*. Αυτή η δομική αλλαγή απομακρύνει το βρόχο 280s από την καταλυτική περιοχή. Ο βρόχος αυτός βρίσκεται μέσα στο καταλυτικό κέντρο και είναι συνδεδεμένος με τη φωσφορική πυριδοξάλη. Μετά τη φωσφορυλίωση λοιπόν απομακρύνεται και επιτρέπει την πρόσβαση του γλυκογόνου στο καταλυτικό σημείο[17].

Η φωσφορυλίωση αυτή καταλύεται από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η μετατροπή της ισομορφής *GPa* σε *GPb* πραγματοποιείται με αποφωσφορυλίωση της σερίνης. Το ένζυμο που καταλύει αυτή την αντίδραση είναι η πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (*PPI*). Το πλήρες σύμπλοκο της *PPI* αποτελείται από τρία συστατικά: την ίδια της φωσφατάση, η οποία είναι μια καταλυτική υπομονάδα μοριακού βάρους 37 *kD*, μια υπομονάδα *RG1* μοριακού βάρους 123 *kD*, η οποία προσφέρει υψηλή συγγένεια για το γλυκογόνο και τον αναστολέα 1, μια μικρή ρυθμιστική υπομονάδα η οποία, όταν φωσφορυλιωθεί, αναστέλλει την *PPI*. [10,12]



**Εικόνα 7:** Δομή της φωσφορυλάσης *a* και της φωσφορυλάσης *b*. Στη φωσφορυλάση *a* φαίνονται τα κατάλοιπα φωσφοσερίνης όπου έχει γίνει η φωσφορυλίωση στη *Ser-4* κάθε υπομονάδας. Η φωσφορυλίωση ευνοεί τη δομή της ενεργούς κατάστασης *R*. Με λευκό και κίτρινο δείχνονται οι δύο υπομονάδες του ομοδιμερούς και με μπλε, κόκκινο, πορτοκαλί και πράσινο οι έλικες και οι θηλιές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση σε κάθε υπομονάδα. Η φωσφορυλάση *b* δεν φωσφορυλιώνεται και υπάρχει κυρίως στη κατάσταση *T*.



### **3.5.1. Η κινάση της φωσφορυλάσης (Phk)**

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι ένα δεκαεξαμερές που αποτελείται από τεσσάρων ειδών υπομονάδες: (αβγδ)<sub>4</sub>. Οι υπομονάδες α, β και δ έχουν ρυθμιστική λειτουργία. Οι α και οι β υπομονάδες μεσολαβούν στην ενεργοποίηση της κινάσης μέσω φωσφορυλίωσης από μία πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από το *cAMP* και οι δ υπομονάδες σχετίζονται με ρύθμιση του ενζύμου βάσει των αλλαγών στα ιόντα ασβεστίου. Η καταλυτική δραστηριότητα εντοπίζεται στη γ υπομονάδα. Υπάρχουν μυϊκές και ηπατικές ισομορφές της υπομονάδας α (*PHKA1* και *PHKA2*) και της υπομονάδας γ (*PHKG1* και *PHKG2*).

Η κινάση βρίσκεται υπό τον έλεγχο δύο μηχανισμών. Αρχικά, όπως και η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση της κινάσης στην υπομονάδα β τη μετατρέπει σε ένα υψηλής δραστηριότητας ένζυμο. Η φωσφορυλίωση αυτή πραγματοποιείται από την πρωτεϊνική κινάση Α (*PKA*), η οποία αρχίζει να λειτουργεί με ένα δεύτερο αγγελιοφόρο, την κυκλική *AMP*. Η κινάση της φωσφορυλάσης μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί εν μέρει από επίπεδα  $Ca^{2+}$  της τάξεως του  $10^{-6}$  M. Η ρυθμιστική υπομονάδα δ που ανιχνεύει τα επίπεδα ιόντων ασβεστίου ενεργοποιεί το ένζυμο. Για την πλήρη λειτουργία της κινάσης απαιτείται η τροποποίηση της και με φωσφορυλίωση αλλά και με ενεργοποίηση της δ υπομονάδας με δέσμευση  $Ca^{2+}$ . [10,12]

### **3.6. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος φαρμάκων έναντι του διαβήτη τύπου II**

Παρ' όλο που η διαθεσιμότητα πολλών και διαφορετικών υπογλυκαιμικών φαρμάκων είναι μεγάλη, τα θεραπευτικά σχήματα είναι τις περισσότερες φορές ανίκανα να πετύχουν έναν ικανοποιητικό βαθμό ελέγχου της γλυκόζης στο αίμα ώστε να επιτύχουν μια πιο αποτελεσματική μείωση των επιπτώσεων και της σοβαρότητας των επιπλοκών του διαβήτη. Στους ασθενείς με διαβήτη τύπου II αυξάνεται η παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ και η γλυκογονόλυση έχει φανεί ότι είναι ένας ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας αυτής της μη φυσιολογικής αυξημένης παραγωγής. Για το λόγο αυτό η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί φαρμακευτικό στόχο με στόχο τη μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Πιο συγκεκριμένα, στόχο αποτελεί η ισομορφή του ήπατος αφού ρόλος της είναι η ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, αποικοδομώντας το γλυκογόνο με τελικό σκοπό την απελευθέρωση της γλυκόζης από το ήπαρ στην κυκλοφορία. Αντίθετα, η μυϊκή φωσφορυλάση λειτουργεί με σκοπό την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυϊκών κυττάρων κατά τη σύσπαση. [8]

Η ανακάλυψη, λοιπόν, αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από φυσικές πηγές ή η ανάπτυξη συνθετικών αναστολέων με σκοπό την αναστολή της δράσης του ενζύμου αποτελεί ένα βασικό βήμα για την αντιμετώπιση του διαβήτη. Εξαιτίας της ύπαρξης πολλών θέσεων πρόσδεσης στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου πολλά μόρια σε πολλές διαφορετικές θέσεις θα μπορούσαν να αποτελέσουν αναστολείς του ενζύμου. Έχουν αναφερθεί πολλοί διαφορετικοί αναστολείς έναντι της

φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης όπως το καταλυτικό κέντρο, το κέντρο πρόσδεση της *AMP* και το κέντρο πρόσδεσης του ινδολίου.[8]

Οι πιο διαδεδομένοι και ευρέως μελετημένοι αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι τα ανάλογα της γλυκόζης που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Τα ανάλογα της γλυκόζης αποτελούνται από ένα μόριο γλυκόζης με κάποιον α- ή β- υποκαταστάτη στο C-1 του μορίου της γλυκόζης. Η ισχύς του αναστολέα εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις του με το περιβάλλον του καταλυτικού κέντρου κατά τη σύνδεση του σε αυτό.[14]

Η έρευνα για την εύρεση ενός αναστολέα έχει ως κύριο στόχο την ανακάλυψη ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης θα δρα όμως σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με  $K_i \approx 1 \mu M$ , ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης.[18]

## 4. ΣΚΟΠΟΣ

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του ευρύτερου ερευνητικού προγράμματος του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κύριο αντικείμενο της έρευνας αυτής αποτελεί η φωσφορυλάση του γλυκογόνου και άλλα ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Απώτερος σκοπός των ερευνών του εργαστηρίου είναι η ανακάλυψη εν δυνάμει φαρμάκων με αντι-υπεργλυκαιμική δράση με σκοπό τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα.

Σκοπό της παρούσας εργασίας είναι η εκτίμηση της αναστολής δύο ενώσεων στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Αρχικά έγινε απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* (*rmGPb*) από σκελετικούς μύες κονίκλων ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus*. Στη συνέχεια, έγινε απομόνωση της καταλυτικής  $\gamma$ -υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης μύος κονίκλου από μετασχηματισμένα βακτήρια. Με τη δράση της  $\gamma$ -υπομονάδας της κινάσης πραγματοποιήθηκε φωσφορυλίωση της *rmGPb* και μετατροπή της στην *rmGPa*. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *a*, ξεκινώντας με τον προσδιορισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten* και στη συνέχεια ακολούθησε ο προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής  $K_i$  και για τους δύο υπό μελέτη αναστολείς, *KS461* και *KS510*. Οι δύο αυτοί αναστολείς αποτελούν χημικές ενώσεις που συντέθηκαν σε συνεργαζόμενο εργαστήριο του καθηγητή *Somsák László* στο πανεπιστήμιο του *Debrecen* στην Ουγγαρία. Οι ενώσεις αυτές σχεδιάστηκαν με βάση την αρχιτεκτονική της τρισδιάστατης δομής του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου και είναι ανάλογα της γλυκόζης. Με τον προσδιορισμό της  $K_i$  θα εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα των αναστολέων αυτών.

## 5. Υλικά και μέθοδοι

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Εταιρεία</i>
1,4-Dithiothreitol, DTT	Applichem
2-mercaptoethanol	Sigma
Acetic acid, CH <sub>3</sub> COOH	Sds
Acrylamide	Serva
Adenosine Monophosphate, AMP	Sigma
AdenosineTriphosphate, ATP	Sigma
Ammonium persulfate, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Serva
Ammonium sulfate, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Chemlab
Ampicillin	Serva
Bis-acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay, 5×	Bio-rad
Bromophenole blue	Research Organics
Calcium Chloride Dehydrate (CaCl <sub>2</sub> )	Merck
Chloramphenicol	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye	Fluka
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Panreac
Dodecylsulfate Na salt, SDS	SERVA
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic Acid, EDTA	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Serva
GSH (Γλουταθειόνη )	Applichem
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Imidazole	Sigma
Inosine Monophosphate, IMP	Sigma
IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)	Serva
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (potassium dihydrogen phosphate)	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
LB Agar	Serva
LB Broth	Applichem
Magnesium Acetate, (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> Mg	Applichem
Methanol, CH <sub>3</sub> OH	Scharleu
molybdate tetrahydrate	AppliChem
MTG (Methyl-β-D-thiogalactoside)	Sigma
NaCl	Scharleu
NaOH	Merck
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)	Applichem
Potassium bicarbonate (KHCO <sub>3</sub> )	AppliChem
Potassium chloride, KCl	Alpha Aesar
Sodium acetate, CH <sub>3</sub> COONa	Merck
Sodium Carbonate Anhydrous, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sds
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Invitrogen
Tris	Applichem
Zinc acetate dehydrate	Sigma
α-D-Glucose 1-Phosphate	Sigma
β-GP	Sigma

## Όργανα

- Πεχάμετρο, *Metrohm*
- Αναλυτικός ζυγός, *Kern*
- Πιπέτες, *LabMate*
- *Sonication bath*
- Φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο, *WiseBath, Wisd*
- Κλίβανος
- Επωαστήρας
- *Sonicator*
- *ÁKTApurifier*
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης, *Biorad*
- Χρονόμετρο
- Θερμαινόμενος αναδευτήρας (*Stirrer*), *Thermolyne*
- Αναδευτήρας τύπου *Vortex, MS2 minishakerIKA®*
- Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός, *Spectronic® 20 Genesys™*
- Φασματοφωτόμετρο UV, *VWR*
- Αντλία κενού

### **5.1. Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* από σκελετικούς μύες κουνελιών ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus***

Η απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* έγινε από τους σκελετικούς μύες αρσενικών κονίκλων (*rmGPb, Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase b*) με τροποποίηση της μεθόδου των *Fisher* και *Krebs*, όπου αντί για *L*-κυστεΐνη χρησιμοποιείται 2-μερκαπτοαιθανόλη σε όλα τα στάδια της πορείας του καθαρισμού.

***Τα βήματα της απομόνωσης της *rmGPb* είναι τα εξής:***

#### 1<sup>ο</sup> βήμα

##### *Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος*

Αρχικά, έγινε λήψη των σκελετικών μυών από τρεις αρσενικούς κονίκλους. Στη συνέχεια, με τη χρήση της μηχανής παραγωγής αλεσμένου κρέατος, ο μυϊκός ιστός ομογενοποιήθηκε και το αλεσμένο κρέας ζυγίστηκε. Μετά την ομογενοποίηση, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με απιονισμένο νερό τρεις φορές με συνολικό χρόνο εκχύλισης 30 λεπτά, εν ψυχρώ. Τις δύο πρώτες φορές η εκχύλιση έγινε με όγκο απιονισμένου νερού ίσο με το βάρος του αλεσμένου κρέατος και την τελευταία φορά με όγκο απιονισμένου νερού ίσο με το μισό του συνολικού βάρους του αλεσμένου κρέατος. Κάθε μέρος της εκχύλισης είχε διάρκεια 10 λεπτά και η διήθηση του εκχυλίσματος κάθε φορά έγινε με γάζα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε διήθηση του εκχυλίσματος μέσω υαλοβάμβακα, για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών.

#### 2<sup>ο</sup> βήμα

##### *Απομάκρυνση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών από το εκχύλισμα με την πραγματοποίηση καταβύθισης πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον*

Αρχικά, έγινε ρύθμιση του *pH* του ψυχρού εκχυλίσματος σε τιμή 5,2 με προσθήκη διαλύματος *CH<sub>3</sub>COOH 1 N* υπό ελαφρά ανάδευση. Με τη ρύθμιση του *pH* σε αυτή

την τιμή προέκυψε αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος λόγω της κατακρήμνισης διάφορων πρωτεϊνών, των οποίων το ισοηλεκτρικό τους σημείο είναι κοντά στην τιμή 5,2 ή εξαιτίας της μετουσίωσής τους. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες που καταβύθιστηκαν, απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4 °C, σε 4000 g επί 30 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιήθηκε διήθηση του υπερκείμενου υγρού με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί *Buchner* με τη χρήση δύο χάρτινων φίλτρων, εν ψυχρώ, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Τέλος, έγινε ρύθμιση του *pH* του συνολικού διηθήματος στην τιμή 6,8 με τη χρήση κεκορεσμένου διαλύματος  $KHCO_3$ .

### 3<sup>ο</sup> βήμα

Καταβύθιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με διάλυμα 90% w/v θειικού αμμωνίου  $(NH_4)_2SO_4$ , συγκέντρωσης 3.6 M

Με την προσθήκη διαλύματος  $(NH_4)_2SO_4$  συγκέντρωσης 3.6 M και *pH* 6,8 στο ενζυμικό διάλυμα έχουμε ως αποτέλεσμα την καταβύθιση του ενζύμου. Ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος θειικού αμμωνίου που έπρεπε να χρησιμοποιηθεί ήταν 0,837 επί τον όγκο του εκχυλίσματος και στην συγκεκριμένη περίπτωση έγινε προσθήκη 4214,3 ml. Κατά την καταβύθιση το ποσοστό κορεσμού του  $(NH_4)_2SO_4$  ήταν 41%. Η ρύθμιση του *pH* του διαλύματος θειικού αμμωνίου σε τιμή 6,8 έγινε με την προσθήκη πυκνής αμμωνίας ( $NH_4OH$ ) και τη βοήθεια πεχαμετρικού χαρτιού. Το μίγμα του πρωτεϊνικού διαλύματος με το διάλυμα θειικού αμμωνίου παρέμεινε στον ψυκτικό θάλαμο για 16 ώρες με σκοπό την όσο είναι δυνατόν καλύτερη καταβύθιση του ενζύμου. Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε συλλογή του ιζήματος, αρχικά με απόχυση του μεγαλύτερου όγκου του υπερκείμενου διαλύματος με τη βοήθεια αντλίας και στη συνέχεια με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4 °C σε 5000 g επί 40 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση του διαλυτοποιημένου ενζύμου σε σάκους διαπίδυσης οι οποίοι εμβαπτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα *Tris* συγκέντρωσης 0.001 M και *pH* 7,5 στον ψυκτικό θάλαμο όπου παρέμειναν για 16 ώρες.

