



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ**



**DEVELOPMENT OF A HIGH EFFICIENT PROTOCOL TO
EVALUATE ENZYMATIC INHIBITORS**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΡΑΖΓΚΕΛΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ, 2019

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ**

**DEVELOPMENT OF A HIGH EFFICIENT PROTOCOL TO
EVALUATE ENZYMATIC INHIBITORS**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ : ΡΑΖΓΚΕΛΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ : ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΕΧΟΜΕΝΩΝ

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
II. Abstract	7
1. Εισαγωγή	8
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	8
1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔτ1)	9
1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔτ2)	9
1.1.3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 3 (ΣΔτ3)	9
1.1.4 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 4 (ΣΔτ4)	10
1.2 Ομοίωση της γλυκόζης	10
1.2.1 Η ινσουλίνη.....	10
1.2.2 Η γλυκαγόνη	11
1.2.3 Το γλυκογόνο.....	12
1.2.4 Αποικοδόμηση γλυκογόνου	12
1.2.5 Ένζυμα αποικοδόμησης γλυκογόνου	13
1.2.6 Σύνθεση γλυκογόνου	14
1.3 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK	14
1.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP, EC 2.4.1.1)	15
1.4.1 Η δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	15
1.4.2 Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP)	16
1.4.3 Ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	17
1.4.3.1 Καταλυτικό κέντρο.....	17
1.4.3.2 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου	18
1.4.3.3 Κέντρο αναστολής	18
1.4.3.4 Αλλοστερικό κέντρο.....	18
1.4.3.5 Νέο αλλοστερικό κέντρο	19
1.4.3.6 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης.....	19
1.5 Κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων	19
1.5.1 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων	21
1.5.2 Επεξεργασία δεδομένων	23
1.6 Αλλοστερικά ένζυμα	24

1.7 Σκοπός.....	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1 Αντιδραστήρια	27
2.2 Οργανολογία.....	28
2.3 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων (<i>rmGPb</i>)	29
2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	33
2.4.1 Ηλεκτροφόρηση πηκτικής ακρυλαμιδίου	33
2.4.2 Ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE.....	34
2.5 Χρώση πηκτώματος.....	35
2.6 Κινητικές μελέτες έναντι της GP	36
2.6.1 Φασμαφωτομετρικός προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ιόντων.....	36
2.6.2 Πειραματική διαδικασία.....	37
2.6.3 Ενζυμικό διάλυμα	37
2.6.4 Διαλύματα υποστρωμάτων	39
2.6.4.1. Προσδιορισμός της K_m	40
2.6.4.2. Προσδιορισμός της K_i	40
2.6.5 Προσδιορισμός τυφλών μαρτύρων	41
2.6.6 Ανάλυση κινητικών δεδομένων	42
3. Αποτελέσματα	44
3.1 Απομόνωση και καθαρισμός της <i>rmGPb</i>	44
3.2 Κινητικές μελέτες	44
3.2.1 Προσδιορισμός της K_m	45
3.2.1 Προσδιορισμός της K_i της α -D γλυκόζης ως προς την <i>rmGPb</i>	45
Συζήτηση	48
Βιβλιογραφία	49

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Φεβρουάριο του 2018 έως τον Δεκέμβριο του 2018, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Βιοχημείας του ΤΒΒ, Δρ Δημήτριο Λεωνίδα που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του, καθώς και τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική και Δρ. Νικόλαο Μπαλατσό για τη συνεργασία τους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια και τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος τόσο εντός όσο και εκτός του χώρου του εργαστηρίου.

Οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερω τον υποψήφιο διδάκτορα Ευθύμιο Κυριάκη για την βοήθεια και την στήριξη που μου παρείχε αυτό το χρονικό διάστημα, καθώς και για την απεριόριστη υπομονή του.

Ελπίζω το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, να αποτελέσει μια χρήσιμη μέθοδο για τα μέλη του εργαστηρίου, προσφέροντας έναν εύκολο και γρήγορο τρόπο υψηλής απόδοσης για την ανίχνευση βιοδραστικότητας διαφόρων ενώσεων έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για όλη την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και όλα τα χρόνια των προπτυχιακών σπουδών μου.

Ι.ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως και είναι μια νόσος, η συχνότητα της οποίας έχει αυξηθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια. Πιο συγκεκριμένα, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, είναι μια μεταβολική ανωμαλία, που χαρακτηρίζεται από μια τάση για χρόνια υπεργλυκαιμία με διαταραχές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών, οι οποίες οφείλονται σε ελαττωματική έκκριση ή δράση της ινσουλίνης ή και τα δύο. Ένα από τα ένζυμα που αποτελούν στόχο για την εύρεση θεραπείας είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP, EC: 2.4.1.1) είναι το βασικό ένζυμο που οδηγεί τη γλυκογονόλυση και ως εκ τούτου αποτελεί σημαντικό στόχο στην προσπάθεια μείωσης των επιπέδων γλυκόζης, μειώνοντας την παραγωγή της ηπατικής γλυκόζης. Καταλύει το πρώτο και καθοριστικό βήμα του καταβολισμού του γλυκογόνου προς παράγωγη 1-φωσφορικής γλυκόζης (G1P) και διαθέτει τουλάχιστον 6 κέντρα πρόσδεσης. Μέχρι σήμερα έχουν εξεταστεί πάνω από 300 ενώσεις ως πιθανοί αναστολείς της GP, οι οποίες προσδένονται στα διαφορετικά κέντρα του ενζύμου. Η διαδικασία της αξιολόγησης μιας ένωσης ως εν δυνάμει αναστολέα γίνεται αρχικά με τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής της ένωσης ως προς το ένζυμο. Η διαδικασία αυτή χρειάζεται μια έως δύο μέρες συνεχούς εργασίας. Επομένως, η αξιολόγηση πολλών ενώσεων χρειάζεται και μεγάλο χρονικό διάστημα για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε ένα υψηλής απόδοσης πρωτόκολλο για την μελέτη ενώσεων που αναστέλλουν την μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από κονίκλους (rmGPb) με έναν πιο εύκολο και γρήγορο τρόπο. Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας, έγινε προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής της α-D γλυκόζης ως προς την rmGPb η οποία προσδιορίστηκε με το πρωτόκολλο σε τιμή όμοια με αυτήν που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (1.7 mM). Με αυτή τη μεθοδολογία υψηλής απόδοσης, ο χρόνος προσδιορισμού της σταθεράς αναστολής μειώθηκε από 1 μέρα σε 1-4 ώρες.

II. Abstract

Diabetes mellitus is one of the leading causes of death worldwide and is a disease whose incidence has increased dramatically in recent years. More specifically, Type 2 diabetes mellitus is a systemic metabolic abnormality characterized by a tendency for chronic hyperglycemia with disorders in the carbohydrate, fat and protein metabolism due to defective secretion or insulin action or both. One of the enzymes that are the target of finding a cure is glycogen phosphorylase

Glycogen phosphorylase (GP, EC: 2.4.1.1) is the key enzyme that leads glycogenolysis and is therefore an important target in trying to reduce blood glucose levels by reducing hepatic glucose production. It catalyses the first and decisive step of catabolism of glycogen to produce glucose 1-phosphate (G1P) and has at least 6 binding sites. Up to now, more than 300 compounds have been assessed as potential GP inhibitors. The process of evaluating a compound as a potential inhibitor begins firstly, by determining the inhibition constant of the compound. This process takes one to two days of continuous and laborious work. Therefore, the evaluation of many compounds requires a long time. In this thesis a high throughput protocol was developed to assess the inhibitory potency of compounds, using rabbit muscle glycogen phosphorylase (rmGPb). To validate the protocol, the inhibition constant of α -D glucose was determined and the value measured was very similar to the one reported in the literature (1.7 mM). With this high throughput protocol, the determination of the inhibition constant is achieved in 1-4 hours.

1. Εισαγωγή

1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο Αρεταίος ο Καππαδόκης υπήρξε ένας από τους διασημότερους Έλληνες γιατρούς και θεωρείται από τους πρώτους που περιέγραψαν τον διαβήτη. Το όνομα διαβήτης (*diabetes*) προέρχεται από την ελληνική λέξη διαβαίνω, γιατί τα υγρά που προσλαμβάνονται από τον ασθενή δεν παραμένουν στο σώμα του αλλά το χρησιμοποιούν ως δοχείο για να διαφύγουν. Πιο συγκεκριμένα, καθώς η γλυκόζη συσσωρεύεται στο αίμα, η περίσσεια του σακχάρου απεκκρίνεται στα ούρα. Λόγω μεγαλύτερων ποσοτήτων γλυκόζης στα ούρα, περισσότερο νερό εκκρίνεται μαζί με αυτό, προκαλώντας αύξηση του όγκου και της συχνότητας ούρησης καθώς και δίψας.

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μια μεταβολική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία. Η αυξημένη γλυκόζη αίματος (υπεργλυκαιμία) προκύπτει από ελαττώματα στην έκκριση ινσουλίνης, στη δράση ινσουλίνης ή και τα δύο. Οι καταστάσεις της νόσου που υπάγονται στη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις κατηγορίες:

Τύπος 1 “ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης”

Τύπος 2 “μη ινσουλινοεκαρτώμενος διαβήτης”

Τύπος 3 “άλλος”

Τύπος 4 “σακχαρώδης διαβήτης κύησης”

Η χρόνια υπεργλυκαιμία του ΣΔ επιφέρει δυσλειτουργία των οφθαλμών, των νεύρων, των νεφρών, της καρδιάς, και των αιμοφόρων αγγείων. Στα συμπτώματα του ΣΔ περιλαμβάνονται η απώλεια βάρους, η πείνα, ο κνησμός και η αδυναμία. Συνήθως, στην εμφάνιση του ΣΔ σημαντικό ρόλο παίζει η παχυσαρκία, η κληρονομικότητα, η υψηλή πίεση αίματος, η άσκηση και η διατροφή.