### 4<sup>ο</sup> βήμα

Θερμική κατεργασία του πρωτεϊνικού διαλύματος σε υψηλό *pH*

Μετά τη διαπίδυση το πρωτεϊνικό διάλυμα συλλέχθηκε και πραγματοποιήθηκε διάγυση με φυγοκέντρηση σε 25000 g για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Έπειτα, το υπερκείμενο συλλέχθηκε και ογκομετρήθηκε. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 13,22 ml πρόσφατου διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης συγκέντρωσης 0,3 M, *pH* 7,0 και 661  $\mu L$  διαλύματος *EDTA* συγκέντρωσης 0,1 M, *pH* 7,0. Ο όγκος των διαλυμάτων αυτών που προστέθηκαν υπολογίστηκε σύμφωνα με τους τύπους:

- Όγκος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0,3 M = πρωτεϊνικός όγκος  $\times \frac{3}{27}$

- Όγκος *EDTA* 0.1 M = πρωτεϊνικός όγκος μετά την προσθήκη του διαλύματος της 2-μερκαπτοαιθανόλης  $\times \frac{5}{1000}$

Έπειτα, έγινε ρύθμιση του *pH* σε τιμή 8,8 με την προσθήκη διαλύματος *Tris* συγκέντρωσης 2 M και ακολούθησε επώαση του μίγματος στο υδατόλουτρο στους 37°C για 1 ώρα με ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Μετά την επώαση στους 37 °C, το μίγμα παρέμεινε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να ψυχθεί και το *pH* ρυθμίστηκε στην τιμή 7,0 με τη χρήση διαλύματος *CH<sub>3</sub>COOH* 1N. Τέλος, πραγματοποιήθηκε διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 25000 g για 10 λεπτά στους 25 °C.

### 5<sup>ο</sup> βήμα

#### Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b

Στο βήμα αυτό πραγματοποιήθηκαν μια κρυστάλλωση και δύο ανακρυσταλλώσεις του ενζύμου παρουσία *AMP* και *(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg*. Επίσης πραγματοποιήθηκαν δύο ακόμα ανακρυσταλλώσεις χωρίς την προσθήκη αυτών των δύο συστατικών.

- Κρυστάλλωση

Το υπερκείμενο από τη διαύγαση του βήματος 4 ογκομετρήθηκε και στη συνέχεια προστέθηκαν τα εξής:

- Διάλυμα *AMP* 0.1 M, *pH* 7.0, με όγκο: πρωτεϊνικός όγκος  $\times \frac{1}{100} = 1,34 \text{ ml}$

- Διάλυμα *(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg* 1 M, *pH* 7.0, με όγκο: πρωτεϊνικός όγκος  $\times \frac{1}{100} = 1,34 \text{ ml}$

Μετά την προσθήκη, το διάλυμα παρέμεινε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα με σκοπό την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης.

- 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε συλλογή των κρυστάλλων από την κρυστάλλωση με φυγοκέντρηση σε 25000 g για 10 λεπτά στους 4 °C. Έπειτα το ίζημα με τους κρυστάλλους διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 (50 mM β-φωσφογλυκερόλη (*β-GP*), 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM *EDTA*) με *pH* 6,8 σε θερμοκρασία 30 °C στο υδατόλουτρο. Ακολούθησε διαύγαση με φυγοκέντρηση σε 25000 g για 10 λεπτά στους 25 °C και συλλογή του υπερκείμενου. Στη συνέχεια προστέθηκαν τα εξής:

- Διάλυμα *AMP* 0.1 M, *pH* 7.0, με όγκο: πρωτεϊνικός όγκος  $\times \frac{1}{100} = 1,06 \text{ ml}$

- Διάλυμα *(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg* 1 M, *pH* 7.0, με όγκο: πρωτεϊνικός όγκος  $\times \frac{1}{100} = 1,06 \text{ ml}$

Μετά την προσθήκη, το διάλυμα παρέμεινε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για 4 ώρες με σκοπό την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης.

Μετά τις 4 ώρες η διαδικασία της 1<sup>ης</sup> ανακρυστάλλωσης επαναλήφθηκε με σκοπό την πραγματοποίηση της 2<sup>ης</sup> ανακρυστάλλωσης, αλλά το μίγμα παρέμεινε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για όλη τη νύκτα.

- 3<sup>η</sup> και 4<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση

Στις ανακρυσταλλώσεις 3 και 4 πραγματοποιήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με τις ανακρυσταλλώσεις 1 και 2 με τη μόνη διαφορά ότι στις 3 και 4 δεν έχουμε προσθήκη AMP και  $(CH_3COO)_2Mg$ .

#### 6<sup>ο</sup> βήμα

##### Προσδιορισμός της συγκέντρωσης και αποθήκευση του ενζύμου

Μετά τη λήψη και τη διαλυτοποίηση των κρυστάλλων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από την τελευταία ανακρυστάλλωση, έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης του ενζύμου φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 280 nm, (ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης για την *rmGP* είναι 1.32). Τέλος, για την αποθήκευση του ενζύμου προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύτηκε στους  $-20^\circ C$  (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 % v/v).

## **5.2. Απομόνωση της $\gamma$ υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης μύος κουνελιού από βακτήρια (*rmPhK- $\gamma$ -trunc*)**

Η απομόνωση της *rmPhK- $\gamma$ -trunc* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση βακτηρίων *E. coli* του στελέχους *B834plyss*, τα οποία μετασχηματίστηκαν με το κατάλληλο πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της επιθυμητής πρωτεΐνης και αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό. Για την απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης από τα βακτήρια που εκφράζουν την *rmPhK- $\gamma$ -trunc* χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών από τα υπόλοιπα συστατικά των βακτηρίων αλλά και για τον διαχωρισμό της επιθυμητής πρωτεΐνης από το σύνολο των εκφραζόμενων πρωτεϊνών.

**Τα βήματα της απομόνωσης είναι τα εξής:**

### **5.2.1. Παρασκευή των θρεπτικών υλικών, καλλιέργεια των μετασχηματισμένων βακτηρίων και συλλογή του συνόλου των πρωτεϊνών των βακτηρίων.**

#### 1<sup>ο</sup> βήμα

##### Παρασκευή των απαραίτητων θρεπτικών υλικών

Για την ανάπτυξη των βακτηρίων με σκοπό αυτά να εκφράσουν την επιθυμητή πρωτεΐνη απαιτείται η παρασκευή θρεπτικών υλικών.

#### 1. *LB-Broth (Lysogenybroth)*

→ Η απαιτούμενη αναλογία του *LB-Broth* στο  $dH_2O$  είναι 25 g θρεπτικού υλικού ανά λίτρο  $dH_2O$ .

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η παρασκευή 2 λίτρων υγρού θρεπτικού υλικού *LB-Broth* διαλύοντας 50 g θρεπτικού υλικού (μορφή σκόνης) σε  $dH_2O$  με τελικό όγκο 2 L. Τα 2L διαχωρίστηκαν σε δύο γυάλινες φλάσκες του 1 L.

Έπειτα, απαιτείται και η παρασκευή 50 ml υγρού θρεπτικού υλικού *LB-Broth*. Γι' αυτό το σκοπό, 1,25 g θρεπτικού υλικού (μορφή σκόνης) διαλύθηκαν σε  $dH_2O$  με τελικό όγκο 50 ml.



## 2. *LB-Agar*

→ Η απαιτούμενη αναλογία του *LB-Agar* στο  $dH_2O$  είναι 35 g θρεπτικού υλικού ανά λίτρο  $dH_2O$ .

Για την παρασκευή του στερεού θρεπτικού υλικού *LB-Agar*, διαλύθηκαν 1,75 g θρεπτικού υλικού (μορφή σκόνης) σε  $dH_2O$  με τελικό όγκο 50 ml μέσα σε ένα γυάλινο σκεύος.

→ Όλα τα θρεπτικά υλικά αποστειρώθηκαν.

## 2<sup>ο</sup> βήμα

### Προετοιμασία των αντιβιοτικών

#### 1. Χλωραμφαινικόλη

→ Η απαιτούμενη συγκέντρωση της χλωραμφαινικόλης στο διαλύτη της, την αιθανόλη, είναι 34 mg/ml.

Άρα, για την παρασκευή 20 ml διαλύματος διαλύθηκαν 680 mg χλωραμφαινικόλης σε αιθανόλη.

#### 2. Αμπικιλλίνη

→ Η απαιτούμενη συγκέντρωση της αμπικιλλίνης στο διαλύτη της, το  $dH_2O$ , είναι 100 mg/ml.

Άρα, για την παρασκευή 20 ml διαλύματος διαλύθηκαν 2000 mg αμπικιλλίνης σε  $dH_2O$ .

→ Τα αντιβιοτικά δεν μπορούν να αποστειρωθούν σε αυτόκαυστο διότι καταστρέφονται με τη θερμότητα. Για το λόγο αυτό, η αποστείρωση έγινε με τη χρήση αποστειρωμένου φίλτρου με διάμετρο πόρων 0,2  $\mu m$  σε στείρες συνθήκες.

## 3<sup>ο</sup> βήμα

### Μετασχηματισμός βακτηρίων με το πλασμίδιο που φέρει την αλληλουχία του γονιδίου της *rmPhK-γ-trunc*

Το πλασμίδιο εισήχθη σε βακτήρια *E.coli* του στελέχους *B834plyss* και έφερε την αλληλουχία που κωδικοποιεί την καταλυτική  $\gamma$ -υπομονάδα της κινάσης της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κόνικλο (*rmPhK-γ-trunc*). Για το μετασχηματισμό πραγματοποιήθηκαν κάποια συγκεκριμένα βήματα. Αρχικά, για να έναν επιτυχημένο μετασχηματισμό είναι απαραίτητο να διαθέτουμε 10-100 ng πλασμιδίου. Προστέθηκε λοιπόν 1  $\mu L$  από το *stock* πλασμιδίου (~30 ng) σε 100  $\mu L$  χημειοδεκτικών κυττάρων, ακολούθησε μια ελαφριά ανακίνηση και τοποθετήθηκαν σε πάγο για 30 min. Μετά τα 30 min, το μίγμα κυττάρων-πλασμιδίων τοποθετήθηκε για 45 sec στους 42 °C στο υδατόλουτρο και αμέσως μετά πάλι στον πάγο για 2 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 900  $\mu L$  θρεπτικού υλικού *SOB* (*Super Optimal Broth*) και ακολούθησε επώαση 1 ώρα στους 37 °C.

#### 4<sup>ο</sup> βήμα

#### Ανάπτυξη καλλιέργειών των μετασχηματισμένων βακτηρίων και έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης

Μετά τον μετασχηματισμό των βακτηρίων ακολούθησε η καλλιέργεια και ο πολλαπλασιασμός τους σε θρεπτικό υλικό. Πρώτο βήμα αποτέλεσε η καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια μια από τις αποικίες που δημιουργήθηκαν στο τρυβλίο μεταφέρθηκε για καλλιέργεια σε μεγαλύτερη κλίμακα σε υγρό θρεπτικό υλικό. Τέλος, ακολούθησε η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της κινάσης με τη βοήθεια του *IPTG*. Το *IPTG* (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) είναι μία ένωση που μιμείται τη μοριακή δράση της αλλολακτόζης. Η αλλολακτόζη είναι ένας μεταβολίτης της λακτόζης που επάγει τη μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης. Ως εκ τούτου, το *IPTG* χρησιμοποιείται για την επαγωγή της έκφρασης μιας πρωτεΐνης, όπου το γονίδιο που την κωδικοποιεί είναι κάτω από τον έλεγχο του χειριστή του οπερονίου της λακτόζης. Έτσι και στην συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της *rmPhK-γ-trunc*.

Πιο αναλυτικά, μετά την αποστείρωση, τα θρεπτικά υλικά παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για να κρυώσουν και στη συνέχεια προστέθηκαν τα αντιβιοτικά στο *LB-Agar* το οποίο θα χρησιμοποιηθεί και πρώτο. Τα αντιβιοτικά πρέπει να προστίθενται στα θρεπτικά υλικά λίγο πριν τον εμβολιασμό τους με τα βακτήρια γιατί έχουν συγκεκριμένο χρόνο δράσης. Επίσης η διαδικασία πρέπει να πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες. Τα αντιβιοτικά προετοιμάστηκαν όπως αναφέρεται στο βήμα 2. Οι απαιτούμενες συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών στα θρεπτικά υλικά είναι 50  $\mu\text{g/ml}$  για την αμπικιλίνη και 34  $\mu\text{g/ml}$  για την χλωραμφαινικόλη. Επομένως στα 50 ml *LB-Agar* προστέθηκαν 25  $\mu\text{L}$  αμπικιλίνης και 50  $\mu\text{L}$  χλωραμφαινικόλης. Μετά την προσθήκη των αντιβιοτικών, το *LB-Agar* μοιράστηκε σε δυο τριβλία και σε μικρό χρονικό διάστημα έπηξε. Έπειτα, τα μετασχηματισμένα βακτήρια που προέκυψαν από το βήμα 3 προστέθηκαν στα δύο τρυβλία, 50  $\mu\text{L}$  στο πρώτο και 150  $\mu\text{L}$  στο δεύτερο. Τα τρυβλία παρέμειναν στον κλίβανο στους 37 °C για 16 ώρες.

Μετά τις 16 ώρες είχαν αναπτυχθεί αποικίες στα τρυβλία. Αφού έγινε προσθήκη του αντιβιοτικού στο *LB-Broth* (50 ml), έγινε εμβολιασμός αυτού του μικρού όγκου θρεπτικού υλικού με μια αποικία από τη στερεή καλλιέργεια με το *LB-Agar*. Στη συνέχεια, αυτές οι καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό *LB-Broth* παρέμειναν για 16 ώρες στους 37 °C, 210 rpm ώστε να αναπτυχθούν

Δεκαέξι ώρες μετά, έγινε εμβολιασμός των μεγάλων όγκων του *LB-Broth* (2×φλάσκα 1L) με αναλογία 1/100. Έγινε δηλαδή προσθήκη 10 ml από την μικρή καλλιέργεια των 50 ml σε κάθε φλάσκα. Μετά τον εμβολιασμό, οι φλάσκες τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στους 37 °C, 210 rpm για 3 ώρες. Μετά τις 3 ώρες γίνεται μέτρηση της ανάπτυξης των κυττάρων με φασματοφωτομέτρηση σε μήκος κύματος 600 nm. Όταν η τιμή της απορρόφησης έφτασε κοντά στο 0,6, όπου θεωρείται ότι τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί επαρκώς, οι φλάσκες απομακρύνθηκαν από τον επωαστήρα και τοποθετήθηκαν στον πάγο. Όταν η θερμοκρασία έφτασε περίπου τους 15-20 °C προστέθηκε ο παράγοντας επαγωγής της υπερέκφρασης *IPTG* σε κάθε φλάσκα σε

τελική συγκέντρωση 0,1 mM. Αφού προστέθηκε το *IPTG* οι φλάσκες τοποθετήθηκαν ξανά στον επωαστήρα στους 18 °C με ανακίνηση 210 rpm για 16 ώρες.

### 5° βήμα

#### Ομογενοποίηση των κυττάρων

Μετά την επώαση των βακτηρίων με τον επαγωγέα *IPTG* στους 18 °C για 16 ώρες πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση όλου του θρεπτικού υλικού με τα κύτταρα στους 6 °C, 5000 g για 5 min σε δοχεία τύπου *falcon* των 50 ml. Από τη φυγοκέντρηση φυλάξαμε το ίζημα και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Στο ίζημα βρίσκονταν όλα τα βακτήρια τα οποία στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν με το διάλυμα λύσης.

Το διάλυμα λύσης περιείχε τα εξής :

- *Hepes* 50 mM
- *NaCl* 0,2 M
- Γλυκερόλη 5% (v/v)
- *MTG* (μονοθειογλυκερόλη) 0.1% (v/v)
- *PMSF* (φθοριούχο φαινυλμεθυλσουλφονύλιο) 1 mM

Έγινε αποστείρωση του διαλύματος λύσης με τη χρήση αποστειρωμένου φίλτρου με διάμετρο πόρων 0,2 μm. Το *PMSF* είναι ένας αναστολέας πρωτεασών που χρησιμοποιείται για την αποφυγή της πρωτεόλυσης των πρωτεϊνών. Με τη βοήθεια μιας γυάλινης ράβδου και τη χρήση όσο το δυνατόν λιγότερης ποσότητας διαλύματος λύσης, τα κύτταρα διαλυτοποιήθηκαν σε πάγο. Προστέθηκε 1 μL βενζονάση (νουκλεάση για την διάσπαση του *DNA*) και το μίγμα αφέθηκε για 15 min σε πάγο. Στη συνέχεια ακολούθησε χρήση υπερήχων (*sonicator*) σε πάγο, με σκοπό το πιο αποτελεσματικό σπάσιμο των κυτταρικών μεμβρανών. Ο κύκλος στο *sonicator* ήταν 30sec εφαρμογή–30sec παύση. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 3 φορές με *amplitude* 60-70%. Τέλος, μετά το *sonication* ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 15000G για 45 min στους 6 °C για την απομάκρυνση όλων των υπολειμμάτων των κυττάρων και διατήρηση του υπερκείμενου που βρίσκονται οι πρωτεΐνες. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης φιλτράραμε το υπερκείμενο με φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0,45 μm και το τοποθετήσαμε σε πάγο (4 °C).

#### **5.2.2. Καθαρισμός και απομόνωση του επιθυμητού ενζύμου από το σύνολο των πρωτεϊνών με το σύστημα AKTA-FPLC**

Η χρωματογραφία *FPLC* (*Fast protein liquid chromatography*) είναι μια μορφή υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται συχνά για την ανάλυση ή τον καθαρισμό μιγμάτων πρωτεϊνών. Η διαχωριστική της ικανότητα οφείλεται στις δύο φάσεις από τις οποίες αποτελείται, την κινητή και την στατική φάση. Η κινητή φάση είναι ένα κινούμενο ρευστό και στην *FPLC* είναι ένα υδατικό ή ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Η στατική φάση είναι ένα πορώδες στερεό. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική συγγένεια που έχουν τα διαφορετικά συστατικά του μίγματος προς αυτές τις δύο φάσεις.

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί μια κατηγορία χρωματογραφίας *FPLC*. Διαχωρίζει μόρια με βάση την αντιστρεπτή αλληλεπίδραση τους με ειδικά μόρια

προσδέτες που είναι συνδεδεμένα στη στατική φάση της χρωματογραφίας. Η αλληλεπίδραση μπορεί να είναι ειδική με τη χρήση αντισωμάτων ή μη ειδική. Κατά την πειραματική διαδικασία αρχικά είναι απαραίτητο να εξισορροπήσουμε τη στήλη με τουλάχιστον 10 όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης για να αποφύγουμε τυχόν εναπομείναντα μόρια προσδεδεμένα στη στήλη από την προηγούμενη χρήση. Εξισορρόπηση πραγματοποιείται μέχρι η απορρόφηση στο UV να είναι σταθερή. Στη συνέχεια εισάγουμε το δείγμα το οποίο αφήνουμε να περάσει με μια σταθερή ροή, ώστε η επιθυμητή πρωτεΐνη να προσδεθεί στο μόριο-προσδέτη της μήτρας της στήλης με το οποίο εμφανίζει συγγένεια. Μετά το πέρασμα του δείγματος πραγματοποιούνται πλύσεις της στήλης με σκοπό την απομάκρυνση μορίων που έχουν δεθεί μη ισχυρά και μη ειδικά στη στήλη. Η πλύση γίνεται με τουλάχιστον 10 όγκους στήλης και μέχρι η απορρόφηση στο UV να σταθεροποιηθεί. Ύστερα από το πλύσιμο της στήλης ακολουθεί η έκλυση της πρωτεΐνης που προσδέθηκε στη στήλη. Αυτό επιτυγχάνεται με το πέρασμα από τη στήλη ενός διαλύματος που περιέχει συστατικό που προκαλεί την απομάκρυνση των μορίων που έχουν προσδεθεί στη στήλη. Μετά την έκλυση ακολουθεί και πάλι εξισορρόπηση της στήλης ώστε να είναι έτοιμη για την επόμενη χρήση.

#### 6<sup>ο</sup> βήμα

##### Καθαρισμός της πρωτεΐνης με τη χρήση GST στήλης χρωματογραφίας

Στο συγκεκριμένο στάδιο καθαρισμού της πρωτεΐνης χρησιμοποιήσαμε τη στήλη *Protino® GST/4B* της *Macherey-Nagel*. Η λειτουργία μιας στήλης χρωματογραφίας GST βασίζεται στη συγγένεια του ενζύμου S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) με το υπόστρωμά του, την γλουταθειόνη (GSH). Η πρωτεΐνη που θέλουμε να απομονώσουμε φέρει *GST-tag*, δηλαδή είναι συνδεδεμένη με το ένζυμο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης. Πάνω στη στήλη βρίσκονται μόρια γλουταθειόνης, τα οποία εντοπίζει η τρανσφεράση και συνδέεται σε αυτά. Έτσι, μόνο οι πρωτεΐνες που φέρουν το *GST-tag* προσδένονται στην στήλη ενώ οι υπόλοιπες απομακρύνονται. Στο τέλος, με την εφαρμογή των κατάλληλων συνθηκών απομακρύνουμε και την επιθυμητή πρωτεΐνη από τη στήλη και τη συλλέγουμε.

Πειραματική διαδικασία: Πρώτο βήμα, αποτελεί η τοποθέτηση της στήλης χρωματογραφίας *Protino® GST/4B* στο αυτοματοποιημένο σύστημα *FPLC Äkta purifier*. Στη συνέχεια ακολούθησε εξισορρόπηση της στήλης με τουλάχιστον 10 όγκους της στήλης Διάλυμα A έως ότου η ένδειξη της οπτικής απορρόφησης σε μήκος 280 nm να είναι σταθερή. Το Διάλυμα A περιείχε:  $KH_2PO_4$  50 mM, *Glycerol* 5% (v/v), *MTG* 0.1% (w/v), *NaCl* 200 mM και πριν τη χρήση του πραγματοποιήθηκε απαέρωση σε υδατόλουτρο υπερήχων και φιλτράρισμα με φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0,45 μm σε αντλία κενού. Μετά την εξισορρόπηση προστέθηκε στο μηχανήμα το δείγμα που προέκυψε μετά τη φυγοκέντρηση στο βήμα 5, αφού φιλτραρίστηκε με φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0,45 μm. Μετά το πέρασμα του δείγματος από τη στήλη το ένζυμο που θέλαμε να απομονώσουμε (*rmPhK-γ-trunc*) είχε προσδεθεί πάνω στη στήλη αφού έφερε *GST-tag* και το υπόλοιπο δείγμα που βγήκε από τη στήλη αποτελεί το *flow through* (πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια). Για την

απομάκρυνση των μη ισχυρά προσδεμένων πρωτεϊνών από το εσωτερικό της στήλης πραγματοποιήθηκε πλύση με το διάλυμα A και αυτό που συλλέχθηκε αποτελεί το κλάσμα *wash*. Στο επόμενο βήμα για να συλλέξουμε την επιθυμητή πρωτεΐνη που ήταν συνδεδεμένη στη στήλη κάναμε έκλουση του ενζύμου με το διάλυμα B. Το διάλυμα B περιείχε:  $KH_2PO_4$  50 mM, *Glycerol* 5% (v/v), *MTG* 0.1% (w/v), *NaCl* 200 mM και *GSH* 20 mM. Η διαφορά με το διάλυμα A βρίσκεται στη *GSH*, η οποία είναι το συστατικό που προκαλεί την έκλουση του ενζύμου. Συλλέξαμε τα κλάσματα της έκλουσης που θα είναι και αυτά που αναμένεται να περιέχουν το επιθυμητό ένζυμο. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση *SDS-PAGE* των κλασμάτων της ηλεκτροφόρησης και προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο *Bradford* για τα οποία γίνεται λόγος παρακάτω.

### 7<sup>ο</sup> βήμα

#### Προσθήκη της πρωτεάσης 3C στο δείγμα

Η κινάσης της φωσφορυλάσης (*rmPhK-γ-trunc*) που θέλαμε να απομονώσουμε φέρει *GST-tag*, το οποίο ήταν απαραίτητο για την απομόνωση της αφού χρησιμοποιήθηκε στην χρωματογραφία που περιγράφεται στο βήμα 6. Όμως, το *GST-tag* πρέπει να απομακρυνθεί από την κινάση. Αυτό επιτεύχθηκε με τη δράση της πρωτεάσης 3C, η οποία αναγνωρίζει και κόβει μια συγκεκριμένη πρωτεϊνική αλληλουχία. Με βάση αυτή την ιδιότητα της χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση της *GST-tag* από την κινάση της φωσφορυλάσης.

Για να έχει η πρωτεάση 3C επιτυχή δράση απαιτείται η προσθήκη 1 mg πρωτεάσης 3C για κάθε 20 mg *rmPhK-γ-trunc* και η προσθήκη επιπλέον μισής ποσότητα από αυτή που υπολογίστηκε με την αναλογία. Μετά την προσεκτική προσθήκη της 3C στο δείγμα, ακολούθησε ήπια ανάδευση και επώαση στους 4 °C για 16 ώρες.

### 8<sup>ο</sup> βήμα

#### Καθαρισμός της πρωτεΐνης με τη χρήση *Hi Trap Blue Sepharose (Cibacron Blue)* στήλης χρωματογραφίας

Μετά την πέψη της κινάσης με την πρωτεάση 3C ακολούθησε ένα ακόμα βήμα καθαρισμού με τη χρήση της στήλης *Hi Trap Blue sepharose HP* από την *GEHealthCare*. Η στήλη αυτή είναι μια προσυσκευασμένη στήλη με Μπλε Σεφαρόζη Υψηλής Απόδοσης (*Blue Sepharose™ High Performance*). Έχει τη δυνατότητα να προσδένει και να διαχωρίζει πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες, όπως ένζυμα που απαιτούν συμπαραγόντες που περιέχουν αδενύλιο ( $NAD^+$ ,  $NADP^+$ ), όπως η αλβουμίνη, οι παράγοντες πήξης και οι ιντερφερόνες. Ο προσδέτης της στήλης είναι η χρωστική *Cibacron Blue F3G-A*, η οποία συνδέεται ομοιοπολικά με τη σεφαρόζη μέσω μιας τριαζίνης του μορίου της χρωστικής. Μερικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν βιοειδικά με τη *Cibacron Blue F3G-A* λόγω δομικής ομοιότητας με νουκλεοτιδικούς συμπαραγόντες (κινάσες), ενώ άλλες πρωτεΐνες, όπως η λευκωματίνη και η ιντερφερόνη, δεσμεύονται με ένα λιγότερο ειδικό τρόπο μέσω ηλεκτροστατικών και/ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η έκλουση των πρωτεϊνών που προσδένονται στη

στήλη μπορεί να επιτευχθεί με χαμηλή συγκέντρωση ελεύθερων συμπαραγόντων ή με αύξηση της ιοντικής ισχύος.

Πειραματική διαδικασία: Η πειραματική διαδικασία είναι σχεδόν όμοια με αυτή που ακολουθήθηκε με τη στήλη της *Protino® GST/4B*. Αρχικά, η στήλη τοποθετήθηκε στη συσκευή *Äktapurifier*. Στη συνέχεια, ακολούθησε εξισορρόπηση της στήλης με τουλάχιστον 10 όγκους της στήλης διάλυμα A, έως ότου η ένδειξη της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm να είναι σταθερή. Το διάλυμα A περιείχε: *KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>* 50 mM, *Glycerol* 5% (v/v), *MTG* 0.1% (w/v), *NaCl* 50 mM και πριν τη χρήση του πραγματοποιήθηκε απαέρωση σε υδατόλουτρο υπερήχων και φιλτράρισμα με φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0,45 μm σε αντλία κενού. Μετά την εξισορρόπηση προστέθηκε το δείγμα. Το δείγμα που είχε προκύψει μετά την πέψη με την πρωτεάση 3C αναμίχθηκε με ένα διάλυμα με αναλογία δείγμα προς διάλυμα 4:1. Το διάλυμα αυτό περιείχε: *KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>* 50 mM, *Glycerol* 5% (v/v), *MTG* 0.1% (w/v) ενώ δεν περιείχε *NaCl* διότι με αυτό γίνεται η έκλουση. Επομένως, η συγκέντρωση του *NaCl* στο δείγμα που εισήχθη στη στήλη ήταν 50 mM. Μετά το πέρασμα του δείγματος από τη στήλη η *rmPhK-γ-trunc* είχε προσδεθεί πάνω στη στήλη και το υπόλοιπο δείγμα που βγήκε από τη στήλη αποτελεί το *flow through*. Για την απομάκρυνση των υπόλοιπων μη ισχυρά προσδεμένων πρωτεϊνών από το εσωτερικό της στήλης πραγματοποιήθηκε πλύση με το διάλυμα A και αυτό που συλλέχθηκε αποτελεί το κλάσμα *wash*. Στο επόμενο βήμα για να συλλέξουμε την επιθυμητή πρωτεΐνη που ήταν συνδεδεμένη στη στήλη κάναμε έκλουση αυτής με το διάλυμα B. Το διάλυμα B περιείχε: *KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>* 50 mM, *Glycerol* 5% (v/v), *MTG* 0.1% (w/v), *NaCl* 2 M. Η διαφορά με το διάλυμα A βρίσκεται στο *NaCl*, το οποίο είναι αυτό που προκαλεί την έκλουση του ενζύμου και για αυτό το λόγο στο διάλυμα έκλουσης η συγκέντρωση είναι πολύ μεγαλύτερη. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε σε δύο βήματα. Αρχικά, έγινε προσθήκη διάλυμα B τόσο ώστε η συγκέντρωση του *NaCl* να είναι η μισή (1 M) και στο δεύτερο βήμα είχαμε συγκέντρωση *NaCl* 2M. Συλλέξαμε τα κλάσματα της έκλουσης και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση *SDS-PAGE* των κλασμάτων της χρωματογραφίας.

### 9<sup>ο</sup> βήμα

#### Καθαρισμός της πρωτεΐνης με τη χρήση GST στήλης χρωματογραφίας

Μετά τη στήλη *Hi Trap Blue sepharose HP* ακολούθησε χρωματογραφία με στήλη βαρύτητας με σφαιρίδια αγαρόζης που είχαν ακινητοποιημένη την *GSH*. Στόχος αυτού του βήματος καθαρισμού ήταν η πρόσδεση της πρωτεάσης 3C, η οποία φέρει *GST-Tag*, στη στήλη και η συλλογή της κινάσης στο *flow through* μετά το πέρασμα του δείγματος.

Πειραματική διαδικασία: Αρχικά τα σφαιρίδια εισήχθησαν στη στήλη και ξεπλύθηκαν με *dH<sub>2</sub>O* καλά. Στη συνέχεια ακολούθησε εξισορρόπηση της στήλης με τουλάχιστον 10 όγκους της στήλης διάλυμα A (ίδια σύσταση με το διάλυμα A του βήματος 6). Έπειτα έγινε προσθήκη του δείγματος στη στήλη και συλλογή του δείγματος που πέρασε από τη στήλη στο οποίο βρισκόταν και η κινάση της φωσφορυλάσης αφού δεν είχε πλέον *GST-tag*. Ακολούθησε μερική έκπλυση της

στήλης με το διάλυμα A και τέλος έγινε έκλουση της πρωτεάσης 3C με το διάλυμα B (ίδια σύσταση με το διάλυμα B του βήματος 6). Μετά από αυτή τη διαδικασία τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν καλά με *milliQ dH<sub>2</sub>O* και φυλάχθηκαν σε 20% v/v αιθανόλη για επόμενη χρήση. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση *SDS-PAGE* των κλασμάτων της χρωματογραφίας.

### 10<sup>ο</sup> βήμα

#### Συμπύκνωση

Το *flow through* από τη στήλη με τα σφαιρίδια *GST* (βήμα 9) που περιείχε το επιθυμητό ένζυμο, συμπυκνώθηκε χρησιμοποιώντας φίλτρο με κατώφλι μοριακού βάρους 10000 *Da*. Το μοριακό βάρος της *rmPhK-γ-trunc* είναι περίπου 30 *kDa* και επομένως δεν διαπερνά το φίλτρο. Το φίλτρο βρίσκεται σε ένα σωλήνα που κλείνει και μπορεί να τοποθετηθεί στη φυγόκεντρο.

Πειραματική διαδικασία: Αρχικά το φίλτρο ξεπλύθηκε με *dH<sub>2</sub>O*, προσθέτοντας *dH<sub>2</sub>O* και βάζοντας το για φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, 2 *ml* του δείγματος προστέθηκαν στο φίλτρο και το φίλτρο τοποθετήθηκε για φυγοκέντρηση στα 4000 *g* για 2 *min* στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση 1 *ml* από αυτό που είχε περάσει από το φίλτρο αφαιρέθηκε και 1 *ml* δείγματος προστέθηκε και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση. Αυτή η διαδικασία συνεχίστηκε μέχρι να περάσει όλο το δείγμα από το φίλτρο και η φυγοκέντρηση συνεχίστηκε μέχρι να συμπυκνωθεί το δείγμα στα 100  $\mu$ L. Τέλος έγινε προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο *Bradford* για την οποία γίνεται λόγος παρακάτω.

### 11<sup>ο</sup> βήμα

#### Αποθήκευση της κινάσης της φωσφορυλάσης

Για την αποθήκευση της κινάσης που απομονώθηκε (*rmPhK-γ-trunc*) προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης και φυλάχθηκε στους -20 °C (50 % γλυκερόλη (v/v)).