Σύμφωνα με τα στατιστικά του IDF (Διεθνής Ομοσπονδία Διαβήτη), ο ΣΔ είναι υπεύθυνος για την πρόκληση 4 εκατομμυρίων θανάτων. Στην Ευρώπη, το 2017, έπασχαν 58 εκατομμύρια άτομα από διαβήτη και εκτιμάται ότι ο αριθμός αυτός θα φτάσει τα 67 εκατομμύρια άτομα το 2045 (629 εκατομμύρια παγκοσμίως) [1],[2],[3],[6].

1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔτ1)

Ο ΣΔτ1 είναι μια αυτοάνοση ασθένεια. Χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι η καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων που οδηγεί σε ελάττωση και τελικά σε παύση της έκκρισης της ινσουλίνης. Σε ασθενείς με ΣΔτ1 είναι απαραίτητη η χορήγηση ινσουλίνης, δηλαδή, αυτός ο τύπος διαβήτη είναι ινσουλινοεξαρτώμενος.

Ο ΣΔτ1 συνήθως εμφανίζεται σε οξεία μορφή σε νεαρά άτομα και τα συμπτώματα αναπτύσσονται σε μια περίοδο λίγων ημερών ή εβδομάδων. Εντούτοις όμως υπάρχουν ενδείξεις ότι πριν από την εμφάνιση των συμπτωμάτων προηγείται μια προδιαβητική περίοδος αρκετών μηνών, κατά την οποία μπορούν να παρατηρηθούν αδυναμία ανάπτυξης (σε παιδιά), πτώση στην απόκριση ινσουλίνης μετά τη χορήγηση γλυκόζης και διάφορες ανοσολογικές διαταραχές.

Η έναρξη μπορεί να γίνει σε οποιαδήποτε ηλικία. Ο ΣΔτ1 απαντάται σε όλες τις εθνολογικές ομάδες και η προδιάθεση φαίνεται ότι εμπλέκει μια πολυπαραγοντική γενετική σύνδεση. [2][3][6]

1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔτ2)

Ο ΣΔτ2 χαρακτηρίζεται από ιστική αντίσταση της ινσουλίνης, σε συνδυασμό με μια σχετική ανεπάρκεια της έκκρισης ινσουλίνης. Οι ασθενείς με ΣΔτ2 μπορούν και παράγουν ινσουλίνη από τα β κύτταρα, η οποία όμως είναι ανεπαρκής για να υπερνικήσει την αντίσταση, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η γλυκόζη στο αίμα. Η ελαττωματική δράση της ινσουλίνης οδηγεί σε άνοδο των επιπέδων των τριακυκλογλυκερολών, ανταποδίδοντας χαμηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL).

Στην εμφάνιση και στην διαχείριση του ΣΔτ2 εμπλέκονται και σημαντικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η μειωμένη φυσική δραστηριότητα, η παχυσαρκία, η ηλικία, η μη υγιεινή διατροφή και η υψηλή πίεση αίματος. [2][3][6]

1.1.3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 3 (ΣΔτ3)

Ο ΣΔτ3 αναφέρεται σε άλλα ειδικά αίτια αύξησης της γλυκόζης στο αίμα, όπως είναι η ελαττωματική δράση των β-κυττάρων και της ινσουλίνης που σχετίζεται με γενετικούς παράγοντες, ενδοκρινοπάθειες, ασθένειες του εξωκρινούς παγκρέατος, φαρμακευτική θεραπεία κλπ. [3]

1.1.4 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 4 (ΣΔτ4)

Ο διαβήτης της κύησης είναι μια οποιοδήποτε ανωμαλία των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος που παρατηρείται για πρώτη φορά κατά την κύηση. Ο πλακούντας και οι ορμόνες του, επιφέρουν το φαινόμενο της αντίστασης στην ινσουλίνη, η οποία είναι περισσότερο έκδηλη κατά το τελευταίο τρίμηνο. [3][4]

1.2 Ομοιόσταση της γλυκόζης

Η ομοιόσταση της γλυκόζης ελέγχεται με τη συντονισμένη δράση κυρίως της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης. Η ινσουλίνη οδηγεί σε ελάττωση της ποσότητας της γλυκόζης στο αίμα ενώ η γλυκαγόνη αντίθετα, την αυξάνει. [2]

1.2.1 Η ινσουλίνη

Η ινσουλίνη αποτελείται από 51 αμινοξέα και εκκρίνεται από τα β κύτταρα των παγκρεατικών κυττάρων των νησίδων του *Langerhans*, ως απόκριση στην αύξηση της γλυκόζης του αίματος. Συντίθεται ως μια προορμόνη, την προινσουλίνη, η οποία διασπάται πριν εκκριθεί ώστε να προκύψει η ινσουλίνη και το πεπτίδιο C. Η έκκριση της ινσουλίνης διεγείρεται και από διάφορες ορμόνες του εντέρου, συμπεριλαμβανομένης της γλυκαγόνης και του γαστρικού ανασταλτικού πεπτιδίου GIP. Η δράσης της ινσουλίνης προκαλεί την απομάκρυνση της γλυκόζης από το αίμα, μετατοπίζοντας τον ινσουλινοευαίσθητο υποδοχέα της γλυκόζης (GLUT-4) από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη, ιδιαίτερα στο λιπώδη ιστό και στους σκελετικούς μύες.

Η ινσουλίνη διεγείρει επίσης την πρόσληψη και αποθήκευση της γλυκόζης στο ήπαρ αλλά με διαφορετικό μηχανισμό: επάγει την γλυκοκινάση, η οποία φωσφορυλιώνει την γλυκόζη προς 6-φωσφορική γλυκόζη, που αποτελεί το υπόστρωμα για τη σύνθεση του γλυκογόνου. Η σύνθεση του γλυκογόνου ενεργοποιείται από την ινσουλίνη (παρεμποδίζοντας ταυτόχρονα τη γλυκογονόλυση) αλληλοεπιδρώντας με ένα εξαιρετικά συντονισμένο δίκτυο μηχανισμών ελέγχου, που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος. Περιληπτικά, η δέσμευση της ινσουλίνης από τον υποδοχέα της, οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός σηματοδοτικού καταρράκτη που οδηγεί στη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη διαδικασία. Ανάμεσα σε αυτές, περιλαμβάνεται η φωσφατάση των φωσφοπρωτεϊνών, η οποία

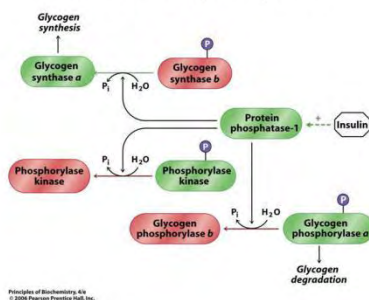
αποφωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης (αποτρέποντας την ενεργοποίηση της γλυκογονόλυσης) και αποφωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη συνθάση του γλυκογόνου οδηγώντας σε σύνθεση του γλυκογόνου. Σε κατάσταση νηστείας, όπου δεν παράγεται ινσουλίνη, ενεργοποιείται η ηπατική διέγερση της γλυκογονόλυσης και η απελευθέρωση της γλυκόζης στο αίμα.

Η ινσουλίνη συμμετέχει και στον έλεγχο της γλυκόλυσης και της γλυκονεογένεσης, διεγείροντας την πρώτη και ανατροφοδοτικά παρεμποδίζοντας τη δεύτερη, ενεργοποιώντας την έκφραση της φωσφοφρουκτοκινάσης, της πυροσταφλικής κινάσης και των ενζύμων, που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση του αλλοστερικού τροποποιητή-κλειδιού, της 2,6 διφωσφορικής φρουκτόζης.[1] [2]

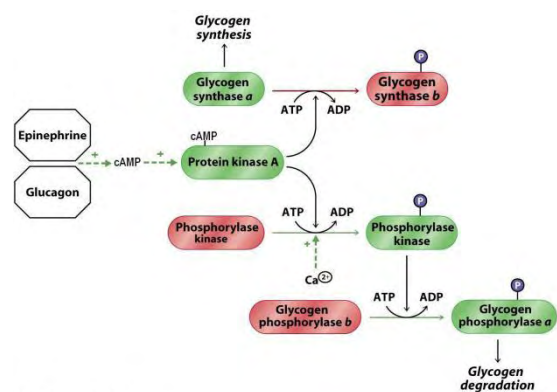
1.2.2 Η γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη, ένα πολυπεπτίδιο 29 αμινοξέων, εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των παγκρεατικών κυττάρων όταν η συγκέντρωση του σακχάρου στο αίμα είναι χαμηλή. Η έκκριση της γλυκαγόνης αρχίζει να ελαττώνεται μετά την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Γενικά, οι δράσεις της είναι αντίθετες από εκείνες της ινσουλίνης καθώς διεγείρει τη γλυκονεογένεση, την κετογένεση, τη λιπόλυση και την ηπατική (αλλά όχι την μυϊκή) γλυκογονόλυση με ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Οι δράσεις των ορμονών φαίνονται στην Εικόνα 1.[1][2]

Insulin's Effect on Glycogen Synthase AND Phosphorylase



Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.



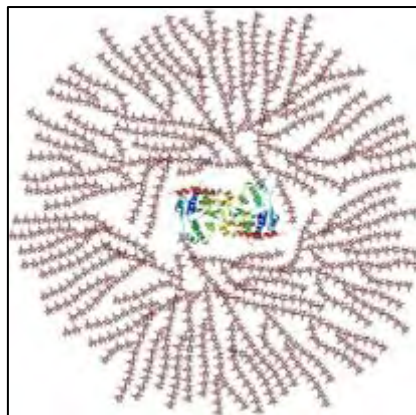
Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Εικόνα 1 : Αριστερά: Η δράση της ινσουλίνης, Δεξιά: Η δράση της γλυκαγόνης (PrinciplesofBiochemistry, 2006, PearsonPrenticeHall, Inc)

1.2.3 Το γλυκογόνο

Το γλυκογόνο, ένα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης, χρησιμεύει ως ένα ωσμωτικά ουδέτερο μέσο για την αποθήκευση της γλυκόζης στα κύτταρα και μπορεί να αποικοδομηθεί για να αποδώσει γλυκόζη σε καταστάσεις όπου χρειάζεται ενέργεια. Κατά κύριο λόγο, τα κατάλοιπα γλυκόζης στο γλυκογόνο συνδέονται μεταξύ τους μέσω α -1,4 γλυκοζιτικών δεσμών και μέσω των α -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών σχηματίζοντας διακλαδώσεις (Εικόνα 2).