#### Ηλεκτροφόρηση μετά από κάθε βήμα καθαρισμού

Μετά το πέρασμα του δείγματος από κάθε στήλη χρωματογραφίας (βήματα 6, 7 και 8) πραγματοποιούταν μια ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων της χρωματογραφίας σε γέλη πολυακρυλαμίδιου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες. Σκοπός αυτής της ηλεκτροφόρησης ήταν η επιβεβαίωση ότι λαμβάνουμε την επιθυμητή πρωτεΐνη μετά από κάθε βήμα καθαρισμού αλλά και ο έλεγχος της καθαρότητάς της.

Η ηλεκτροφόρηση, είναι η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων (συνήθως πρωτεϊνικής ή νουκλεϊκής φύσεως) από ένα μίγμα τους. Με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ένα φορτισμένο σωματίδιο θα μετακινηθεί. Η ταχύτητα μετακίνησης κάθε μορίου σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης και τον συντελεστή τριβής. Η ηλεκτροστατική δύναμη που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου και του μέσου. Ο συντελεστής τριβής εξαρτάται από τη μάζα και

το σχήμα του μορίου που μετακινείται καθώς και από το ιξώδες του μέσου. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με του πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα διαμέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. [10]

Στη συγκεκριμένη περίπτωση έχουμε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (*SDSPAGE*), όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει της μάζας τους. Το *SDS*, ένα ανιοντικό απορρυπαντικό καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης και έτσι προκύπτουν οι αποδιατακτικές συνθήκες της ηλεκτροφόρησης.

Πειραματική διαδικασία: Αρχικά έγινε παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Η πηκτή που πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση είχε δύο φάσεις: την πηκτή συσώρευσης και την πηκτή διαχωρισμού. Η ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη γίνεται κάθετα και η πηκτή διαχωρισμού βρίσκεται στο κάτω μέρος.

Τα συστατικά για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού είναι:

- > *Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution*
- > Διάλυμα *SDS* (Δωδεκανοθειϊκό νάτριο) 10%
- > Διάλυμα *Tris* 1.5 M, pH 6.8
- > Διάλυμα Υπερθειϊκού Αμμώνιου 10%
- > *TEMED* (N, N, -τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη)
- > *dH<sub>2</sub>O*

Ανάλογα με το πόσο πυκνή πρέπει να είναι η πηκτή προστίθενται διαφορετικές ποσότητες από τα παραπάνω συστατικά. Το πόσο πυκνή πρέπει να είναι εξαρτάται από το μέγεθος των πρωτεϊνών που ηλετροφορούνται. Όσο μεγαλύτερη είναι η πυκνότητα τόσο μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα μπορεί να επιτευχθεί. Το *SDS* είναι υπεύθυνο για τις αποδιατακτικές συνθήκες της ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα *Tris* είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που ρυθμίζει το pH στην πηκτή. Το ακρυλαμίδιο και το δισ-ακρυλαμίδιο είναι τα βασικότερα συστατικά της πηκτής. Το μονομερές ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται παρουσία ελευθέρων ριζών προς σχηματισμό πολυακρυλαμιδίου. Σε αυτόν τον πολυμερισμό συμμετέχει και το N, N, μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (*Bis acrylamide*), το οποίο παίζει ρόλο στη διασύνδεση των αλυσίδων που σχηματίζονται από το μονομερές ακρυλαμίδιο, σχηματίζοντας ένα δίκτυο αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου του οποίου η πυκνότητα παίζει σημαντικό ρόλο στο μέγεθος των πόρων της πηκτής και κατ' επέκταση στην αποτελεσματικότητα της ηλεκτροφόρησης. Τα συστατικά *TEMED* και υπερθειϊκό αμμώνιο προστίθενται τελευταία και ταυτόχρονα, αφού είναι αυτά που επάγουν τον πολυμερισμό. Το υπερθειϊκό αμμώνιο είναι το αντιδραστήριο σχηματισμού ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον πολυμερισμό και το *TEMED* αποτελεί καταλύτη του πολυμερισμού.



Τα συστατικά για την παρασκευή της πηκτής συσσώρευσης είναι:

- > *Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution*
- > Διάλυμα *SDS* (Δωδεκανοθειϊκό νάτριο) 10%
- > Διάλυμα *Tris* 1.0 M, pH 6.8
- > Διάλυμα Υπερθειϊκού Αμμώνιου 10%
- > *TEMED* (N, N, -τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη)
- > *dH<sub>2</sub>O*

Το υπερθειϊκό αμμώνιο και το *TEMED* προστίθενται πάλι στο τέλος όπως και στην πηκτική διαχωρισμού. Η πηκτική συσσώρευσης είναι απαραίτητη για την τοποθέτηση και την διάταξη όλων των δειγμάτων στη σειρά πριν εισέλθουν στην πηκτική διαχωρισμού όπου είναι πιο πυκνή και εκεί θα γίνει ο διαχωρισμός με βάση το μοριακό μέγεθος. Στο πάνω άκρο της πηκτής συσσώρευσης σχηματίζονται οι θέσεις που θα τοποθετηθούν τα δείγματα.

Αφού παρασκευαστεί η πηκτική και τοποθετηθεί στην συσκευή της ηλεκτροφόρησης προετοιμάζονται τα δείγματα. Στα δείγματα προστέθηκε *loading buffer*, *dH<sub>2</sub>O* και θερμάνθηκαν στους 95 °C για 5 min. Το *loading buffer* περιέχει *Tris* 60 mM, γλυκερόλη 10 %, *SDS* 2 %, β-μερκαπτοαιθανόλη 1.25 % και *bromophenol blue* 0.01 %. Το *SDS* συμβάλει στις αποδιατακτικές συνθήκες, η γλυκερόλη προσθέτει βάρος στο δείγμα ώστε να τοποθετηθεί σωστά στη θέση του στην πηκτική και να μην ξεφύγει και ο έγχρωμος δείκτης μας δείχνει την πρόοδο της ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις κατάλληλες θέσεις στην πηκτική και εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο. Αρχικά εφαρμόστηκε 130V μέχρι να ξεπεραστεί η πηκτική συσσώρευσης και στη συνέχεια 180V. Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκε *running buffer*. Το *running buffer* περιέχει Γλυκίνη 192 mM, *Tris* 5 mM και *SDS* 0.1 %.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, ακολούθησε ο χρωματισμός και αποχρωματισμός της πηκτικής. Πρώτα η πηκτική τοποθετήθηκε σε οξικό οξύ 10% (v/v) και στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να βράσει. Έπειτα αφαιρέθηκε το οξικό οξύ και προστέθηκε το διάλυμα χρωματισμού (μεθανόλη 40% (v/v), οξικό οξύ 10% (v/v), *coomasie brilliant blue R250* 0.1% (w/v), *dH<sub>2</sub>O*). Μετά την προσθήκη του διαλύματος χρωματισμού, η πηκτική θερμάνθηκε στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το διάλυμα χρωματισμού να βράσει και στη συνέχεια επώαστηκε υπό ανάδευση για 10 min σε αυτό. Τέλος ακολούθησε ο αποχρωματισμός με τρεις πλύσεις με οξικό οξύ 10% (v/v) και θέρμανση κάθε φορά στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το βρασμό, ώστε να μειωθεί ο θόρυβος που προκαλεί η χρώση.

#### Προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με τη μέθοδο *Bradford*.

Η μέθοδος *Bradford* είναι μια χρωματική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών που χρησιμοποιεί την χρωστική *coomasie brilliant blue G-250* η οποία προσδένεται στις πρωτεΐνες. Η σύνδεση της χρωστικής με τις πρωτεΐνες προκαλεί την αλλαγή του χρώματός της από κόκκινο σε μπλε. Στη συνέχεια το μπλε αυτό χρώμα μετράται με φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 595 nm και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών γίνεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης [20].

Πειραματική διαδικασία: Αρχικά πραγματοποιήθηκε προετοιμασία των δειγμάτων. Σε κάθε δείγμα προστίθενται  $dH_2O$  και τελευταίο το αντιδραστήριο *Bradford*.

- 20  $\mu L$  δείγμα
- 780  $\mu L$   $dH_2O$
- 200  $\mu L$  αντιδραστήριο *Bradford*

Επίσης, ετοιμάστηκε και ένας τυφλός μάρτυρας  $H_2O$  για μηδενισμό του φωτόμετρου,

- 20  $\mu L$   $dH_2O$
- 780  $\mu L$   $dH_2O$
- 200  $\mu L$  αντιδραστήριο *Bradford*

και ένας τυφλός μάρτυρας για το διάλυμα που βρίσκεται μέσα το ένζυμο.

- 20  $\mu L$  διάλυμα στο οποίο βρίσκεται μέσα το ένζυμο
- 780  $\mu L$   $dH_2O$
- 200  $\mu L$  αντιδραστήριο *Bradford*

Στη συνέχεια, τα δείγματα και οι τυφλοί μάρτυρες ανακινήθηκαν και επώστηκαν για 10 min στο σκοτάδι. Έπειτα ακολούθησε φωτομέτρηση στα 595 nm. Στη συνέχεια με τη χρήση της πρότυπης καμπύλης  $y=0,869x+0,015$  υπολογίσαμε την πρωτεϊνική συγκέντρωση.

### **5.3. Φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου**

Από την προηγούμενη πειραματική διαδικασία (§5.2.) έγινε απομόνωση της  $\gamma$ -υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης μυός κουνελιού από μετασχηματισμένα βακτήρια (*rmPhK- $\gamma$ -trunc*). Αυτή η  $\gamma$ -υπομονάδα, όπου εντοπίζεται και η καταλυτική δραστηριότητα της κινάσης (§3.5.1.), θα χρησιμοποιηθεί για τη φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που απομονώθηκε στην αρχή (§5.1.), ώστε να τη μετατρέψει, με αυτήν την ομοιοπολική τροποποίηση, από τη μορφή *b* στην μορφή *a*. Η φωσφορυλίωση γίνεται στην *Ser-14* κάθε υπομονάδας της φωσφορυλάσης και περιγράφηκε αναλυτικά στην παράγραφο §3.5.

Πειραματική διαδικασία: Αρχικά με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου *UV* και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm υπολογίστηκε η συγκέντρωση του συνολικού ενζύμου *rmGPb*. Για το μηδενισμό του φωτομέτρου χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 (50 mM  $\beta$ -φωσφογλυκερόλη ( $\beta$ -GP), 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM EDTA, pH 6.8) στο οποίο βρίσκεται η φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης μετά το μηδενισμό του φωτομέτρου, φωτομετρήσαμε το μίγμα 1000  $\mu L$  50:50:1 και 10  $\mu L$  από το πυκνό διάλυμα *rmGPb* (-20 °C). Επειδή όμως η απορρόφηση ήταν πολύ υψηλή κάναμε αραιώσεις για να είμαστε βέβαιοι για το αποτέλεσμα. Αραιώσαμε 100  $\mu L$  από το αρχικό μίγμα σε 900  $\mu L$  50:50:1 και 50  $\mu L$  από το αρχικό μίγμα σε 950  $\mu L$  50:50:1. Μετρήσαμε την οπτική απορρόφηση και των δύο αραιώσεων σε μήκος κύματος 280 nm, και έτσι υπολογίσαμε την συγκέντρωση του ενζύμου.

Το διάλυμα όπου θα πραγματοποιηθεί η φωσφορυλίωση πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- Ρυθμιστικό διάλυμα *Hepes* 1×\*, pH 8.2
- *ATP* 2 mM
- *rmPhK-γ-trunc* 10 ng/ml
- *rmGPb* 0,5 mg/ml

---

τελικός όγκος = 1862  $\mu$ L

Η φωσφορυλίωση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 1862  $\mu$ L ώστε η συγκέντρωση *rmGPb* να είναι 0,5 mg/ml. Με βάση αυτό τον όγκο, στη συνέχεια υπολογίστηκαν και οι υπόλοιπες ποσότητες ώστε να προκύψουν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις. Η *rmPhK-γ-trunc* αρχικά υπόκειται σε αραιώσεις με το διάλυμα για την αραιώση της κινάσης (ρυθμιστικό διάλυμα *Hepes* 1× pH 8.2, *BSA* 5 mg/ml, *dH<sub>2</sub>O*). Με αρχική συγκέντρωση *rmPhK-γ-trunc* 0,9 mg/ml πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές αραιώσεις με τελική συγκέντρωση 0,9  $\mu$ g/ml.

$$\begin{array}{r}
 \underline{\text{rmPhK-}\gamma\text{-trunc 0,9 mg/ml}} \\
 \downarrow \quad + 197 \mu\text{L} \text{ διάλυμα αραιώσης κινάσης} \\
 \quad \quad \quad + 3 \mu\text{L} \text{ rmPhK-}\gamma\text{-trunc 0,9 mg/ml} \\
 \underline{\text{rmPhK-}\gamma\text{-trunc 13,5 } \mu\text{g/ml Vτελικό}=200 \mu\text{L}} \\
 \downarrow \quad + 560 \mu\text{L} \text{ διάλυμα αραιώσης κινάσης} \\
 \quad \quad \quad + 40 \mu\text{L} \text{ rmPhK-}\gamma\text{-trunc 13,5 } \mu\text{g/ml} \\
 \underline{\text{rmPhK-}\gamma\text{-trunc 0,9 } \mu\text{g/ml Vτελικό}=600 \mu\text{L}}
 \end{array}$$

Από αυτήν την τελική αραιώση προστέθηκαν 20,7  $\mu$ L στον τελικό όγκο της φωσφορυλίωσης για να προκύψει τελική συγκέντρωση της κινάσης στη φωσφορυλίωση 10 ng/ml.

Αφού προστέθηκαν όλα τα απαραίτητα: ρυθμιστικό διάλυμα *Hepes*, *rmPhK-γ-trunc*, *rmGPb* και τέλος η *ATP* στις κατάλληλες συγκεντρώσεις, το μίγμα τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C για 4 ώρες. Μετά τη φωσφορυλίωση το ένζυμο φυλάσσεται στους 4 °C.

#### 5.4.Κινητικές μελέτες έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου α

Από τους σκελετικούς μύες των κονίκλων απομονώθηκε η φωσφορυλάση του γλυκογόνου *b*. Στη συνέχεια, μετά την απομόνωση και της  $\gamma$  υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης μύος κονίκλων από μετασχηματισμένα βακτήρια (§5.2) πραγματοποιήθηκε φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b*. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου *a* που προέκυψε από τη φωσφορυλίωση, υποβλήθηκε σε κινητικές μελέτες με σκοπό αρχικά τον προσδιορισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten*,  $K_M$  και τέλος τον προσδιορισμό της  $K_i$  για τους αναστολείς *KS461* και *KS510*.