Στη πλειοψηφία τους, οι ιστοί αποθηκεύουν μικρές ποσότητες γλυκογόνου, αλλά οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του είναι οι σκελετικοί μύες και το ήπαρ. Το γλυκογόνο εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή κοκκίων και η συγκέντρωσή του είναι υψηλότερη στο ήπαρ από ότι στους μύες, Ωστόσο, περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύες συνολικά, λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους. Στο ήπαρ, η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζονται ώστε να διατηρούνται τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού. Αντίθετα, στους μύες αυτές οι διεργασίες ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών μόνο των μυών. [4]



Εικόνα 2 : Διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης ([MedicalgalleryofMikaelHaggström 2014](#))

1.2.4 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Το γλυκογόνο πρέπει να διασπαστεί προκειμένου να παραχθεί γλυκόζη. Σε αυτή τη διαδικασία συμμετέχουν τρία ένζυμα: η φωσφογλυκομουτάση, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, και η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, η οποία απουσιάζει από μύες και εγκέφαλο. Λόγω διακλαδώσεων που υπάρχουν στο γλυκογόνο, χρησιμοποιείται επιπλέον και το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου, το οποίο διαθέτει δύο δραστηριότητες, μια μεταφοράσης και μια α -1,6 γλυκοζιτάσης. [4][7]

1.2.5 Ένζυμα αποικοδόμησης γλυκογόνου

● Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

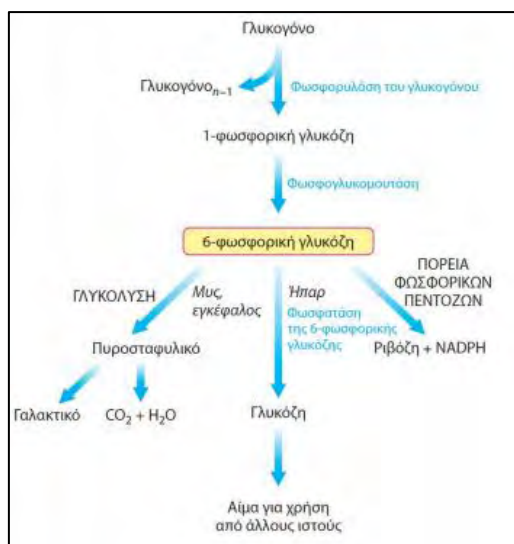
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP, EC 2.4.1.1) καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μακρομορίου του γλυκογόνου μέσω της αντίδρασης της φωσφορόλυσης. Η φωσφορόλυση είναι μια αντίδραση κατά την οποία διασπάται ένας γλυκοζιτικός δεσμός μέσω της προσθήκης ενός ορθοφωσφορικού (Pi). Το ορθοφωσφορικό προστίθεται μεταξύ του γλυκοζιτικού δεσμού ανάμεσα στον C-1 του τελικού καταλοίπου και στον C-4 του γειτονικού καταλοίπου διασπώντας έτσι τον α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η φωσφορυλάση μπορεί να διασπά του α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς αλλά όχι και τους α-1,6 που βρίσκονται στην διακλάδωση. Έτσι, 4 κατάλοιπα γλυκόζης πριν τη διακλάδωση συμμετέχουν δύο επιπλέον ένζυμα, ένα εκ των οποίων είναι το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου. [4][7]

● Μεταφοράση και ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου

Όταν η φωσφορυλάση του γλυκογόνου φτάσει 4 κατάλοιπα γλυκόζης πριν από μια διακλάδωση, τότε το υπόστρωμα θα πρέπει να ανακατασκευαστεί ώστε να μπορέσει η GP να συνεχίσει την αποικοδόμηση. Αρχικά, η μεταφοράση μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη και απομένει ένα κατάλοιπο γλυκόζης συνδεδεμένο με α-1,6 γλυκοζιτικό δεσμό στο μακρομόριο του γλυκογόνου. Τέλος, η α-1,6 γλυκοζιτάση, γνωστή και ως ένζυμο αποδιακλάδωσης, υδρολύει τον α-1,6 γλυκοζιτικό δεσμό με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται ένα μόριο γλυκόζης το οποίο στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται από την εξοκινάση. Έτσι, οι δύο αυτές δραστηριότητες μετατρέπουν τη διακλαδισμένη δομή σε γραμμική ώστε να συνεχιστεί η διάσπαση από τη GP. [4][7]

● Φωσφογλυκομουτάση

Η φωσφογλυκομουτάση είναι μία μεταφοράση που μετατρέπει την 1-φωσφορική γλυκόζη (G1P) σε 6-φωσφορική γλυκόζη (G6P). Με αυτόν τον τρόπο, η G1P που σχηματίζεται κατά τη διάσπαση του γλυκογόνου από την φωσφορυλάση μπορεί να εισέλθει στην μεταβολική ροή. Η G6P που προέρχεται από την φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου μπορεί να ακολουθήσει τρεις διαφορετικούς δρόμους. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3, μπορεί να μετατραπεί σε ελεύθερη γλυκόζη αίματος, να χρησιμοποιηθεί ως αρχικό υπόστρωμα για τη γλυκόλυση και να υποστεί επεξεργασία από την πορεία των φωσφορικών πεντοζών προς απόδοση NADPH και παραγώγων ριβόζης. [4][7]



Εικόνα 3 : Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου (Berg, Stryer, Biochemistry)

1.2.6 Σύνθεση γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου, ενεργοποιείται όταν η γλυκόζη είναι σε αφθονία. Για την σύνθεση του γλυκογόνου χρειάζεται μια ενεργοποιημένη μορφή της γλυκόζης, η ουριδινοφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη), η οποία παράγεται από την αντίδραση της UTP με την G1P. Η UDP-γλυκόζη προστίθεται στο μη αναγωγικό άκρο των μορίων γλυκογόνου από το ένζυμο συνθάση του γλυκογόνου. Η ενεργοποιημένη γλυκοζιτική μονάδα της UDP-γλυκόζης μεταφέρεται στο υδροξύλιο του C-4 ενός τελικού καταλοίπου του γλυκογόνου σχηματίζοντας τον α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Το ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου, το οποίο σχηματίζει τους α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, μετατρέπει το γλυκογόνο σε ένα διακλαδισμένο πολυμερές. Ο σχηματισμός των διακλαδώσεων αυξάνει τον ρυθμό σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου. [4][7]

1.3 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK)

Η PhK είναι ένζυμο-κλειδί στον έλεγχο της γλυκογονόλυσης. Φωσφορυλιώνει την ανενεργό φωσφορυλάση (GP) του γλυκογόνου b (GPb) και τη μετατρέπει στην ενεργό φωσφορυλάση a (GPa). Το μοριακό της βάρος έχει υπολογιστεί στα $1,3 \times 10^6$ Da. Είναι ένα ετεροτετραμερές μόριο το οποίο αποτελείται από 4 υπομονάδες με στοιχεία δεκαεξαμερούς (αβγδ)₄. Οι υπομονάδες α, β και δ είναι ρυθμιστικές ενώ η γ είναι η καταλυτική. Η ενεργοποίηση της GPb επιτυγχάνεται μέσω της φωσφορυλίωσης σε ένα κατάλοιπο σερίνης (Ser14). Η PhK ενεργοποιείται ανταποκρινόμενη σε ορμονικά (αδρεναλίνη, γλυκαγόνη), νευρικά (Ca^{2+}) και μεταβολικά (επίπεδα ADP) ερεθίσματα ώστε να επάγει την ταχεία κινητοποίηση του γλυκογόνου. Όσον αφορά τις α- και β- υπομονάδες, η PhK ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση και μετατρέπεται από μια μορφή χαμηλής δραστηριότητας σε μια

υψηλής δραστηριότητας. Τόσο η α - όσο και η β - υπομονάδα διαθέτουν περιοχές (που δεν ταυτίζονται) που μπορούν να φωσφορυλιωθούν. Η φωσφορυλίωση ή αυτοφωσφορυλίωση (*invitro*) αυτών των περιοχών οδηγεί σε ενεργοποίηση της PhK. Η δ - υπομονάδα αποτελεί έναν αισθητήρα ασβεστίου που διεγείρει την PhK. Αυτός ο τρόπος ενεργοποίησης της PhK είναι σημαντικός για τους μύες γιατί η πρόσδεση Ca^{2+} στην δ - υπομονάδα συνδέει τη συστολή των μυών με την παραγωγή ενέργειας. Συγκεκριμένα, η σύσπαση του μυός οδηγεί στην απελευθέρωση Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Στη συνέχεια, όταν η συγκέντρωση του Ca^{2+} φτάσει σε υψηλά επίπεδα (της τάξης του 10^{-6} M) το ασβέστιο συνδέεται στην δ υπομονάδα προκαλώντας την αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωσή της και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση της PhK. [4][8]

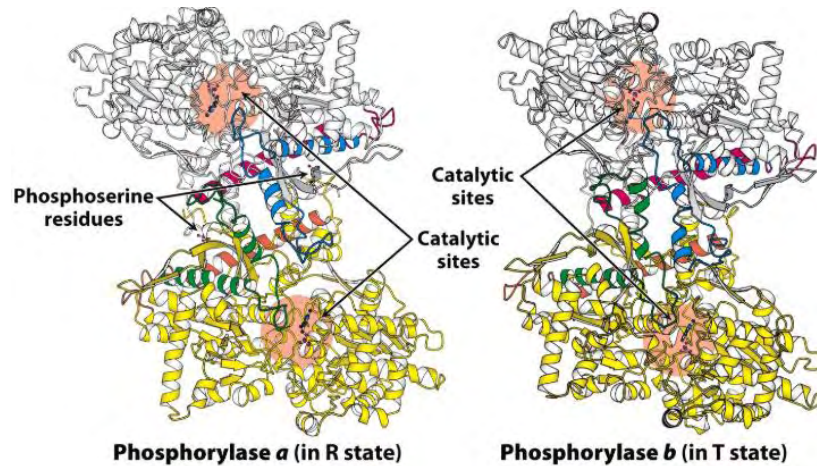
1.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP, EC 2.4.1.1)

Η GP καταλύει τη φωσφορόλυση του α -1,4 γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ δύο μονομερών του μακρομορίου του γλυκογόνου και παράγει 1-φωσφορική γλυκόζη. Οι κινητικές ιδιότητες του ενζύμου αυτού μελετώνται από το 1936, από τη χρονιά της ανακάλυψής του, και έχουν αποκαλύψει ότι αυτό το ένζυμο υπόκειται σε ένα πολύπλοκο μοτίβο αλλοστερικής ρύθμισης. Η GP υπάρχει σε τρεις ισομορφές, στο ήπαρ, στους μύες και στον εγκέφαλο, οι οποίες κωδικοποιούνται από τρία ξεχωριστά γονίδια: τα PYGL, PYGM, PYGB. Η ηπατική GP εφοδιάζει ολόκληρο τον οργανισμό με ενέργεια, ενώ τα ισόενζυμα του εγκεφάλου και του μυός παρέχουν 1-φωσφορική γλυκόζη μόνο σε αυτούς τους ιστούς. Αυτές οι ισομορφές έχουν μεταξύ τους 80-83% ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία. Η gmGP (μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από κόνικλους) που χρησιμοποιείται στις περισσότερες μελέτες έχει με βάση την αμινοξική αλληλουχία 97% ομολογία με την ανθρώπινη μυϊκή GP (hmGP). Επιπλέον, μεταξύ της gmGP και της hIGP δεν υπάρχουν δομικές διαφορές στο καταλυτικό κέντρο. Η GP υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: μια συνήθως ενεργό GP_a και μια συνήθως ανενεργό GP_b. Κάθε μία από αυτές τις δύο μορφές βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ελάχιστα ενεργού τεταμένης κατάστασης T και μίας ενεργού χαλαρής κατάστασης R. Η GP_a βρίσκεται κυρίως στην κατάσταση R ενώ η GP_b κυρίως στην κατάσταση T. Η GP εκτός από αλλοστερικά, ρυθμίζεται και με φωσφορυλίωση στη σερίνη 14 από την PhK μετατρέποντας την b μορφή σε a. [4][7][9]

1.4.1 Η δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η GP είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη με κάθε υπομονάδα να έχει μοριακή βάρους 97 kD. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από μια αμινο-τελική δομική περιοχή (480 κατάλοιπα) που περιέχει μία θέση πρόσδεσης γλυκογόνου και μια καρβοξυ-τελική δομική περιοχή (360 κατάλοιπα). Το καταλυτικό κέντρο (εικόνα 4) εντοπίζεται σε

μια βαθιά εσοχή που σχηματίζεται με κατάλοιπα και από τις δύο δομικές περιοχές. Η C-τελική περιοχή εκτός από ένα μέρος του ενεργού κέντρου περιέχει και τον συμπαράγοντα φωσφορική πυριδοξάλη, και αποτελείται από πέντε α έλικες και έξι β έλικες, ενώ η N-τελική περιοχή από δεκαπέντε α έλικες και εννιά β έλικες. [4][9][10]

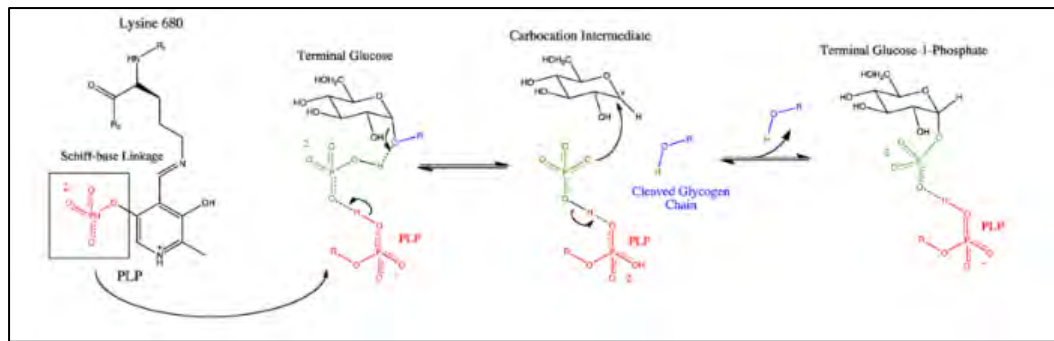


Εικόνα 4 : Ηδομήτηςφωσφορυλάσηςτουγλυκογόνου(Biochemistry, Seventh Edition, W.H Freeman and Company)

1.4.2 Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP)

Η GP διασπά το γλυκογόνο φωσφορολυτικά και όχι υδρολυτικά προκειμένου να εξοικονομήσει το *ATP* που χρειάζεται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Για να γίνει αυτό, είναι απαραίτητος ο αποκλεισμός του νερού από το καταλυτικό κέντρο. Η *PLP* είναι ένα παράγωγο της πυριδοξίνης (Βιταμίνης Β6) και η αλδεϋδική της ομάδα σχηματίζει βάση *Schiff* με την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης 680 του ενζύμου, τοποθετώντας έτσι την *PLP* στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Η 5-φωσφορική ομάδα της *PLP* δρα σε συνδυασμό με το φωσφορικό ιόν και σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, το οποίο προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό προς σχηματισμό α-1-φωσφορικής γλυκόζης.

Το καταλυτικό κέντρο και η θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω μιας στενής σχισμής ικανή να χωρέσει τέσσερα ή πέντε μόρια γλυκόζης. Λόγω της μεγάλης απόστασης μεταξύ της θέσης πρόσδεσης του γλυκογόνου και του καταλυτικού κέντρου δίνεται η δυνατότητα στο ένζυμο να φωσφορολύει πολλά μόρια χωρίς να χρειάζεται να αποσυνδέεται και να επανασυνδέεται στο γλυκογόνο. [4]



Εικόνα 5: Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η *PLP* συμμετέχει στην ενζυμική αντίδραση διάσπασης του γλυκοζιτικού δεσμού από την *GP*. (PalmD, et. al., J. Biochem.)

1.4.3 Ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η *GP* έχει τουλάχιστον επτά ρυθμιστικές περιοχές και τουλάχιστον έξι κέντρα πρόσδεσης, τα οποία αλληλεπιδρούν με διάφορους προσδέτες. Οι προσδέτες επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου, διότι μετατοπίζουν την ισορροπία του ενζύμου μεταξύ των διαμορφώσεων T και R. [9][10]

Οι ρυθμιστικές περιοχές είναι:

- Το καταλυτικό κέντρο (προσδέεται η γλυκόζη, G1P, ανόργανος φώσφορος)
- Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου
- Το κέντρο αναστολής (προσδέεται καφεΐνη)
- Το αλλοστερικό κέντρο (προσδέεται το AMP, G6P, ATP)
- Το νέο αλλοστερικό κέντρο
- Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης
- Η θέση αναγνώρισης της φωσφοσερίνης.

1.5.3.1 Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο είναι θαμμένο στο κέντρο κάθε υπομονάδας μονομερούς του ενζύμου και είναι προσβάσιμο στο διαλύτη διαμέσου ενός καναλιού μήκους 15 Å . Η δέσμευση αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο σταθεροποιεί την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s (κατάλοιπα 282-287), εμποδίζοντας έτσι την πρόσβαση του υποστρώματος και προωθώντας τη διαμόρφωση της αδρανούς T κατάστασης. [7]

1.4.3.2 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου

Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι η περιοχή του ενζύμου που συνδέεται με το γλυκογόνο. Βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και αποτελείται από δύο έλικες (κατάλοιπα 396-418 και 420-429) και έναν βρόχο που συνδέει δύο αντιπαράλληλα πτυχωτά φύλλα (κατάλοιπα 430-432 και κατάλοιπα 437-411). [9]

1.4.3.3 Κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής, το οποίο είναι γνωστό και ως κέντρο πρόσδεσης της καφεΐνης, βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση των προσδετών σε αυτή τη θέση οφείλεται κυρίως στην παρεμβολή μεταξύ των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων *Phe285* και *Tyr613*, μέσω σχηματισμού π-π αλληλεπιδράσεων. Παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης οι προσδέτες είναι πιο ισχυροί. Αυτό έχει το πλεονέκτημα ότι η ανασταλτική δράση τους θα μπορούσε να ρυθμιστεί από τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και να μειωθεί όταν τα επίπεδα πλησιάζουν στο φυσιολογικό, μειώνοντας τον κίνδυνο υπογλυκαιμίας. Ο πρώτος αναστολέας που βρέθηκε ότι προσδέεται στο κέντρο αναστολής ήταν η καφεΐνη, με $K_i = 0.1 \text{ mM}$. Κατά τη σύνδεση της με την *rmGPb*, παρεμβάλλεται μεταξύ δύο αρωματικών καταλοίπων, *Phe285* και *Tyr613*, και σχηματίζει μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων *vanderWaals* και αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα *Glu382* και *Asp283* που δημιουργούνται με την διαμεσολάβηση μορίων ύδατος (*watermediatedbridginginteractions*). [9]

1.4.3.4. Αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο της GP αποτελείται από δομικά στοιχεία και των δύο υπομονάδων του λειτουργικού διμερούς, που βρίσκονται στις αντίθετες πλευρές του μορίου του ενζύμου. Δύο α έλικες (κατάλοιπα 47-78 και 289-314, αντίστοιχα) και τέσσερα β-πτυχωτά φύλλα (κατάλοιπα 153-160, 191-193, 222-232 και 237-247) δημιουργούν μια κοιλότητα σχήματος V, η οποία κλείνει από μια περιοχή που αποτελείται από τα κατάλοιπα 36 έως 47 της συμμετρικής υπομονάδας ώστε να σχηματιστεί το αλλοστερικό κέντρο. Στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται μια ποικιλία φωσφορυλιωμένων ενώσεων, όπως ATP, AMP, IMP, 6-φωσφορική γλυκόζη, NADH, UDP-γλυκόζη, 2-δεοξυ-γλυκόζη-6-P, β-γλυκεροφωσφορικό και ανόργανος φώσφορος. Με τη σύνδεση των προσδετών σε αυτό το κέντρο αναστέλλεται η δραστηριότητα της GP είτε συναγωνίζοντας τον ενεργοποιητή AMP είτε σταθεροποιώντας την ανενεργό T διαμόρφωση του ενζύμου. [9]