\**Buffer Hepes* 4×, pH 8.2: *Tris* 200 mM, *Hepes* 200 mM, *CaCl<sub>2</sub>* 2 mM, *DTT* 8 mM, *(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg* 40 mM

#### 5.4.1. Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος

Μετά τη φωσφορυλίωση, η συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα που πραγματοποιήθηκε η φωσφορυλίωση ήταν  $0,5\text{mg/ml}$ . Στη συνέχεια για την παρασκευή των ενζυμικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις κινητικές μελέτες, υπολογίστηκε ο όγκος που πρέπει να προστεθεί από το αρχικό ενζυμικό διάλυμα ώστε η συγκέντρωση στο ενζυμικό διάλυμα των κινητικών μελετών να είναι  $0,015\text{ mg/ml}$ . Επομένως το ενζυμικό διάλυμα για τις κινητικές μελέτες που έχει τελικό όγκο  $240\ \mu\text{L}$  περιείχε τα εξής:

- $24\ \mu\text{L}$  γλυκογόνο 10% (w/v)
- $12\ \mu\text{L}$  ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 (50 mM β-φωσφογλυκερόλη (β-GP), 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM EDTA, pH 6,8)
- $7,2\ \mu\text{L}$  *rmGPa*  $0.5\text{ mg/ml}$
- $196,8\ \mu\text{L}$   $d\text{H}_2\text{O}$

---

→ τελικός όγκος ενζυμικού διαλύματος =  $240\ \mu\text{L}$

Οι τελικές συγκεντρώσεις των παραπάνω συστατικών στον όγκο του ενζυμικού διαλύματος είναι:

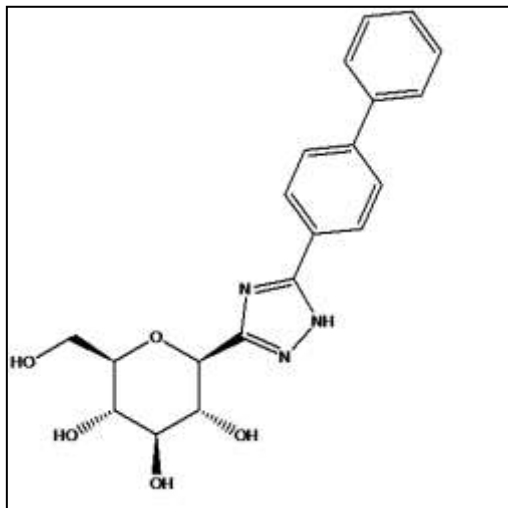
- Γλυκογόνο 1% (w/v)
- *RMGPa*  $0,015\text{ mg/ml}$
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 5% (v/v)

---

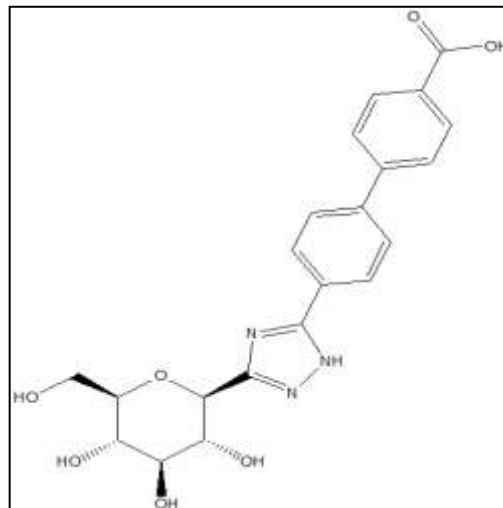
→ τελικός όγκος ενζυμικού διαλύματος =  $240\ \mu\text{L}$

#### 5.4.2. Διαλύματα των αναστολέων KS461 και KS510

Οι χημικές ενώσεις *KS461* και *KS510* συντέθηκαν σε συνεργαζόμενο εργαστήριο του καθηγητή *Somsák László* στο πανεπιστήμιο του Debrecen στην Ουγγαρία. Οι ενώσεις αυτές συντέθηκαν ως πιθανοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και οι χημικές τους δομές είναι οι εξής:



KS461



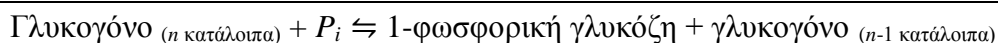
KS510

**KS461:** Για τον υπολογισμό της  $K_i$  του αναστολέα *KS461* χρησιμοποιήσαμε τις εξής συγκεντρώσεις του αναστολέα: 1  $\mu M$ , 2  $\mu M$ , 3  $\mu M$ , 4  $\mu M$ . Για να έχουμε αυτές τις συγκεντρώσεις αναστολέα στον τελικό όγκο της αντίδρασης (180  $\mu L$ ), τα διαλύματα του αναστολέα που προσθέσαμε στα διαλύματα υποστρωμάτων (§5.4.3.) είχαν συγκέντρωση του αναστολέα 5  $\mu M$ , 10  $\mu M$ , 15  $\mu M$  και 20  $\mu M$  αντίστοιχα. Σε αυτά τα διαλύματα, ο αναστολέας ήταν διαλυμένος σε *DMSO* 10% v/v. Η ποσότητα διαλύματος αναστολέα που προστέθηκε στα διαλύματα υποστρωμάτων υπολογίστηκε ώστε η συγκέντρωση του *DMSO* στην αντίδραση να είναι 2% v/v. Επομένως, με βάση αυτές τις ποσότητες υπολογίστηκαν και οι συγκεντρώσεις των πυκνών διαλυμάτων του αναστολέα που χρησιμοποιήθηκαν.

**KS510:** Για τον προσδιορισμό της  $K_i$  του αναστολέα *KS510* χρησιμοποιήσαμε τις εξής συγκεντρώσεις του αναστολέα: 0,5  $\mu M$ , 1  $\mu M$ , 1,5  $\mu M$ , 2  $\mu M$  και 3  $\mu M$ . Για να έχουμε αυτές τις συγκεντρώσεις αναστολέα στον τελικό όγκο της αντίδρασης, τα διαλύματα του αναστολέα που προσθέσαμε στα διαλύματα υποστρωμάτων (§ 5.4.3.) έχουν συγκέντρωση του αναστολέα 6,25  $\mu M$ , 12,5  $\mu M$ , 18,75  $\mu M$ , 25  $\mu M$  και 37,5  $\mu M$  αντίστοιχα. Σε αυτά τα διαλύματα, ο αναστολέας ήταν διαλυμένος σε *DMSO* 25% v/v. Όπως και στον αναστολέα *KS461*, η ποσότητα διαλύματος αναστολέα που προστέθηκε στα διαλύματα υποστρωμάτων υπολογίστηκε με βάση την απαίτηση η συγκέντρωση του *DMSO* στην αντίδραση να είναι 2% v/v. Επομένως, με βάση αυτές τις ποσότητες υπολογίστηκαν και οι συγκεντρώσεις των πυκνών διαλυμάτων του αναστολέα που χρησιμοποιήθηκαν.

#### 5.4.3. Παρασκευή διαλυμάτων υποστρώματος 1-φωσφορικής γλυκόζης

Η φωσφορυλάση καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου με την προσθήκη ορθοφωσφορικού ιόντος ( $P_i$ ) και την απελευθέρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης.



Στο πειραματικό μέρος (*in vitro*) διεξήχθη η αντίστροφη πορεία κατά την οποία το ένζυμο προσθέτει μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων ( $P_i$ ) τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν φασματοφωτομετρικά.

Τα διαλύματα των υποστρωμάτων έχουν τελικό όγκο 144  $\mu L$  και περιέχουν διάλυμα από μια συγκέντρωση 1-φωσφορική γλυκόζης (*GIP*), η οποία αποτελεί και το υπόστρωμα της αντίδρασης, νερό και το διάλυμα του αναστολέα. Κατά τον υπολογισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten* ( $K_M$ ) τα διαλύματα υποστρωμάτων δεν περιέχουν το διάλυμα του αναστολέα και ο όγκος αυτός αντικαθίσταται με *DMSO*.

Πρώτο βήμα για την παρασκευή των διαλυμάτων *GIP* αποτελεί η αραιώση ενός πυκνού διαλύματος *GIP* συγκέντρωσης 400 mM.

Η αραίωση πραγματοποιείται με τη χρήση δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων τα οποία περιείχαν τα παρακάτω:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 1: *KCl* 400 *mM*, Ιμιδαζόλιο 200 *mM*, *DTT* 4 *mM*, *EDTA* 4 *mM*, *pH* 6.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα 2: *KCl* 270 *mM*, Ιμιδαζόλιο 135 *mM*, *DTT* 2.7 *mM*, *EDTA* 2.7 *mM*, *pH* 6.8 (προκύπτει με αραίωση του ρυθμιστικού διαλύματος 1)

Αρχικά το πυκνό διάλυμα *GIP* συγκέντρωσης 400 *mM* αραιώνεται με την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος 1 και *dH<sub>2</sub>O* με σκοπό να προκύψει ένα διάλυμα *GIP* συγκέντρωσης 90 *mM*. Αυτό το διάλυμα περιέχει ιμιδαζόλιο 135 *mM*, *KCl* 270 *mM*, *DTT* 2.7 *mM*, *EDTA* 2.7 *mM*, *pH* 6.8 (ρυθμιστικό διάλυμα 2). Οι συγκεντρώσεις *GIP* που χρησιμοποιήθηκαν στις κινητικές μελέτες ήταν 45 *mM*, 27 *mM*, 18 *mM*, 13.5 *mM* και 9 *mM* και προήλθαν με αραίωση από το διάλυμα *GIP* συγκέντρωσης 90 *mM* με τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος 2. Οι συγκεντρώσεις *GIP* τελικά στον όγκο της αντίδρασης (180  $\mu$ L) ήταν 10 *mM*, 6 *mM*, 4 *mM*, 3 *mM* και 2 *mM* αντίστοιχα.

#### 5.4.4. Πειραματική διαδικασία

Το ενζυμικό διάλυμα (§ 5.4.1.) επώαστηκε για 15 λεπτά στους 30 °C ενώ τα διαλύματα υποστρωμάτων (§ 5.4.3.) τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο περίπου 3 λεπτά πριν το τέλος της επώασης του ενζυμικού διαλύματος. Τα διαλύματα των υποστρωμάτων παρασκευάστηκαν κατά την διάρκεια επώασης του ενζυμικού διαλύματος ώστε μετά το πέρας των 15 λεπτών το ένζυμο και τα υποστρώματα να είναι έτοιμα για την διεξαγωγή του πειράματος. Η 1-φωσφορική γλυκόζη προστέθηκε στα διαλύματα υποστρωμάτων λίγο πριν την τοποθέτησή τους στο υδατόλουτρο. Αυτό είναι απαραίτητο διότι η 1-φωσφορική γλυκόζη υπόκειται σε μία φυσική υδρόλυση κάτι το οποίο πρέπει να αποφευχθεί όσο το δυνατόν περισσότερο. Μετά το πέρας της επώασης, 36  $\mu$ L μεταφέρθηκαν από το ενζυμικό διάλυμα στο πρώτο διάλυμα του υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση (180  $\mu$ L). Ανά χρονικό διάστημα ενός λεπτού γινόταν λήψη δείγματος 40  $\mu$ L από το διάλυμα της αντίδρασης και προσθήκη αυτού σε σωληνάρια τύπου *ependorf* που περιείχαν 10  $\mu$ L *SDS* 1% w/v για τη αποδιάταξη και αδρανοποίηση του ενζύμου και τον τερματισμό της αντίδρασης. Στην αποδιάταξη του ενζύμου συνέβαλε και η έντονη ανάδευση με *vortex* που ακολουθούσε. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλα τα διαφορετικά διαλύματα υποστρωμάτων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων, που αποτελούν το προϊόν της αντίδρασης, με την μέθοδο του ασκορβικού οξέος. (§5.4.5.) Εκτός από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων και σε τυφλούς μάρτυρες ως προς την 1-φωσφορική γλυκόζη (λόγω της φυσικής υδρόλυσης), πρότυπα δείγματα ορθοφωσφορικών ιόντων (για τον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που παράγονται στην αντίδραση), και τυφλούς μάρτυρες του ενζυμικού διαλύματος.

Οι τυφλοί μάρτυρες παρασκευάστηκαν ως εξής:

- Νερού: 10  $\mu\text{L}$  SDS 1%, 40  $\mu\text{L}$   $d\text{H}_2\text{O}$
- Ενζύμου: 10  $\mu\text{L}$  SDS 1%, 32  $\mu\text{L}$   $d\text{H}_2\text{O}$ , 8  $\mu\text{L}$  ενζυμικού διαλύματος
- *Glc 1-phosphate*: 10  $\mu\text{L}$  SDS 1%, 31,1  $\mu\text{L}$   $d\text{H}_2\text{O}$ , 8,9  $\mu\text{L}$  *GIP* με συγκέντρωση 45  $m\text{M}$
- Φωσφορικών: 10  $\mu\text{L}$  SDS 1%, 30  $\mu\text{L}$   $d\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{L}$  *Pi* με συγκέντρωση 1  $m\text{M}$

Οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών του ενζυμικού διαλύματος στους τυφλούς μάρτυρες είναι: Γλυκογόνο 0,2 % (w/v), *rmGPa* 0,003  $\text{mg/ml}$  και 50:50:1 1% (v/v). Η τελική συγκέντρωση *GIP* στους τυφλούς μάρτυρες είναι 10  $m\text{M}$ . Τέλος, η τελική συγκέντρωση των φωσφορικών είναι 0,25  $m\text{M}$ .

Για τους αναστολείς *KS461* και *KS510* δεν πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ιόντων σε τυφλούς μάρτυρες, διότι στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν καμία από τις δύο ουσίες δεν δίνει σήμα απορρόφησης σε μήκος κύματος 850 $\text{nm}$ . Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος *GraFit*. [21]

#### 5.4.5. Προσδιορισμός φωσφορικών

Τα ορθοφωσφορικά ιόντα που παράγονται ως προϊόν της αντίδρασης προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο του ασκορβικού οξέος. Τα ορθοφωσφορικά ιόντα που προκύπτουν από την αντίδραση δημιουργούν σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία  $\text{Zn}^{2+}$  σε  $p\text{H}$ : 5. Στη συνέχεια το σύμπλοκο αυτό ανάγεται από το ασκορβικό και παράγει ένα χρωμοφόρο που έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850  $\text{nm}$ . Έτσι με τη φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850  $\text{nm}$  μπορούμε να υπολογίσουμε την ποσότητα των ορθοφωσφορικών ιόντων σε ένα διάλυμα. [19]

Πειραματική διαδικασία: Αρχικά παρασκευάστηκαν τα απαραίτητα διαλύματα για αυτή τη διαδικασία. Αυτά τα διαλύματα πρέπει να παρασκευάζονται την ίδια μέρα που θα πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων και κατά τη χρήση τους να έχουν θερμοκρασία δωματίου.

→ Διάλυμα μολυβδαινίου,  $p\text{H}$  5.0. (Ρύθμιση  $p\text{H}$  με  $\text{HCl}$  10  $M$ )

- μολυβδαινικό αμμώνιο 15  $m\text{M}$
- οξικό ψευδάργυρο 100  $m\text{M}$

→ Διάλυμα ασκορβικού οξέος,  $p\text{H}$  5.0. (Ρύθμιση  $p\text{H}$  με  $\text{NaOH}$  10  $M$ )

- Ασκορβικό οξύ 10% (w/v)

Αυτά τα διαλύματα μετά την παρασκευή τους πρέπει να διατηρούνται σε δοχείο με σκούρο τοίχωμα γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Στη συνέχεια, αναμίχτηκαν με αναλογία όγκου διαλύματος μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος 4:1. Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται 15  $\text{min}$  μετά από την παρασκευή του, δηλαδή την ανάμιξη, και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3 $\text{hrs}$ ).

Στα δείγματα που προέκυψαν από το κινητικό πείραμα και στους τυφλούς μάρτυρες προστέθηκαν 700  $\mu\text{L}$  από το παραπάνω μίγμα. Μετά από ισχυρή ανάμιξη με *vortex* τοποθετήθηκαν και επώαστηκαν στο υδατόλουτρο με θερμοκρασία 30  $^\circ\text{C}$  για 15 $\text{min}$ . Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος 850  $\text{nm}$ . Τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα *GraFit*.

#### 5.4.6. Προσδιορισμός της επιτυχίας της φωσφορυλίωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* (*rmGPb*) από την $\gamma$ -υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης (*rmPhK- $\gamma$ -trunc*).

Πριν τον προσδιορισμό της σταθεράς *Michaelis–Menten* πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα με σκοπό την επιβεβαίωση της επιτυχίας της φωσφορυλίωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* (*rmGPb*) από την  $\gamma$ -υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης (*rmPhK- $\gamma$ -trunc*). Αρχικά παρασκευάστηκε ένα ενζυμικό διάλυμα, το οποίο επωάστηκε για 15 min στο υδατόλουτρο στους 30 °C. Στη συνέχεια, προετοιμάστηκαν δύο διαλύματα υποστρωμάτων το ένα παρουσία 1 mM AMP και το άλλο απουσία AMP, χρησιμοποιώντας το διάλυμα GIP με συγκέντρωση 90 mM όπου η τελική συγκέντρωση GIP στην αντίδραση είναι 20 mM.

Τελική συγκέντρωση	[20 mM]	[20 mM]
GIP	40 $\mu$ L από 90mM	40 $\mu$ L από 90mM
DMSO 10%	36 $\mu$ L	36 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	68 $\mu$ L	60,8 $\mu$ L
AMP 25 mM	-	7,2 $\mu$ L

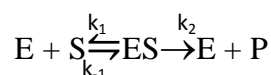
Ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο §5.4.4. και υπολογίστηκαν οι ειδικές δραστηριότητες και για τις δύο συνθήκες.