1.4.3.5 Νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται μέσα στην κεντρική κοιλότητα του διμερούς ενζύμου, η οποία σχηματίζεται από την σύνδεση των δύο υπομονάδων. Απέχει 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 37 Å από το κέντρο αναστολής και 33 Å από το καταλυτικό κέντρο. Η κεντρική κοιλότητα του κέντρου σχηματίζεται στο ένα άκρο με κατάλοιπα της περιοχής *car'* και α2 έλικες (Arg33, His34, Arg60 και Asp61 και τα αντίστοιχα συμμετρικά κατάλοιπα) και στο άλλο άκρο από τον α7 πύργο ελικών (κατάλοιπα Asn270, Glu273, Ser276 αντίστοιχα συμμετρικά κατάλοιπα). Τα 18 κατάλοιπα αμινοξέων (9 από κάθε υπομονάδα) που συνθέτουν αυτό το κέντρο είναι πολύ καλά συντηρημένα στην ανθρώπινη μυϊκή, ηπατική και εγκεφαλική GP και σε αυτές του μυός, του ήπατος και του εγκεφάλου του αρουραίου. Στο κέντρο αυτό δεσμεύονται αναστολείς, οι οποίοι λειτουργούν ως κλασικοί αλλοστερικοί αναστολείς και σταθεροποιούν την ανενεργή στερεοδιαμόρφωση T. [9][11]

1.4.3.6 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

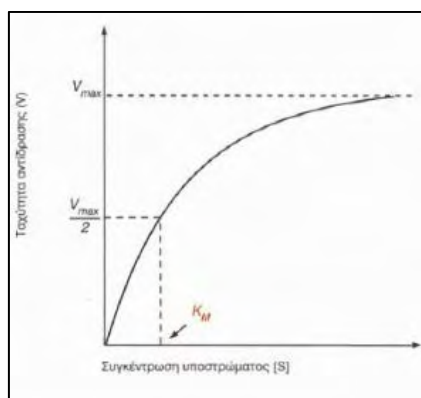
Τα τελευταία χρόνια, τα φλαβονοειδή έχουν αποκαλυφθεί ως αναστολείς της GP. Ωστόσο, είναι τώρα γνωστό ότι δεν είναι συγκεκριμένα στον τρόπο δράσης τους, με διαφορετικά φλαβονοειδή να δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις της GP. Πράγματι, μια νέα θέση σύνδεσης της GP ανακαλύφθηκε το 2014 για την κερσετίνη. Η κερσετίνη προσδέεται σε μια θέση 15 Å μακριά από το ενεργό κέντρο, 32 Å από το κέντρο αναστολής, και 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης σχηματίζεται από τα κατάλοιπα *Lys544*, *Arg551*, *Lys655* και *Tyr548* της C- επικράτειας και από τα *Glu120* και *Glu123* της N- επικράτειας. Η δέσμευση της κερσετίνης σε αυτό το κέντρο προάγει την λιγότερο δραστική κατάσταση T του ενζύμου μέσω σταθεροποίησης της διαμόρφωσης του βρόχου 548-556 στην T-στερεοδιαμόρφωση. [9]

1.5 Κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων

Τα ένζυμα είναι οι καταλύτες των βιολογικών συστημάτων. Τα βασικά χαρακτηριστικά των ενζύμων είναι η καταλυτική ισχύς και η εξειδίκευσή. Τα ένζυμα έχουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης τόσο στις αντιδράσεις που καταλύουν όσο και στην επιλογή των υποστρωμάτων. Η κατάλυση λαμβάνει χώρα σε μια ιδιαίτερη περιοχή που ονομάζεται ενεργό κέντρο και η εξειδίκευση ενός ενζύμου οφείλεται στην ακριβή αλληλεπίδραση του υποστρώματος και του ενζύμου. Η ακρίβεια αυτή είναι αποτέλεσμα της πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής του ενζύμου.

Η μελέτη της ταχύτητας των αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα ονομάζεται ενζυμική κινητική. Σαν ταχύτητα κατάλυσης V_0 ορίζεται ο αριθμός των moles του προϊόντος που σχηματίζεται ανά μονάδα χρόνου όταν η αντίδραση έχει μόλις

αρχίσει ($t \approx 0$). Η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος και στη συνέχεια αρχίζει να σταθεροποιείται και να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος.

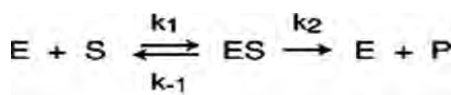


Εικόνα 6: Διάγραμμα ταχύτητα (V_0) μιας ενζυμικής αντίδρασης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος $[S]$, για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική *Michaelis-Menten* (The development of research ability of university chemistry students, the role of reflection, [L. Dierikx](#), [M. Goedhart](#), [Albert Pilot](#))

Η ταχύτητα κατάλυσης είναι ίση με το γινόμενο της συγκέντρωσης του συμπλόκου $[ES]$ επί την k_2 .

$$V_0 = k_2 [ES]$$

Ο *Leonor Michaelis* και η *Maud Menten*, το 1913, πρότειναν ένα απλό μοντέλο που εξηγεί αυτά τα κινητικά χαρακτηριστικά. Το κρίσιμο χαρακτηριστικό στη συμπεριφορά των ενζύμων είναι ότι το ειδικό σύμπλοκο ES είναι το αναγκαίο ενδιάμεσο στην κατάλυση. Το μοντέλο που προτάθηκε είναι



Όπου:

k_1, k_2, k_{-1} : οι σταθερές ταχύτητας των αντίστοιχων αντιδράσεων

E: ένζυμο

S: υπόστρωμα

ES: σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P: προϊόν

Ένα ένζυμο (E) αντιδρά με το υπόστρωμα (S) για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο ES με μια κινητική σταθερά k_1 . Έπειτα, το σύμπλοκο ES μπορεί να διασπαστεί σε E και S, με μια κινητική σταθερά k_{-1} , ή να σχηματίσει προϊόν P, με μια κινητική σταθερά k_2 .

Οι *George Briggs* και *John Haldane*, το 1924, πρότειναν την παραδοχή της σταθερής κατάστασης (steady state). Στην κατάσταση αυτή οι συγκεντρώσεις των ενδιάμεσων

[ES], παραμένουν σταθερές, ακόμη και εάν οι συγκεντρώσεις των αρχικών ενώσεων και των προϊόντων αλλάζουν. Αυτό συμβαίνει όταν οι ταχύτητες σχηματισμού και διάσπασης του συμπλόκου ES είναι ίσες.

Η νέα σταθερά, που ονομάζεται *Michaelis-Menten*, K_M , έχει μονάδες συγκέντρωσης υποστρώματος και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Η πορεία της ενζυμικής αντίδρασης εκφράζεται μαθηματικά με την παρακάτω σχέση, που είναι γνωστή ως εξίσωση Michaelis-Menten

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

Όπου

V_o : η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

V_{\max} : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

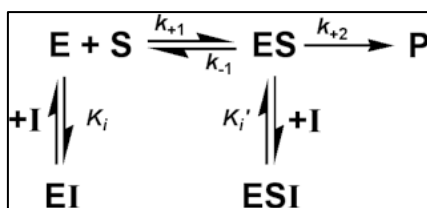
K_M : σταθερά *Michaelis-Menten*

S: υπόστρωμα

Η V_{\max} επιτυγχάνεται όταν το καταλυτικό κέντρο των μορίων του ενζύμου είναι κορεσμένα από τα υπόστρωμα, δηλαδή όταν $[ES]=[E]$. Όταν η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το ήμισυ της μέγιστης τιμής ($V_o=V_{\max}/2$), τότε η K_M είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $K_M=[S]$. [4]

1.5.1 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Η πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων μπορεί να επηρεάσει την δραστηριότητα πολλών ενζύμων. Τα βιολογικά συστήματα έχουν ως μηχανισμό ελέγχου αυτόν τον τρόπο αναστολής, με χαρακτηριστική τη ρύθμιση των αλλοστερικών ενζύμων. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς διαχωρίζονται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέονται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά.



Εικόνα7: Ένα γενικό σχήμα για την αναστολή ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Τα KES, KESI, KEI, αναπαριστούν τις σταθερές διάστασης. Το ESI θεωρείται ότι είναι ανενεργό.

Υπάρχουν πολλοί τύποι αντιστρεπτής αναστολής, με τρεις από αυτούς να είναι οι πιο σημαντικοί:

- Στη συναγωνιστική αναστολή, ένα ένζυμο μπορεί να προσδέσει υπόστρωμα (ES) ή αναστολέα (EI), αλλά όχι και τα δύο. Ο αναστολέας, επειδή μοιάζει με το υπόστρωμα, το συναγωνίζεται για την κατάληψη του καταλυτικού κέντρου με αποτέλεσμα το υπόστρωμα να μη μπορεί να συνδεθεί στο ίδιο κέντρο. Σε μία τέτοιου είδους αναστολή η V_{max} παραμένει ανεπηρέαστη, αλλά η φαινομενική K_M ($K_{Mapparent}$, $K_{M(app)}$) αυξάνεται κατά έναν παράγοντα $(1+[I]/K_{EI})$, δηλαδή μειώνεται η συγγένειά τους λόγω της παρέμβασης του αναστολέα. Αν η συγκέντρωση του υποστρώματος αυξηθεί, τότε η αναστολή μπορεί να αναιρεθεί. [4][5]

Η σταθερά διάστασης για τον αναστολέα δίνεται από τη σχέση

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

όπου

[I] η συγκέντρωση του αναστολέα

K_i Η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου αναστολέα

- Στη μη-συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να συνδέονται ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου αλλά σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης. Αυτού το είδους η αναστολή έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζεται η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου και να μην μπορεί να δεσμεύσει το υπόστρωμα αποτελεσματικά. Ελαττώνει, δηλαδή τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου και όχι την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδεμένα στο υπόστρωμα. Ένας μη-συναγωνιστικός αναστολέας δεν χρειάζεται να μοιάζει με το υπόστρωμα. Κατά τη μη-συναγωνιστική αναστολή η K_M του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα μένει η ίδια (δε μεταβάλλεται η συγγένεια ενζύμου -