#### 5.4.7. Προσδιορισμός σταθεράς *Michaelis-Menten* ( $K_M$ )

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων είναι:

- ο το pH,
- η θερμοκρασία,
- η συγκέντρωση του ενζύμου
- και η συγκέντρωση του υποστρώματος

Η ενζυμική κινητική ασχολείται με την σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του υποστρώματος και της ταχύτητας κατάλυσης μιας αντίδρασης από ένα ένζυμο. Η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος και στη συνέχεια αρχίζει να σταθεροποιείται, να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος και να είναι σχεδόν ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Το 1913, ο *Leonor Michaelis* και η *Maud Menten* πρότειναν ένα απλό μοντέλο που εξηγεί αυτά τα κινητικά χαρακτηριστικά. Οι *Michaelis* και *Menten* βασίστηκαν στη σχέση:



Όπου:

- *E*: ένζυμο
- *S*: υπόστρωμα
- *ES*: σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος
- *P*: προϊόν



Το ένζυμο  $E$  αντιδρά με το υποστρώμα  $S$  για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο  $ES$  με μια κινητική σταθερά  $k_1$ . Το σύμπλοκο  $ES$  μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους. Μπορεί να διασπαστεί σε  $E$  και  $S$  με κινητική σταθερά  $k_{-1}$ , ή να σχηματίσει προϊόν  $P$  με μια κινητική σταθερά  $k_2$ .

Τελικά κατέληξαν σε μια εξίσωση που εκφράζει την ταχύτητα της αντίδρασης, την εξίσωση *Michaelis-Menten* :

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

Όπου:

- $V_0$  : ταχύτητα της αντίδρασης
- $[S]$ : συγκέντρωση του υποστρώματος
- $V_{max}$ : μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης
- $K_M$ : σταθερά *Michaelis-Menten* που ορίζεται ως  $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

Η σταθερά *Michaelis-Menten* ( $K_M$ ) έχει μονάδες συγκέντρωσης. [10]

Πειραματική διαδικασία: Αρχικά παρασκευάζεται το ενζυμικό διάλυμα (§ 5.4.1.) και τοποθετείται για επώαση 15 min στους 30 °C στο υδατόλουτρο. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης επομένως και 5 διαφορετικά διαλύματα υποστρωμάτων. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις *GIP* προέκυψαν από αραιώση διαλύματος *GIP* 400 mM σε 90 mM με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 1 και στη συνέχεια οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις που απαιτούνται, με αραιώση του διαλύματος *GIP* 90 mM με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 2. Τελικά στον όγκο της αντίδρασης (180  $\mu$ L) οι συγκεντρώσεις *GIP* ήταν 10 mM, 6 mM, 4 mM, 3 mM και 2 mM.

Τα διαλύματα των υποστρωμάτων τελικά ήταν τα εξής:

Τελική συγκέντρωση	[2 mM]	[3 mM]	[4 mM]	[6 mM]	[10 mM]
<i>GIP</i>	40 $\mu$ L από 9 mM	40 $\mu$ L από 13,5 mM	40 $\mu$ L από 18 mM	40 $\mu$ L από 27 mM	40 $\mu$ L από 45 mM
<i>DMSO</i> 10%	36 $\mu$ L	36 $\mu$ L	36 $\mu$ L	36 $\mu$ L	36 $\mu$ L
<i>dH<sub>2</sub>O</i>	68 $\mu$ L	68 $\mu$ L	68 $\mu$ L	68 $\mu$ L	68 $\mu$ L

Κατά τον προσδιορισμό της  $K_M$  στη θέση του αναστολέα προστίθεται *DMSO* 10% v/v. Η τελική συγκέντρωση του *DMSO* στην αντίδραση πρέπει να είναι 2% v/v.

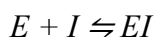
Αφού ολοκληρωθεί η επώαση του ενζυμικού διαλύματος αλλά και των διαλυμάτων υποστρωμάτων ακολουθεί και η υπόλοιπη πειραματική διαδικασία όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο § 5.4.4.

Με την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της φωτομέτρησης στο πρόγραμμα *GraFit* υπολογίζεται η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου για κάθε διαφορετική συγκέντρωση υποστρώματος *GIP*. Η ειδική δραστηριότητα (*Specific Activity*,  $\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{mg}}$ ) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου. Ορίζεται ως τα

mg του ενζύμου που σε καθορισμένες συνθήκες (συγκέντρωση ενζύμου, συγκέντρωση υποστρώματος, θερμοκρασία κτλ.) προκαλούν μετατροπή 1  $\mu\text{mol}$  υποστρώματος (ή παρασκευή 1  $\mu\text{mol}$  προϊόντος), ανά 1 λεπτό. Η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten* ( $K_M$ ).

#### 5.4.8. Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής ( $K_i$ )

Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο, έτσι, ώστε να αποκαθίστανται μια κατάσταση ισορροπίας:



Όπου:

- $E$ : το ένζυμο
- $I$ : ο αναστολέας
- $EI$ : σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα

Η σταθερά διάστασης του συμπλόκου  $EI$ , ή με άλλα λόγια η σταθερά αυτής της αμφίδρομης αντίδρασης δίνεται από τη σχέση:

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

Αυτή η σταθερά  $K_i$  είναι η σταθερά αναστολής. Η σταθερά αναστολής  $K_i$  είναι ένας δείκτης της ισχύς ενός αναστολέα.

Για τον πειραματικό υπολογισμό της σταθεράς αναστολής απαιτείται ο προσδιορισμός των φαινομενικών τιμών (*apparent values*) της σταθεράς  $K_M$  και της μέγιστης ταχύτητας  $V_{max}$  και συμβολίζονται ως  $K_{M(app.)}$  και  $V_{max(app.)}$ . Οι φαινομενικές αυτές τιμές υπολογίζονται όπως υπολογίζεται και η  $K_M$  και  $V_{max}$  χωρίς τον αναστολέα, αφού το ένζυμο και παρουσία αναστολής εξακολουθεί να ακολουθεί την κινητική των *Michaelis* και *Menten*. [10]

##### 5.4.8.1. Προσδιορισμός $K_i$ του αναστολέα *KS461*

Για τον προσδιορισμό της  $K_i$  του αναστολέα *KS461* αρχικά υπολογίστηκαν οι  $K_{M(app.)}$  για τις επιθυμητές συγκεντρώσεις του αναστολέα οι οποίες ήταν: 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  και 4  $\mu\text{M}$ . Για να έχουμε αυτές τις συγκεντρώσεις αναστολέα στον τελικό όγκο της αντίδρασης, τα διαλύματα του αναστολέα που προστέθηκαν στα υποστρωματικά διαλύματα (§ 5.4.3.) είχαν αρχική συγκέντρωση 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  και 20  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα. Για κάθε συγκέντρωση αναστολέα πραγματοποιήθηκε ένα κινητικό πείραμα με αποτέλεσμα τον υπολογισμό μιας  $K_{M(app.)}$  χρησιμοποιώντας πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος *GIP*, όπως και στον υπολογισμό της  $K_M$  (§ 5.4.6.). Στη θέση του *DMSO* 10% v/v προστέθηκαν κάθε φορά 36  $\mu\text{L}$  από ένα διάλυμα αναστολέα με διαφορετική συγκέντρωση (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  και 20  $\mu\text{M}$ ). Αφού υπολογίστηκαν οι  $K_{M(app.)}$  για κάθε συγκέντρωση αναστολέα με βάση αυτά τα δεδομένα υπολογίστηκε η  $K_i$  με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος *GraFit*.

#### 5.4.8.2. Προσδιορισμός $K_i$ του αναστολέα *KS510*

Με τον ίδιο τρόπο όπως και στον αναστολέα *KS461*, έγινε ο υπολογισμός της  $K_i$  του αναστολέα *KS510*. Υπολογίστηκαν οι  $K_{M(app.)}$  για τις επιθυμητές συγκεντρώσεις του αναστολέα οι οποίες ήταν: 0,5  $\mu M$ , 1  $\mu M$ , 1,5  $\mu M$ , 2  $\mu M$  και 3  $\mu M$ . Για να έχουμε αυτές τις συγκεντρώσεις αναστολέα στον τελικό όγκο της αντίδρασης, τα διαλύματα του αναστολέα που προστέθηκαν στα διαλύματα υποστρωμάτων (§ 5.4.3.) είχαν συγκέντρωση 6,25  $\mu M$ , 12,5  $\mu M$ , 18,75  $\mu M$ , 25  $\mu M$  και 37,5  $\mu M$  αντίστοιχα. Όμως, σε αντίθεση με τον αναστολέα *KS461*, στη θέση του *DMSO* 10% v/v προστέθηκαν κάθε φορά 14,4  $\mu L$  από ένα διάλυμα αναστολέα με διαφορετική συγκέντρωση, διότι ο αναστολέας αυτός είναι διαλυμένος σε *DMSO* 25% v/v και στην αντίδραση θέλουμε *DMSO* 2% v/v. Ακολούθως προσαρμόστηκε ο όγκος του νερού που προστέθηκε στα 89,6  $\mu L$ .

## 6. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί ένα ένζυμο-κλειδί για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. Μπορεί να αποτελέσει στόχο φαρμάκων με σκοπό τη μείωση της γλυκόζης στο αίμα των διαβητικών ασθενών, αφού η ισομορφή του ήπατος της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν αισθητήρα γλυκόζης για τα ηπατικά κύτταρα με αποτέλεσμα να ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Η φωσφορυλάση δρα αποικοδομώντας το γλυκογόνο με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της γλυκόζης στην κυκλοφορία. Η αδυναμία της ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, που χαρακτηρίζει τον διαβήτη τύπου II, οφείλεται στην μειωμένη αντίδραση των κυττάρων στην δράση της ινσουλίνης. Επιπλέον έχει φανεί ότι η εκτεταμένη γλυκογονόλυση στους διαβητικούς ασθενείς αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα που οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Επομένως, η μείωση της απελευθέρωσης της γλυκόζης από τη διάσπαση του γλυκογόνου θα μπορούσε να είναι ένας πολύ πετυχημένος τρόπος μείωσης της υπεργλυκαιμίας του διαβήτη.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί ένα ένζυμο με πολύ σημαντική δράση για τον οργανισμό αλλά και με πολύ περίτεχνη ρύθμιση. Η πολυπλοκότητα του ενζύμου, τα πολλά κέντρα πρόσδεσης και τα πολλά σημεία ελέγχου της λειτουργίας του, το καθιστούν ένα σημαντικό και πετυχημένο στόχο για μόρια-φάρμακα για το διαβήτη τύπου II.

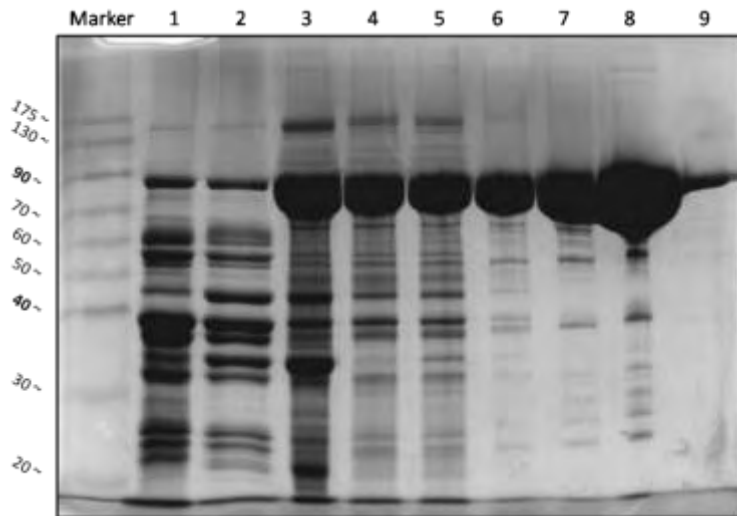
Στην συγκεκριμένη εργασία έγινε έρευνα για τη δράση δύο αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής τους.

### **6.1. Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* από σκελετικούς μύες κουνελιών ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus***

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής των δύο αναστολέων που μελετήθηκαν, έπρεπε αρχικά να απομονωθεί η φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μύες κονίκλων (*rmGPb*). Παρ' όλο που ο φαρμακευτικός στόχος είναι η ηπατική ανθρώπινη φωσφορυλάση, συνηθίζεται να πραγματοποιούνται μελέτες στην μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου κονίκλων, λόγω της εύκολης διαθεσιμότητας και απομόνωσης αλλά και λόγω παραγωγής καλύτερων κρυστάλλων του ενζύμου για κρυσταλλογραφικές μελέτες. Το γεγονός αυτό δεν επηρεάζει την έρευνα διότι οι δύο ισομορφές έχουν ομοιότητα πάνω από 85 % και πιο συγκεκριμένα τα ενεργά κέντρα και στις δύο ισομορφές είναι πανομοιότυπα όσον αφορά την αμινοξική αλληλουχία αλλά και τη δομή.[14]

Στην παράγραφο §5.1. περιγράφηκε η πειραματική διαδικασία της απομόνωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b*. Μετά από κάθε βήμα της διαδικασίας της απομόνωσης λήφθηκαν δείγματα και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση αυτών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



**Εικόνα 8:** Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνικών δειγμάτων που συλλέχθηκαν μετά από σημαντικά βήματα της διαδικασίας της απομόνωσης. Στην πρώτη διαδρομή φαίνεται ο μάρτυρας. Στην διαδρομή 1 εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά τη διήθηση από το χωνί Buchner (2<sup>ο</sup> βήμα της απομόνωσης). Στην διαδρομή 2 εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο (3<sup>ο</sup> βήμα της απομόνωσης). Στην διαδρομή 3 εμφανίζεται το δείγμα πριν την διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.0001 M (3<sup>ο</sup> βήμα της απομόνωσης). Στην διαδρομή 4 εμφανίζεται το δείγμα μετά τη διαπίδυση και τη φυγοκέντρηση του 4ου βήματος της απομόνωσης. Στην διαδρομή 5 εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά τη θερμική επεξεργασία σε υψηλό pH και τη διαύγαση του διαλύματος (4<sup>ο</sup> βήμα της απομόνωσης). Στην διαδρομή 6 εμφανίζεται το δείγμα μετά την κρυστάλλωση και την ακόλουθη συλλογή των κρυστάλλων, την διαλυτοποίηση και τη διαύγαση (5<sup>ο</sup> βήματος της απομόνωσης). Στην διαδρομή 7 εμφανίζεται το δείγμα μετά τη δεύτερη ανακρυστάλλωση στο τέλος του 5ου βήματος της απομόνωσης. Στην διαδρομή 8 εμφανίζεται το δείγμα μετά την τρίτη ανακρυστάλλωση. Στην τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την προσθήκη ίσου όγκου γλυκερόλης πριν να φυλαχτεί στους -20°C.

Παρατηρούμε ότι κατά τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων αυξάνεται η ποσότητα και η καθαρότητα της πρωτεΐνης. Η τελική απόδοση της απομόνωσης ήταν:

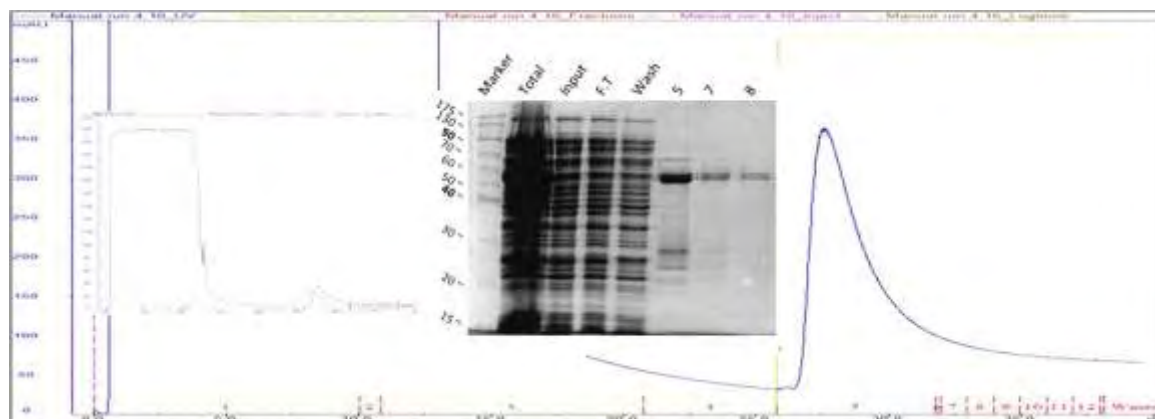
**1,8 g rmGPb** από μυϊκό ιστό τριών αρσενικών κονίκλων (2,04 kg)

## **6.2. Απομόνωση της $\gamma$ -υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης μυός κουνελιού από βακτήρια (*rmPhK- $\gamma$ -trunc*)**

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπάρχει σε δύο αλληλομετατροπόμενες μορφές: την φωσφορυλάση *a* (*GPa*) και την φωσφορυλάση *b* (*GPb*). Η μετατροπή από την *GPb* στην *GPa* πραγματοποιείται με ομοιοπολική τροποποίηση και συγκεκριμένα μια αντιστρεπτή φωσφορυλίωση στη Ser-14 κάθε υπομονάδας της φωσφορυλάσης. Η φωσφορυλίωση αυτή καταλύεται από την κινάση της φωσφορυλάσης. Στην παράγραφο §5.2. περιγράφηκε η απομόνωση της  $\gamma$ -υπομονάδας της μυϊκής κινάσης της φωσφορυλάσης κονίκλων από μετασχηματισμένα βακτήρια. Σκοπός αυτής της απομόνωσης ήταν η χρήση του ενζύμου για φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *rmGPb* που η διαδικασία απομόνωσης της περιγράφηκε στην παράγραφο §5.1.

Για τον καθαρισμό της *rmPhK- $\gamma$ -trunc* από το σύνολο των πρωτεϊνών των βακτηρίων μετά την καλλιέργεια και τη λύση των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία με τρεις διαφορετικές στήλες χρωματογραφίας.

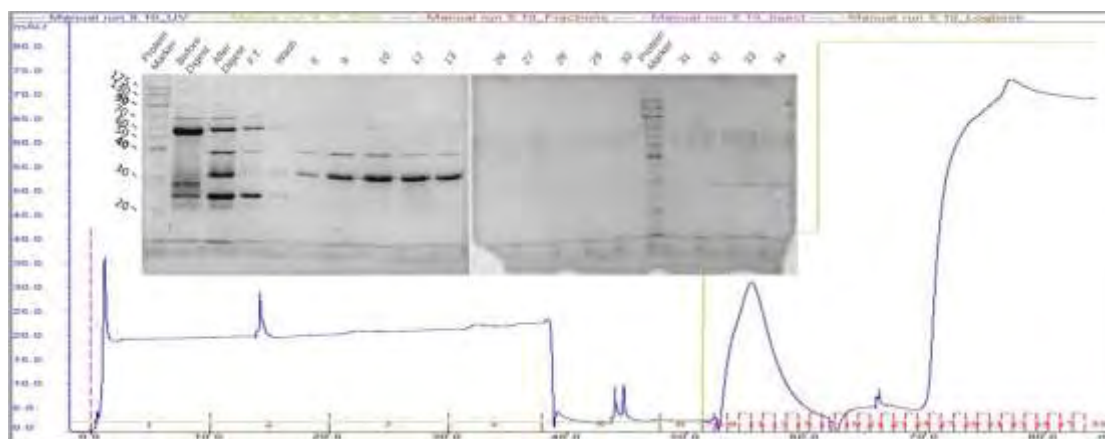
Αρχικά, για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η *Protino® GST/4B* της *Macherey-Nagel* που είναι μια στήλη χρωματογραφίας συγγένειας *GST*.



**Εικόνα 9:** Χρωματογράφημα της *Protino® GST/4B*, στήλης χρωματογραφίας *GST*.

Στην εικόνα 9 παρουσιάζονται το χρωματογράφημα και η ανάλυση με SDS-PAGE των κλασμάτων που προέκυψαν. Στο αριστερό μέρος της εικόνας φαίνεται ολόκληρο το χρωματογράφημα το οποίο είναι ένα διάγραμμα της απορρόφησης του δείγματος που εξέρχεται από τη στήλη προς τα *mL* του δείγματος που εξέρχονται από τη στήλη (στο κάτω μέρος φαίνονται και τα κλάσματα που έχουν συλλεχτεί τα δείγματα). Στην αρχή, φαίνεται το *flow through* όπου οι τιμές της απορρόφησης είναι υψηλές αφού περνάει μεγάλη συγκέντρωση πρωτεϊνών, οι οποίες δεν προσδέθηκαν στη στήλη. Στη συνέχεια, η απορρόφηση πέφτει αφού με τη διαδικασία της πλύσης η στήλη ξεπλένεται από τις μη ισχυρά προσδεσμένες πρωτεΐνες έως ότου να μην εξέρχονται άλλες από τη στήλη. Έπειτα ακολουθεί η έκλυση της κινάσης και βλέπουμε μια απότομη άνοδο της απορρόφησης που σχηματίζει μια κορυφή στο χρωματογράφημα. Αυτή η αύξηση εκπροσωπεί την κινάση, η οποία εκλούστηκε με το πέρασμα από τη στήλη του διαλύματος B. Με την πράσινη γραμμή φαίνεται η προσθήκη του διαλύματος B και επομένως η αύξηση της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης, η οποία προκαλεί την έκλυση της κινάσης. Στη δεξιά μεριά της εικόνας φαίνεται σε μεγέθυνση η κορυφή έκλυσης της κινάσης. Σε αυτή τη μεγέθυνση παρατηρούμε ότι η πρωτεΐνη μας έχει εκλουστεί στα κλάσματα 5, 7 και 8 (στο κάτω μέρος του διαγράμματος). Στο κέντρο της εικόνας παρουσιάζεται η γέλη της ηλεκτροφόρησης που πραγματοποιήθηκε μετά την χρωματογραφία. Στην πρώτη διαδρομή παρουσιάζεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. Στις επόμενες τέσσερις διαδρομές παρουσιάζονται τα εξής δείγματα: *Total*: το σύνολο των πρωτεϊνών πριν τη φυγοκέντρηση του βήματος 5 της απομόνωσης, *Input*: το δείγμα που εισάγαμε στη στήλη, *Flow through (FT)*, και *wash*. Σε αυτές τις διαδρομές βλέπουμε πολλές πρωτεΐνες σε όλο το εύρος των μεγεθών του μάρτυρα. Στις επόμενες όμως διαδρομές (κλάσματα 5, 7, 8) παρατηρούμε κατά κύριο λόγο μία μεγάλη ζώνη περίπου στα 55 *kDa* που αντιπροσωπεύει την κινάση της φωσφορυλάσης. Αυτά τα κλάσματα προήλθαν μετά την έκλυση γι' αυτό και σε αυτά φαίνεται πολύ καθαρή η ζώνη της κινάσης με κάποιες άλλες πολύ πιο αχνές ζώνες σε άλλα μεγέθη. Η ζώνη της κινάσης βρίσκεται περίπου στα 55 *kDa* διότι φέρει ακόμα το *GST-tag*.

Στη συνέχεια, ακολούθησε πέψη της *rmPhK-γ-trunc* με την πρωτεάση 3C για την απομάκρυνση του *GST-tag*. Μετά την πέψη, πραγματοποιήθηκε μια ακόμα χρωματογραφία με τη χρήση της στήλης *Hi Trap Blue sepharose HP* από την *GEHealthCare* για την επίτευξη ακόμα μεγαλύτερης καθαρότητας της κινάσης της φωσφορυλάσης που θέλουμε να απομονώσουμε.

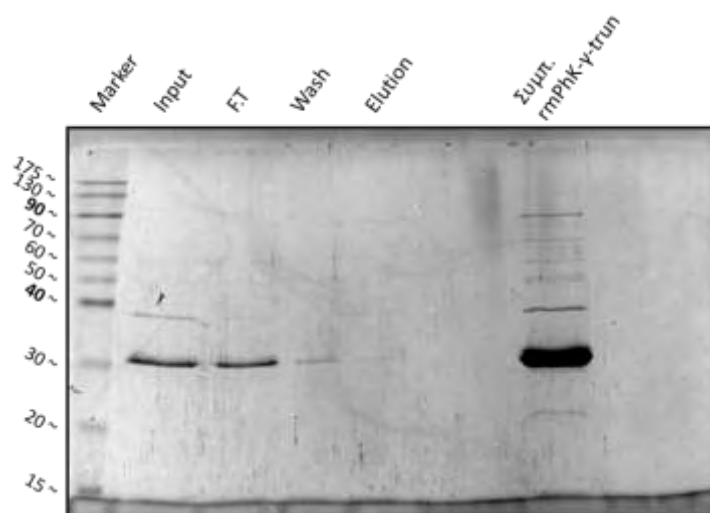


**Εικόνα 10** :Χρωματογράφημα της *Hi Trap Blue sepharose HP* στήλης χρωματογραφίας και τζέλ ηλεκτροφόρησης.

Στην εικόνα 10 παρουσιάζεται ολόκληρο το χρωματογράφημα, το οποίο είναι ένα διάγραμμα της απορρόφησης του δείγματος που εξέρχεται από τη στήλη προς τα *ml* του δείγματος που εξέρχονται από τη στήλη (στο κάτω μέρος φαίνονται και τα κλάσματα που έχουν συλλεχτεί τα δείγματα). Στην αρχή, φαίνεται το *flow through* (κλάσματα 1, 2, 3, 4), όπου οι τιμές της απορρόφησης είναι υψηλές αφού περνάει μεγάλη συγκέντρωση πρωτεϊνών. Έπειτα έγινε η πλύση της στήλης (κλάσματα 5, 6) όπου έχουμε μικρή απορρόφηση γιατί κατά το ξεπλυμα της στήλης με το διάλυμα A εξέρχονται ελάχιστες πρωτεΐνες που δεν έχουν προσδεθεί ισχυρά στη στήλη. Μετά τη πλύση έχουμε την έκλυση. Η έκλυση σε αυτή τη στήλη έγινε σε δύο βήματα και όπως φαίνεται και στο χρωματογράφημα έχουμε δύο κορυφές έκλυσης. Η *rmPhK-γ-trunc* που είχε παραμείνει μέσα στη στήλη εκλύεται με την αύξηση της συγκέντρωσης *NaCl* με την προσθήκη του διαλύματος B. Η αύξηση της συγκέντρωσης γίνεται σε δύο βήματα όπως φαίνεται και από την πράσινη γραμμή. Αρχικά γίνεται έκλυση της *rmPhK-γ-trunc* με *NaCl* 1 M και στη συνέχεια αυξήσαμε τη συγκέντρωση στα 2 M για την απομάκρυνση από τη στήλη τυχόν ισχυρών συνδέσεων. Οι δύο κορυφές έκλυσης αποτελούν την αύξηση της απορρόφησης του δείγματος που εξέρχεται από τη στήλη. Η *rmPhK-γ-trunc* εκλούστηκε στην πρώτη κορυφή. Στα αποτελέσματα από το *SDS-PAGE* παρατηρούμε στην πρώτη διαδρομή τον μάρτυρα γνωστών μεγεθών. Στην συνέχεια έχουμε μια διαδρομή με δείγμα πριν την τμήση του *GST-tag* από την 3C (*before digest.*) και μια μετά (*after digest*). Το *after digest* είναι και αυτό που εισήχθη στη στήλη (*input*). Έπειτα ακολουθεί το *flow through* και το *wash*. Τέλος, οι διαδρομές με τα νούμερα 8, 9, 10, 12, 13, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 αποτελούν τα κλάσματα που προέκυψαν από τα δύο βήματα της έκλυσης της κινάσης. Μεταξύ των διαδρομών 30 και 31 φαίνεται ακόμα ένας μάρτυρας για τη διευκόλυνση στην παρατήρηση και την ερμηνεία της πηκτής.

Συγκρίνοντας τις διαδρομές *before* και *after digest* παρατηρούμε ότι πριν την πέψη έχουμε μια έντονη ζώνη περίπου στα 55 *kDa* που αντιπροσωπεύει την *rmPhK-γ-trunc* μαζί με το *GST-tag* ενώ μετά την πέψη παρατηρούμε δύο έντονες ζώνες μια περίπου στα 30 *kDa* και μια περίπου στα 25 *kDa* που αντιπροσωπεύουν την κινάση και την *GST*, αντίστοιχα. Επίσης, παρατηρείται και μια ζώνη κοντά στα 40 *kDa* που αντιπροσωπεύει την πρωτεάση 3C. Στο *flow through* παρατηρούμε ότι δεν χάνεται η κινάση αλλά απομακρύνεται η *GST* και κάποιες άλλες πρωτεΐνες. Τέλος, στα κλάσματα από το πρώτο βήμα της έκλουσης παρατηρούμε την έκλουση της κινάσης αλλά και μια λιγότερο έντονη ζώνη της 3C, ενώ στο δεύτερο βήμα της έκλουσης οι ζώνες δεν φαίνονται σχεδόν καθόλου διότι η κινάση απομακρύνθηκε από τη στήλη στο πρώτο βήμα έκλουσης.

Μετά τη στήλη *Hi Trap Blue sepharose HP* παρατηρούμε μια αύξηση της καθαρότητας της *rmPhK-γ-trunc*. Όμως παρατηρούμε επίσης ότι η 3C δεν έχει απομακρυνθεί τελείως από το δείγμα μας. Για το λόγο αυτό ακολούθησε μια ακόμα στήλη *GST*. Αυτή τη φορά όμως ήταν μια στήλη βαρύτητας με σφαιρίδια αγαρόζης που είχαν ακινητοποιημένη *GSH*. Στόχος αυτής της χρωματογραφίας ήταν η απομάκρυνση της πρωτεάσης 3C. Η πρωτεάση 3C έφερε ένα *GST-tag*, οπότε στη συγκεκριμένη περίπτωση αυτή θα προσδενόταν μέσα στη στήλη και η κινάση θα απομακρυνόταν στο *flow through*. Για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των κλασμάτων της χρωματογραφίας. Η πηκτή φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



**Εικόνα 11:** Πηκτή χρωματογραφίας μετά την στήλη βαρύτητας με σφαιρίδια αγαρόζης που είχαν ακινητοποιημένη την *GSH*.

Στην πρώτη διαδρομή παρουσιάζεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. Στο *input* παρατηρούμε μια ζώνη σε μοριακό βάρος περίπου 30 *kDa* που αντιπροσωπεύει την *rmPhK-γ-trunc* και μια ζώνη σε μοριακό βάρος ~40 *kDa* που αντιπροσωπεύει την πρωτεάση 3C. Στην επόμενη διαδρομή, στο *flow through* παρατηρούμε ξανά τη ζώνη της *rmPhK-γ-trunc*, η οποία δεν προσδένεται στην στήλη και απομακρύνεται, ενώ η ζώνη της πρωτεάσης 3C εξαφανίζεται διότι αυτή προσδένεται στη στήλη. Στη συνέχεια ακολουθεί το κλάσμα της πλύσης της στήλης όπου παρατηρείται μια πολύ



αχνή ζώνη της *rmPhK-γ-trunc* που πιθανόν είχε μείνει μέσα στη στήλη. Στα κλάσματα της έκλουσης δεν παρατηρείται καμία ζώνη γιατί πιθανόν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης 3C από την έκλουση είναι πολύ μικρή.

Μετά την χρωματογραφία με τη στήλη αυτή ακολούθησε συμπίκνωση του *flow through* που περιείχε την *rmPhK-γ-trunc*. Μετά τη συμπίκνωση πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση (εικόνα 11) και η ζώνη της κινάσης ήταν αρκετά πιο έντονη σε σχέση με κάποια άλλες ζώνες που υπήρχαν. Αυτό δείχνει ότι επιτεύχθηκε μεγάλη καθαρότητα της κινάσης κατά τον καθαρισμό της. Τέλος υπολογίστηκε και η ενζυμική συγκέντρωση σε αυτό το τελικό δείγμα.

Η τελική απόδοση της απομόνωσης *rmPhK-γ-trunc* ήταν **0,036 mg ανά L καλλιέργειας** μετασχηματισμένων βακτηρίων.

### **6.3. Φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *rmGPb* από τη γ-υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης (*rmPhK-γ-trunc*)**

Μετά την απομόνωση της γ-υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης (*rmPhK-γ-trunc*) πραγματοποιήθηκε φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *rmGPb*, ώστε να τη μετατρέψει, με αυτήν την ομοιοπολική τροποποίηση, από την *b* στην *a* μορφή της. Η πειραματική διαδικασία περιγράφηκε στην παράγραφο §5.3. Έπειτα πραγματοποιήθηκε μία δοκιμασία για να φανεί το κατά πόσο ήταν επιτυχημένη η φωσφορυλίωση. Το πείραμα περιγράφηκε στην παράγραφο §5.4.6. Η επί τοις εκατό διαφορά μεταξύ των τιμών της ειδικής δραστηριότητας (*specific activity*) παρουσία και απουσία *AMP* ήταν  $\approx 17\%$ . Αυτό δείχνει ότι η φωσφορυλίωση πραγματοποιήθηκε με επιτυχία και το ένζυμο *rmGPa* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω πειράματα.

### **6.4. Προσδιορισμός της σταθεράς *Michaelis-Menten***

Στη συνέχεια ακολούθησαν κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten* και των σταθερών αναστολής των αναστολέων *KS461* και *KS510*. Η σταθερά *Michaelis-Menten* ( $K_M$ ) είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αλληλεπιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου αλλά εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα καθώς επίσης και από συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος όπως για παράδειγμα το *pH*, τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ. Έχει μονάδες συγκέντρωσης και είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της.