υποστρώματος), ενώ η V_{max} ελαττώνεται κατά τον παράγοντα $\{1/(1 + [I]/K_{EI})\}$. Σε αυτή τη περίπτωση η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος δεν μπορεί να οδηγήσει στην άρση της επίδρασης του αναστολέα στην ταχύτητα. [4][5]

- Στην ασυναγωνίστη αναστολή, ο αναστολέας μπορεί να προσδέεται μόνο στο σύμπλοκο του ενζύμου-υποστρώματος. Η θέση πρόσδεσης του ασυναγωνίστου αναστολέα δημιουργείται μόνο κατά την αλληλεπίδραση του ενζύμου και του υποστρώματος. Στην ασυναγωνιστική αναστολή τόσο η K_M όσο και η V_{max} επηρεάζονται από τον αναστολέα. Η ασυναγωνίστη αναστολή δεν μπορεί να ξεπεραστεί με προσθήκη περισσότερου υποστρώματος. [4][5]

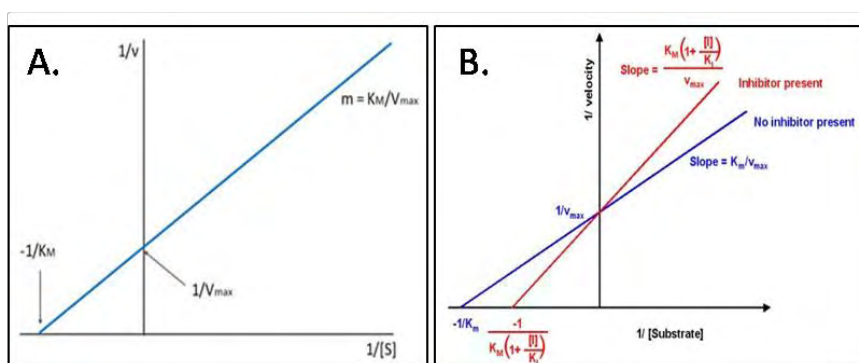
1.5.2 Επεξεργασία δεδομένων

Ο προσδιορισμός της V_{max} και της K_M είναι δύσκολο να γίνει από ένα διάγραμμα v ως προς $[S]$. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, η εξίσωση των *Michaelis-Menten* μπορεί να μετασχηματιστεί με διαφορετικούς τρόπους για να δώσει εύκολες γραφικές παραστάσεις. [5]

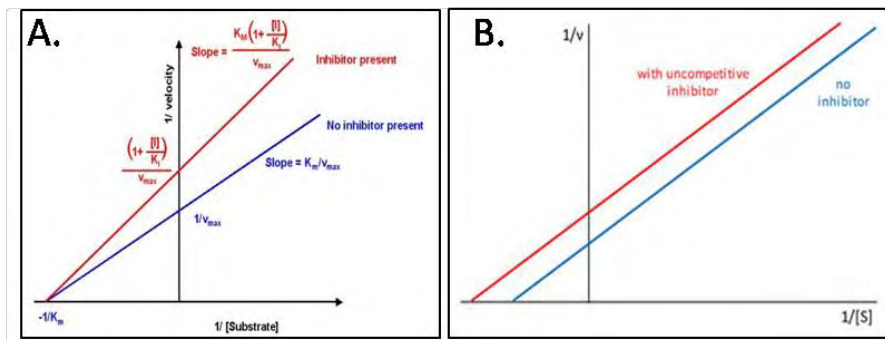
Ορισμένες από αυτές είναι:

1. Εξίσωση *Lineweaver-Burk*

Είναι ένα διάγραμμα $1/v$ ως προς $1/[S]$ και δίνει μια ευθεία γραμμή με κλίση K_M/V_{max} . Η τετμημένη επί την αρχή $= -1/K_M$ και η τεταγμένη επί την αρχή $= 1/V_{max}$. [5]



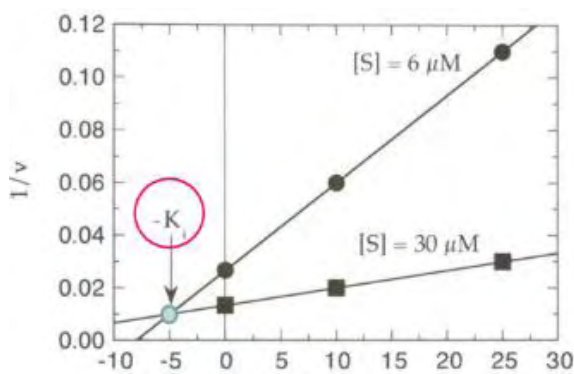
Εικόνα 8 : **A.** Εξίσωση *Lineweaver-Burk*. **B.** Εξίσωση *Lineweaver-Burk*-Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου συναγωνιστικού αναστολέα (<https://pharmafactz.com/medicinal-chemistry-understanding-enzyme-kinetics/>)



Εικόνα 9 : Α. Εξίσωση *Lineweaver-Burk*. Β. Εξίσωση *Lineweaver-Burk* μη-συναγωνιστικού αναστολέα ασυναγώνιστου αναστολέα (<https://pharmafactz.com/medicinal-chemistry-understanding-enzyme-kinetics/>)

2. Εξίσωση Dixon

Είναι ένα διάγραμμα του αντιστρόφου των τιμών της ταχύτητας ($1/v$) ως προς τη συγκέντρωση του αναστολέα $[I]$ παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων υποστρώματος $[S]$. Στο διάγραμμα αυτό οι ευθείες, που προσδιορίζονται παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων υποστρώματος, εμφανίζουν κοινή τομή που αντιστοιχεί στην τιμή $-K_i$.



Εικόνα 10 : Εξίσωση Dixon (<https://pharmafactz.com/medicinal-chemistry-understanding-enzyme-kinetics/>)

1.6 Αλλοστερικά ένζυμα

Ως αλλοστερικά ένζυμα ορίζονται τα ένζυμα τα οποία αποτελούνται από περισσότερες της μίας υπομονάδες οι οποίες επιδεικνύουν συνεργασιμότητα είτε κατά την δέσμευση του υποστρώματος είτε μετά από την επίδραση διαφόρων αλλοστερικών παραγόντων.

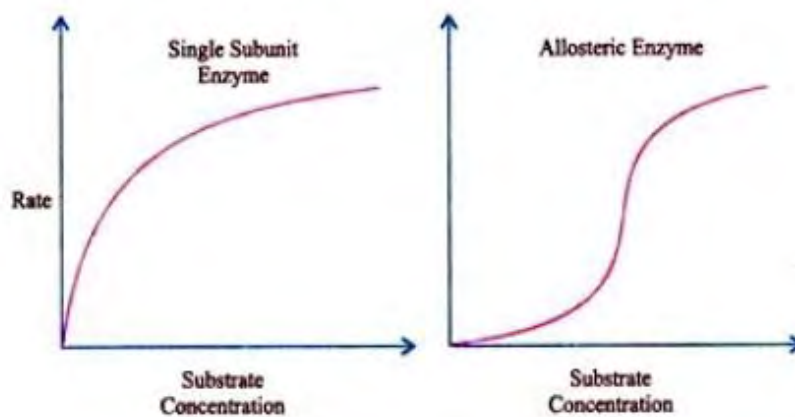
Τα αλλοστερικά ένζυμα διακρίνονται σε:

- α. Ομοτροπικά. Η ενζυμική ενεργότητα επηρεάζεται από το υπόστρωμα.
- β. ετεροτροπικά. Επηρεάζονται από διάφορους αλλοστερικούς παράγοντες

γ. ομοτροπικά ετεροτροπικά Σε κάθε περίπτωση η μεταβολή μπορεί να είναι είτε θετική είτε αρνητική και διακρίνουμε θετικούς και αρνητικούς τροποποιητές

Τα αλλοστερικά ένζυμα επιδεικνύουν μια διαφορετική κινητική από εκείνη την οποία παρουσιάζουν τα κανονικά ένζυμα (*Michaelis-Menten*) Η εξάρτηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από την συγκέντρωση του υποστρώματος παρουσιάζεται ως μία σιγμοειδής καμπύλη, η οποία φαίνεται να οφείλεται ακριβώς στη συνεργασιμότητα των υπομονάδων.

Τα αλλοστερικά ένζυμα αντιπροσωπεύουν σημαντικούς ρυθμιστικούς κόμβους σε μεταβολικές οδούς και είναι συχνά υπεύθυνοι για τη διατήρηση των κυττάρων στην ομοιόσταση. Ορισμένα καλά μελετημένα παραδείγματα αλλοστερικών ενζύμων περιλαμβάνουν τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. [12],[13]



Εικόνα 11 : Αριστερά, Η κινητική *Michaelis-Menten* και Δεξιά, των αλλοστερικών ενζύμων (Ashwathi P, Allosteric Enzymes: Properties and Mechanism | Microbiology)

1.7 Σκοπός

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι μία από τις πιο παλιές και γνωστές ασθένειες παγκοσμίως. Έχουν εξεταστεί διάφορα μονοπάτια στον οργανισμό, όπως αυτό της γλυκονεογένεσης ή του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, ως στόχοι για εύρεση θεραπείας, ωστόσο δεν ήταν κλινικώς αποτελεσματικά ή ασφαλή για τον άνθρωπο. Επιπλέον, η μέχρι σήμερα φαρμακολογική προσέγγιση για τον ΣΔ2 περιλαμβάνει την χορήγηση φαρμάκων με πολλές παρενέργειες, όπως η υπογλυκαιμία. Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι η αναστολή της γλυκογονόλυσης από το ήπαρ μέσω της αναστολής της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η αναστολή αυτού του ενζύμου μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της παραγωγής της γλυκόζης από το ήπαρ η οποία θα μπορούσε να βελτιώσει τον γλυκαιμικό έλεγχο των ασθενών. Αναστολείς της GP έχουν βρεθεί ότι μειώνουν τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα διαβητικών ποντικών. Για την GP έχουν εξεταστεί πάνω από 300 ενώσεις στοχεύοντας σε διαφορετικά κέντρα του ενζύμου η κάθε μία. Στην παρούσα εργασία έγινε η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου που επιτρέπει την ταχεία αξιολόγηση της πιθανής αναστολής ενώσεων που θα οδηγήσει σε παραγωγή πολλών δεδομένων, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στο σχεδιασμό νέων πιο ισχυρών αναστολέων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
Acetic acid (CH ₃ COOH)	Sds
α-D-Glucose 1-Phosphate Dipotassium Salt hydrate	Sigma
Acrylamide	Serva
Activated Charcoal	Sigma
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma
Ammonium Molybdate	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Ammonium sulfate	ChemLab
BES	Sigma
Bis acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolab
Bradford protein assay 5x	Biorad
Bromophenole blue	Research Organics
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Imidazole 99%	Sigma