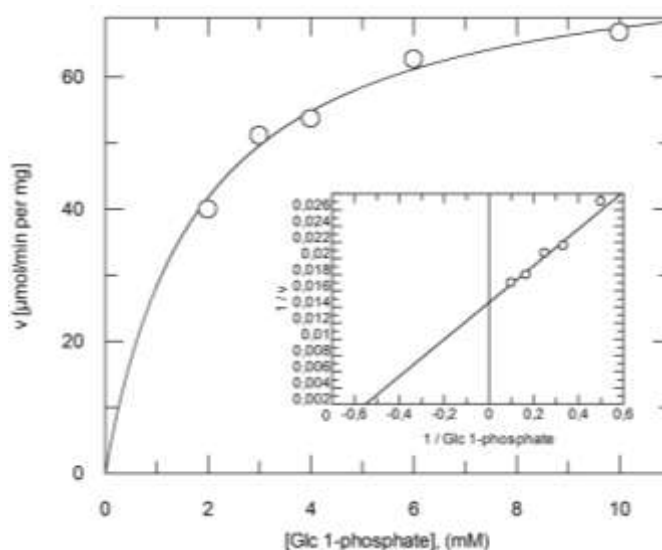
$$K_M = [S] \text{ όταν } V_o = \frac{V_{max}}{2}$$

Επομένως, όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή της  $K_M$  τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να πετύχουμε τη μισή από τη μέγιστη ταχύτητα ή αλλιώς τόσο μικρότερη είναι η ικανότητα του υποστρώματος να αντιδράσει με το ένζυμο.[10]

Η μέγιστη ταχύτητα,  $V_{max}$ , αποκαλύπτει τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα.[10]

Η σταθερά *Michaelis-Menten* ( $K_M$ ) και η μέγιστη ταχύτητα,  $V_{max}$ , υπολογίστηκαν πειραματικά με τη διαδικασία της παραγράφου § 5.4.6.

Από αυτή την πειραματική διαδικασία προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα:



**Εικόνα 12:** Η γραφική παράσταση *Michaelis-Menten*, αποτελεί διάγραμμα της ταχύτητας ( $v$ ) συναρτήσει της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων  $[S]$ . Το διάγραμμα αποτελεί μια ορθογώνια υπερβολή. Το ένθεμα αποτελεί το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (*Lineweaver-Burk*),  $1/v$  ως προς  $1/GIP$ .

Η τιμή της σταθεράς *Michaelis-Menten* και η τιμή της μέγιστης ταχύτητας υπολογίζονται από το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου ή αλλιώς διάγραμμα *Lineweaver-Burk*[22], ένα διάγραμμα του  $1/V_0$  προς  $1/[S]$ . Αυτό το διάγραμμα προκύπτει με την έκφραση της εξίσωσης *Michaelis-Menten* με τη μορφή του διπλού αντιστρόφου.

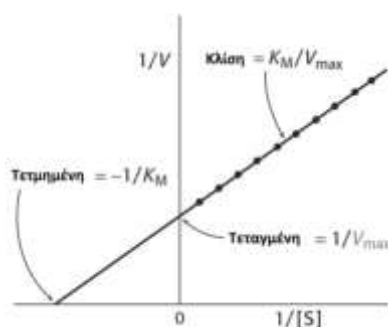
Η εξίσωση *Michaelis-Menten* όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο §5.4.6. είναι:

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

Λαμβάνοντας το αντίστροφο και των δύο πλευρών η εξίσωση γίνεται:

$$\frac{1}{V_{max}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Και το διάγραμμα του διπλού αντιστρόφου με βάση αυτή την εξίσωση είναι το εξής:



**Εικόνα 13:** Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (Lineweaver-Burk),  $1/v$  ως προς  $1/G1-P$

όπου η κλίση της ευθείας ισούται με  $K_M/V_{max}$ , το σημείο στο οποίο η ευθεία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων ισούται με  $1/V_{max}$  και το σημείο στο οποίο τέμνει τον άξονα των τεταγμένων ισούται με  $-1/K_M$ . [10]

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

- $K_M$ :  $1,82 \pm 0,23 \text{ mM}$
- $V_{max}$ :  $79,76 \pm 2,44 \text{ } \mu\text{mol/min/mg}$

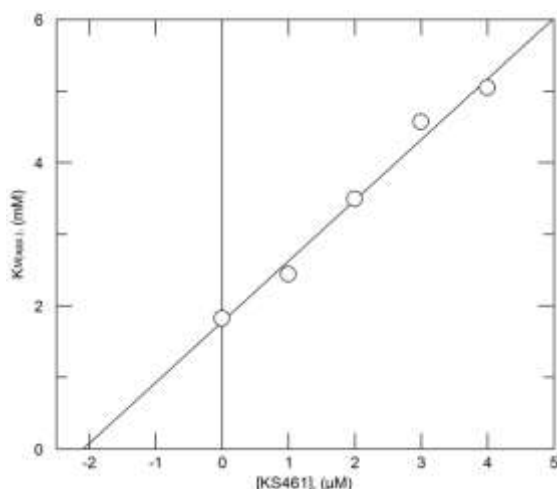
Όμως, τα αλλοστερικά ένζυμα, όπως και η φωσφορυλάση του γλυκογόνου δεν υπακούουν στην κινητική *Michaelis-Menten*. Αυτό δεν επηρέασε το πείραμα μας διότι για τις κινητικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε η *rmGPa*, η οποία έχει μεγάλη συγγένεια για το υπόστρωμα παρουσία του οποίου, μετατοπίζεται από την *T*- στην *R*-στερεοδιαμόρφωση και ως εκ τούτου είναι πλήρως δραστική. Η σιγμοειδής καμπύλη που χαρακτηρίζει την κινητική των αλλοστερικών ενζύμων δείχνει τη σταδιακή μεταβολή του ενζύμου από την κατάσταση *T* στην *R*. Έτσι, το διάγραμμα ταχύτητας-συγκέντρωσης υποστρώματος της *rmGPa* είναι ορθογώνια υπερβολή σε αντίθεση με τις σιγμοειδείς γραφικές παραστάσεις. [10]

### 6.5. Προσδιορισμός της $K_i$ του αναστολέα *KS461*

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της σταθεράς αναστολής  $K_i$  περιγράφηκε στην παράγραφο §5.4.7. Αρχικά υπολογίστηκαν οι  $K_{M(app.)}$  και  $V_{max(app.)}$  για τις συγκεντρώσεις αναστολέα  $1 \mu\text{M}$ ,  $2 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$  και  $4 \mu\text{M}$ .

<i>KS461</i> ( $\mu\text{M}$ )	$K_{M(app.)}$ (mM)
1	$2,44 \pm 0,37$
2	$3,49 \pm 0,92$
3	$4,57 \pm 0,57$
4	$5,04 \pm 0,75$

Στη συνέχεια με τη βοήθεια του προγράμματος *GraFit* κατασκευάστηκε το παρακάτω διάγραμμα από το οποίο προέκυψε η τιμή της σταθερά αναστολής  $K_i$ .



**Εικόνα 14** : Γραφική παράσταση της σταθεράς αναστολής  $K_i$  του αναστολέα *KS461*. Το διάγραμμα αποτελείται από τις  $K_{M(app.)}$  ως προς τις συγκεντρώσεις του αναστολέα *KS461*. Στον κάθετο άξονα τοποθετείται η τιμή της  $K_M$ . Η  $K_i$  του *KS461* υπολογίστηκε  $2.1 \pm 0.18 \mu M$ .

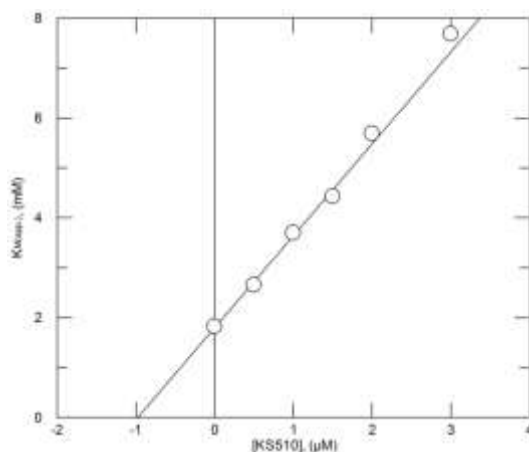
Η σταθερά αναστολής του αναστολέα *KS461* υπολογίστηκε:  $\rightarrow K_i : 2,1 \pm 0,18 \mu M$

### 6.6. Προσδιορισμός $K_i$ του αναστολέα *KS510*

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της σταθεράς αναστολής  $K_i$  περιγράφηκε στην παράγραφο §5.4.7. Αρχικά υπολογίστηκαν οι  $K_{M(app.)}$  και  $V_{max(app.)}$  για τις συγκεντρώσεις αναστολέα  $0,5 \mu M$ ,  $1 \mu M$ ,  $1,5 \mu M$ ,  $2 \mu M$  και  $3 \mu M$ .

<b><i>KS510</i>(<math>\mu M</math>)</b>	<b><math>K_{M(app.)}</math> (mM)</b>
0,5	$2,65 \pm 0,35$
1	$3,70 \pm 0,79$
1,5	$4,43 \pm 1,05$
2	$5,69 \pm 1,70$
3	$7,68 \pm 2,23$

Στη συνέχεια με τη βοήθεια του προγράμματος *GraFit* κατασκευάστηκε το παρακάτω διάγραμμα από το οποίο προέκυψε η τιμή της σταθερά αναστολής  $K_i$ .



**Εικόνα 15:** Γραφική παράσταση της σταθεράς αναστολής  $K_i$  του αναστολέα *KS510*. Το διάγραμμα αποτελείται από τις  $K_{M(app.)}$  ως προς τις συγκεντρώσεις του αναστολέα *KS510*. Στον κάθετο άξονα τοποθετείται η τιμή της  $K_M$ . Η  $K_i$  του *KS510* υπολογίστηκε  $0,98 \pm 0,04 \mu M$ .

Η σταθερά αναστολής του αναστολέα *KS510* υπολογίστηκε:  $\rightarrow K_i: 0,98 \pm 0,04 \mu M$

### 6.7. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αναστολείς *KS461* και *KS510* που είναι ανάλογα της γλυκόζης μπορούν να αναστέλλουν σημαντικά την *rmGPa* με σταθερά αναστολής της τάξης των  $\mu M$ . Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αποτελούν συναγωνιστικούς αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αφού συναγωνίζονται το υπόστρωμα για δέσμευση στο καταλυτικό κέντρο. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το εξής γεγονός. Κατά τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής  $K_i$  υπολογίζονται οι φαινομενικές τιμές  $K_{M(app.)}$  για διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Και στους δύο αναστολείς οι τιμές των  $K_{M(app.)}$  αυξάνονταν με την αύξηση της συγκέντρωσης του αναστολέα ενώ η  $V_{max}$  μένει σχεδόν ανεπηρέαστη κάτι που αποδεικνύει την ύπαρξη συναγωνιστικής αναστολής. Από τα παραπάνω πειράματα, προσδιορίστηκαν οι σταθερές αναστολής  $K_i$  των *KS461* και *KS510*. Η σταθερά αναστολής  $K_i$  είναι ένας δείκτης της ισχύος ενός αναστολέα. Όσο μικρότερη είναι η τιμή της σταθεράς αναστολής  $K_i$  τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια του αναστολέα με το ένζυμο και κατ' επέκταση τόσο πιο αποτελεσματική είναι η δράση του αναστολέα. Η σταθερά αναστολής του αναστολέα *KS461* προσδιορίστηκε  $2,1 \pm 0,18 \mu M$  και η σταθερά αναστολής του αναστολέα *KS510*  $0,98 \pm 0,04 \mu M$ . Και οι δύο αναστολείς αναστέλλουν ισχυρά την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Το αποτέλεσμα αυτό αναδεικνύει ότι ο σχεδιασμός αναστολέων με βάση τη δομή του ενζύμου είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος εύρεσης αναστολέων ενός ενζύμου. Αναμένονται ακόμα κρυσταλλογραφικές μελέτες που θα οδηγήσουν στην εύρεση του τρόπου αλληλεπιδράσεων των αναστολέων με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου ώστε να προσδιοριστούν τα αίτια αυτής της διαφοράς μεταξύ των δύο τιμών της σταθεράς αναστολής  $K_i$ .

## 7. Βιβλιογραφία

---

1. Konstantinos Laios, Marianna Karamanou, Zenia Saridaki, George Androutsos, *Aretaeus of Cappadocia and the first description of diabetes*, HORMONES 2012, 11(1):109-113
2. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*, American Diabetes Association
3. Guyton A. C., Hall J. E., *Ιατρική Φυσιολογία*, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου (2008), ISBN 978-960-394-513-0
4. Denis Daneman, *Type 1 diabetes*, Lancet 2006; 367: 847–58
5. J. W. Ryder, A. V. Chibalin and J. R. Zierath, *Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle*, Acta Physiol Scand 2001, 171, 249–257
6. Li-Qing Chen, Lily S. Cheung, Liang Feng, Widmar Tanner, Wolf B. Frommer, *Transport of Sugars*, Annu. Rev. Biochem. 2015. 84:15.1–15.30
7. Michael Stumvoll, Barry J Goldstein, Timon W van Haefen, *Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy*, Lancet 2005; 365: 1333–46
8. Judith L. Treadway, Phil Mendys, Dennis J. Hoover, *Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus*, Ashley Publications Ltd. ISSN 1354-3784
9. Nadine E. Rekitke, Meidjie Ang, Divya Rawat, Rahul Khatri, Thomas Linn, *Regenerative Therapy of Type 1 Diabetes Mellitus: From Pancreatic Islet Transplantation to Mesenchymal Stem Cells*, Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International Volume 2016, Article ID 3764681, 22 pages
10. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, *Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, ISBN 978-960-524-189-6
11. María M. Adeva-Andany, Manuel González-Lucán, Cristóbal Donapetry-García, Carlos Fernández-Fernández, Eva Ameneiros-Rodríguez, *Glycogen metabolism in humans*, BBA Clinical 5 (2016) 85–100
12. Lorraine Agius, *Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism*, Molecular Aspects of Medicine 46 (2015) 34–45
13. Rob M. Jones, David E. Thurston, David Rotella, Salvatore Guccione, Ana Martinez, *New Therapeutic Strategies for Type 2 Diabetes: Small Molecule Approaches*, Royal Society of Chemistry, 2012
14. Joseph M. Hayes, Anastassia L. Kantsadi, Demetres D. Leonidas, *Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes*, Phytochem Rev (2014) 13:471–498
15. Michelle F. Browner, Robert J. Fletterick, *Phosphorylase: a biological transducer*, TIBS 17- February 1992
16. J. Monod, J. Wyman, J-P. Changeux, *On the nature of allosteric transition*. A plausible model, J. Mol. Biol. (1965) 12, 88-118
17. Marion Donnier-Maréchal, Sébastien Vidal, *Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review (2013 - 2015)*, Expert Opinion on Therapeutic Patents 2015, DOI: 10.1517/13543776.2016.1131268
18. Lee A. Witters, Joseph Avruch, *Insulin Regulation of Hepatic Glycogen Synthase and Phosphorylase*, Biochemistry (1978), 17 (3), pp 406–410, DOI: 10.1021/bi00596a004

19. Shuichi Saheki, Akira Takeda, Tarashi Shimazu, *Assay of Inorganic Phosphate in the Mild pH Range, Suitable for Measurement of Glycogen Phosphorylase Activity*, Analytical Biochemistry 148, 277-281 (1985)
20. Marion M. Bradford, *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, Analytical Biochemistry 72, 248-254 (1976)
21. Leatherbarrow, R.J. (1998) *GraFit version 4.06*, Erithacus Software Ltd Staines, UK
22. Lineweaver H., Burk D., *The Determination of Enzyme Dissociation Constants*, J.Amer.Chem. Soc., 1934
23. Anastassia L. Kantsadi, Anna Apostolou, Stavroula Theofanous, George A. Stravodimos, Efthimios Kyriakis, Vyrion A. Gorgogietas, Demetra S.M. Chatzileontiadou, Kalliope Pegiou, Vassiliki T. Skamnaki, Dimitrios Stagos, Dimitrios Kouretas, Anna-Maria G. Psarra, Serkos A. Haroutounian, Demetres D. Leonidas, *Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of Vitis vinifera extracts against glycogen phosphorylase*, Food and Chemical Toxicology 67 (2014) 35–43