KHCO ₃	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
Magnesium acetate tetrahydrate (CH ₃ COOH) ₂ Mg	Applichem
Methanol	Scharleu
Potassium chloride (KCl)	Merck
SDS	Serva
Sodium carbonate anhydrous	Sds
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Spermine	Sigma
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra Pure	Applichem
Zinc acetate	Sigma
β-GP	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Πυκνό διάλυμα αμμωνίας	Fluka

2.2 Οργανολογία

Όργανα	Εταιρεία
Πεχάμετρο	Metrohm
Υδατόλουτρο, WiseBath	Wisd
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρηση (minigel)	BioRad
Φυγόκεντρος - Z36HK	HermLe
Plate reader	Enspire
ÅKTA Purifier (FPLC)	GE Healthcare Life Sciences

2.3 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων (*rmGPb*)

Η απομόνωση της *rmGPb* έγινε από σκελετικούς μύες κονίκλων με τη μέθοδο Fisher&Krebs, όπου χρησιμοποιείται β-μερκαπτο-αιθανόλη αντί L-κυστεΐνης, σε όλα τα στάδια της πορείας του καθαρισμού.[20]

ΥΛΙΚΑ

- 3 αρσενικοί κόνικλοι (*Oryctolagus cuniculus*)
- Διάλυμα CH₃COOH 1N
- Ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης/HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA).
- Κεκορεσμένο διάλυμα KHCO₃
- Διάλυμα (NH₄)₂SO₄ κορεσμού 90 %
- Μεμβράνες διαπίδυσης (με κατώφλι 10 kDa)
- Διάλυμα 0.3 M β-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0
- Διάλυμα EDTA 0.1 M, pH 7.0
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.001 M, pH 7.5
- Διάλυμα Tris 2.0 M
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH 7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg, 1.0 M pH 7.0
- Γλυκερόλη

ΟΡΓΑΝΑ

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

Πειραματική διαδικασία

Ημέρα 1^η

A. Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος

Ο μυϊκός ιστός λαμβάνεται από τους ραχιαίους μυς κοντά στη σπονδυλική στήλη και τα πίσω πόδια από 3 αρσενικούς κονίκλους. Ο ιστός ζυγίζεται και τοποθετείται αμέσως σε πάγο. Στη συνέχεια, ομογενοποιείται σε παγωμένη κρεατομηχανή, ζυγίζεται και τοποθετείται σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία για όλο τον ιστό. Έπειτα, γίνεται εκχύλιση με απιονισμένο ύδωρ 3 φορές εν ψυχρώ, τις δύο πρώτες φορές χρησιμοποιείται όγκος απιονισμένου ύδατος όσο το βάρος του ομογενοποιημένου, ενώ στην τρίτη εκχύλιση χρησιμοποιείται μισός όγκος ύδατος σε σχέση με τον βάρος του ομογενοποιημένου. Ακολουθεί διήθηση μέσω διπλής γάζας και ο συνολικός χρόνος της εκχύλισης δεν ξεπερνάει τα 30 min. Το τελικό εκχύλισμα διηθείται μέσω υαλοβάμβακα για να απομακρυνθούν τα αιωρούμενα σωματίδια και τα λίπη. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για να βγει η GPb από τα ζωικά κύτταρα.

B. Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον.

Αρχικά, γίνεται ρύθμιση του pH του εκχυλίσματος στο 5.1-5.2 μέσω προσθήκης 1N CH₃COOH υπό ελαφρά ανάδευση, όπου παρατηρείται αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος εξαιτίας της κατακρήμνισης διάφορων πρωτεϊνών. Το εκχύλισμα αφήνεται σε πάγο για 5 min. Για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που καταβυθίστηκαν, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4 °C σε 4.225 rcf επί 30 min. Ακολουθεί διήθηση με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί *Buchner*, εν ψυχρώ, για να απομακρυνθούν υπολείμματα αιωρούμενου υλικού και κρατάμε το πρώτο δείγμα για την SDS-PAGE ανάλυση (δείγμα A). Τέλος, ρυθμίζεται το pH του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος σε 6.8 με τη χρήση κεκορεσμένου διαλύματος KHCO₃.

Γ. Καταβύθιση του ενζύμου με θειικό αμμώνιο (90 % κορεσμός).

Ο όγκος του θειικού αμμωνίου που προστίθεται υπολογίζεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο, αφού πρώτα γίνει ρύθμιση του pH του διαλύματος του θειικού αμμωνίου στο 6.8 με λίγες σταγόνες πυκνής αμμωνίας (NH₄OH)

$$(0.837) \times (\text{όγκος εκχυλίσματος})$$

Το θειικό αμμώνιο προστίθεται στο πρωτεϊνικό διάλυμα αργά και με ήπια ανάδευση. Το μίγμα αφήνεται στο ψυκτικό θάλαμο για 24 hrs. Τέλος, 20 λίτρα απιονισμένου ύδατος ψύχονται στο ψυκτικό θάλαμο για την παρασκευή του διαλύματος διαπίδυσης για την επόμενη ημέρα.

Ημέρα 2^η

Με την προσθήκη του θειικού αμμωνίου το ένζυμο καταβυθίζεται και σχηματίζονται δύο φάσεις, το υπερκείμενο και το ίζημα. Ο μεγαλύτερος όγκος του υπερκείμενου αποχύνεται με τη χρήση αντλίας ενώ το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4 °C σε 5110 rcf επί 40 min. Μετά τη φυγοκέντρηση αποχύνεται το υπερκείμενο διάλυμα και το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου (κρατάμε δείγμα B για SDS-PAGE ανάλυση). Στη συνέχεια, προετοιμάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001 M pH 7.5 όγκου 2 Lt με την εξής διαδικασία: 10 mL διαλύματος Tris 2 M αραιώνονται σε όγκο 400 mL με προσθήκη απιονισμένου ύδατος (συγκέντρωση περίπου 50 mM). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στη τιμή 7.5 με τη χρήση διαλύματος 1 N HCl και το διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται σε τελικό όγκο 20 Lt με τη χρησιμοποίηση του απιονισμένου ύδατος που έχει ψυχθεί. Έπειτα, τα σακουλάκια διαπίδυσης πλένονται καλά με απιονισμένο ύδωρ για να απομακρυνθεί η αιθανόλη μέσα στην οποία φυλάσσονται ώστε το διαλυτοποιημένο ένζυμο να τοποθετηθεί σε αυτά. Τέλος, τα γεμάτα πλέον με πρωτεϊνικό διάλυμα σωληνάκια διαπίδυσης εμβαπτίζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001 M, pH 7.5 και τα αφήνουμε στον ψυκτικό θάλαμο για 12 h υπό ανάδευση.

Προετοιμασία μεμβρανών διαπίδυσης

Κόβουμε την μεμβράνη στο μήκος που θέλουμε. Ζυγίζουμε 2.44 g EDTA και 6.5 g Na₂CO₃ για την προετοιμασία 650 mL διαλύματος. Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετούνται στο διάλυμα και αφήνονται να βράσουν για 30 min. Στη συνέχεια, τα σακουλάκια ξεπλένονται πολύ καλά με απιονισμένο νερό και τοποθετούνται σε απιονισμένο νερό όπου αφήνονται να βράσουν για περίπου 30 min. Αφού ξεπλυθούν πολύ καλά φυλάσσονται σε καθαρή αιθανόλης στους 4 °C.

Ημέρα 3^η

A. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Μετά τη διαπίδυση το πρωτεϊνικό διάλυμα συλλέγεται σε ογκομετρικό κύλινδρο και ακολουθεί διαύγαση με φυγοκέντρηση στις 34.540 rcf για 15 min σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο υγρό ογκομετρείται (95mL) και προστίθεται πρόσφατο διάλυμα 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος 0.3 M β-μερκαπτοαιθανόλης = πρωτεϊνικός όγκος x 3/27 = 95 mL x 3/27 = 10.55 mL

και διαλύματος EDTA 0.1 M, pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος EDTA 0.1 M = πρωτεϊνικός όγκος μετά την προσθήκη του διαλύματος 0.3 M β-μερκαπτοαιθανόλης X 5/1000 = (10.55 mL + 95 mL) X 5/1000 = 0.527 mL

Έπειτα, γίνεται ρύθμιση του pH του πρωτεϊνικού διαλύματος στο 8.8 με προσθήκη διαλύματος 2 M Tris αργά και υπό ανάδευση. Το μίγμα επώζεται σε θερμοκρασία 37 °, σε υδατόλουτρο επί 1 hr με ταυτόχρονη ανάδευση σε τακτά χρονικά

διαστήματα και έπειτα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 10 – 15 min και το pH ρυθμίζεται σε τιμή 7.0 με τη χρήση διαλύματος CH_3COOH 1 N (Δείγμα Γ για SDS-PAGE ανάλυση). Τέλος, για τη διαύγαση του διαλύματος πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 34.540 rcf επί 10 min σε 25-30 °C (Δείγμα Δ για SDS-PAGE ανάλυση).

B. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης b

Μετά τη διαύγαση, το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται και προστίθεται σε αυτό διάλυμα AMP 0.1 M, pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος AMP 0.1 M, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος x 1/100 = 105mL/100 = 1.05mL

και διαλύματος $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100 = 105mL/100 = 1.05mL

Το πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται σε μικρά tubes φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται, καλύπτεται με parafilm, και αφήνεται σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα για να κρυσταλλωθεί (οι κρύσταλλοι αρχίζουν να φαίνονται σε 1-2 h).

Ημέρα 4^η

Οι κρύσταλλοι της GP συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf σε θερμοκρασία 4 °C επί 10 min. Το κρυσταλλικό ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1, pH 6.8 σε θερμοκρασία 30 °C εντός του υδατόλουτρου. Ακολουθεί διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf επί 10 min σε θερμοκρασία 25-30 °C και ογκομέτρηση του υπερκείμενου ενζυμικού υγρού. Έπειτα, προστίθεται διάλυμα AMP 0.1 M, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος AMP 0.1 M, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100 = 61 mL/100 = 610 μL

και διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100 = 61 mL/100 = 610 μL

Το διάλυμα που προκύπτει (Δείγμα E για SDS-PAGE ανάλυση), τοποθετείται σε μικρούς σωλήνες φυγοκέντρησης, ισοζυγίζεται και αφήνεται σε πάγο στο ψυκτικό θάλαμο για 3-4 hrs (1η ανακρυστάλλωση). Η διαδικασία της 1ης ανακρυστάλλωσης επαναλαμβάνεται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο ύστερα από 3-4 hrs και έτσι λαμβάνει χώρα η 2η ανακρυστάλλωση (Δείγμα ΣΤ για SDS-PAGE ανάλυση), και το διάλυμα αφήνεται για μία νύκτα στον ψυκτικό θάλαμο.

Ημέρα 5^η

Η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης επαναλαμβάνεται, όπως περιγράφηκε την 4^η μέρα (1^η ανακρυστάλλωση) και έτσι λαμβάνει χώρα η 3^η ανακρυστάλλωση (Δείγμα Z για SDS-PAGE ανάλυση). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για δύο ακόμα φορές χωρίς την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ (Δείγμα Η και Δείγμα Θ για SDS-PAGE

ανάλυση). Στο τελικό ενζυμικό διάλυμα, τελικού όγκου 7.8 mL, προσδιορίζεται φωτομετρικά η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης β:

Προσθέτουμε 10 μL ενζυμικού δείγματος σε 2500 μL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 και ακολουθεί φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός σε μήκος κύματος 280 nm.

Η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίζεται από τη σχέση:

$(OD\ 280/1.32) \times (2510/10) = [GPb],\ mg/mL = 139,113\ mg/mL$, με απόδοση 1,085 g πρωτεΐνης ανά κιλό μυϊκού ιστού.

Τέλος, το ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται, προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης και φυλάσσεται στους -20°C.

2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού, κατά την οποία φορτισμένα μόρια μετακινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου στο εσωτερικό πηκτών ή διαλυμάτων. Διαφορετικά μόρια κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες και τα συστατικά ενός μίγματος διαχωρίζονται εάν βρεθούν μέσα σε κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο. Έτσι, μπορούν να προσδιοριστούν μείγματα ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους, όπως πρωτεϊνών, ενζύμων και ισοενζύμων ή μορίων με μικρότερο μοριακό βάρος, όπως πεπτιδίων.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των φορτισμένων μορίων εξαρτάται κυρίως από το καθαρό φορτίο, το μέγεθος του μορίου, την αντίσταση (λόγω της τριβής), το σχήμα του μορίου, και την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφόρηση είναι: η ιοντική ισχύς, το pH, η ένταση, η θερμοκρασία και ο χρόνος. [16]

2.4.1 Ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμιδίου

Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ουδέτερο και αποτελεί ένα τρισδιάστατο πλέγμα το οποίο προκύπτει από το πολυμερισμό δύο συστατικών:

α) των μονομερών ακρυλαμιδίου (MBA) και

β) του N,N1-μεθυλενο-bis-ακρυλαμιδίου (ή απλώς bis), το οποίο παίζει συνεκτικό ρόλο στο πήκτωμα.

Η αντίδραση πολυμερισμού γίνεται με την προσθήκη του N,N,N1N1,-τετραμεθυλεθυλενοδιαμίνης (TEMED) και του υπερθειικού αμμωνίου (ammoniumpersulfate, APS) Το TEMED επιταχύνει τη μετατροπή του APS σε ελεύθερες ρίζες θείου, οι οποίες ξεκινούν τον πολυμερισμό. [16],[17]

2.4.2 Ηλεκτροφόρηση σε SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) αποτελεί μια ταχεία, χαμηλού κόστους και ικανοποιητικά ακριβή μέθοδο για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών που τίθενται προς ανάλυση βασίζεται στη μοριακή τους μάζα. Το SDS προσδένεται στα υδρόφοβα τμήματα της πρωτεΐνης, διαλύοντας την τριτοταγή της δομή, ώστε να διατηρείται στο διάλυμα της σε διαμόρφωση χαμηλότερης οργάνωσης. Το σύμπλεγμα του SDS με την αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη, αποκτά σημαντικό αρνητικό φορτίο, που είναι ανάλογο με τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης, ενώ το φορτίο της αρχικής φυσικής δομής καθίσταται αμελητέο. Ως αποτέλεσμα, η μοριακή μάζα του συμπλόκου SDS-πρωτεΐνης είναι ανάλογη με το μέγεθος και κατ' επέκταση με το μήκος της αλυσίδας.

Μόλις παρασκευαστεί η πηκτή τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (runningbuffer: 25 mMTris, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS). Τα δείγματα προετοιμάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4× έτσι ώστε σε όλα η τελική αραιώση των δειγμάτων να είναι 1× (10 % glycerol, 2 % SDS, 154 mMTris, 1.25 % v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.01 % w/v bromophenolblue,). Στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5 min σε θερμοκρασία 95-98 °C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε δείγμα και έπειτα, τα δείγματα και ο πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών φορτώνονται στα πηγάδια. Τέλος, όλο το σύστημα συνδέεται σε τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 120 V στο κλειστό κύκλωμα μεταξύ της δεξαμενής της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στον **πίνακα 1** φαίνεται η σύσταση για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης πυκνότητας 10 %.

Παρασκευή πηκτωμάτων (% πυκνότητα)

		10%
Συστατικά	Επιστοίβαξης (3mL)	Διαχωρισμού (5mL)
dH ₂ O	2.1	1.9
30% Acrylamide-mix	0.5	1.7
Tris 1.5 m, pH 8.8	-	1.3
Tris 1.0 M, pH 8.8	0.38	-
SDS (10%)	0.03	0.05
APS 10%	0.03	0.05
TEMED	0.003	0.002

Πίνακας 1: Αναλογία συστατικών για την παρασκευή πηκτής με πυκνότητα 10 %.

Κάθε πηγαδάκι εκτός από το δείγμα της πρωτεΐνης περιέχει μερκαπτοαιθανόλη, γλυκίνη και γλυκερόλη. Με την προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, τα μόρια που περιέχονται σε κάθε μείγμα αποκτούν αρνητικό φορτίο και κινούνται από την κάθοδο προς την άνοδο. Η μερκαπτοαιθανόλη στο διάλυμα συμβάλλει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών ανάγοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ η γλυκερόλη αποτρέπει τη διάχυση των πρωτεϊνών στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, καθώς τις διατηρεί σε ένα πυκνότερο διάλυμα. Επίσης το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί το pH του περιβάλλοντος σταθερό. Η γλυκίνη, που υπάρχει στο runningbuffer, είναι ασθενές οξύ και μπορεί να απαντηθεί σε δύο καταστάσεις, ένα αφόρτιστο αμφιτεριόν (σε χαμηλές τιμή pH) ή ένα φορτισμένο γλυκινικό ανιόν (σε υψηλότερες τιμές pH). Κατά τη διαβίβαση ηλεκτρικού ρεύματος, τα ιόντα της γλυκίνης απομακρύνονται από την κάθοδο και κατευθύνονται προς την άνοδο. Στην άνοδο βρίσκεται η πηκτή επιστοιβάξης και τα δείγματα που έχουν χαμηλή τιμή pH (pH 6.8) οπότε η γλυκίνη χάνει το φορτίο της και κινείται με μικρή ταχύτητα. Παράλληλα, στην πηκτή και στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιέχονται ιόντα χλωρίου που μετακινούνται, επίσης, από την κάθοδο με υψηλή κινητικότητα. Έτσι, δημιουργείται μια στενή ζώνη χαμηλής αγωγιμότητας στην κορυφή της πηκτής επιστοιβάξης όπου συγκεντρώνεται όλη η τάση του ρεύματος. Η πολύ υψηλή τάση του πεδίου οδηγεί τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες (από το SDS) να μεταναστεύσουν προς την κάθοδο.

Οι πρωτεΐνες, κινούνται ταχύτερα από τη γλυκίνη, αλλά βραδύτερα από τα ιόντα χλωρίου, λόγω του υψηλού λόγου φορτίο/μάζα που διαθέτουν σε σχέση με τη γλυκίνη, με αποτέλεσμα τη συμπύκνωση του μετώπου ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε μια πολύ στενή ζώνη που μεταναστεύει προς την πηκτή διαχωρισμού. Όλες οι πρωτεΐνες που εμπεριέχονται στην πηκτή εισέρχονται ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού. Με την είσοδο στην πηκτή διαχωρισμού η γλυκίνη φορτίζεται αρνητικά λόγω της υψηλότερης τιμής του pH και κινείται ταχύτερα προς την κάθοδο, ενώ οι πρωτεΐνες επιβραδύνονται διότι η πηκτή δρα ως ηθμός. Οι πρωτεΐνες αρχίζουν να διαχωρίζονται στο ενιαίο ηλεκτρικό πεδίο ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Όσο μεγαλύτερο μοριακό βάρος και μέγεθος έχει μια πρωτεΐνη, τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητά της στην πηκτή. [17]

2.5 Χρώση πηκτώματος

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετήθηκε σε διάλυμα 10 % v/v οξικού οξέος έως ότου παρατηρήθηκε βρασμός σε φούρνο μικροκυμάτων. Το διάλυμα οξικού οξέος αποχύθηκε και τοποθετήθηκε σε διάλυμα χρώσης, το οποίο περιείχε 0.1 % w/v *CoomassieBlueR250*, 50 % v/v μεθανόλη και 10 % v/v οξικό οξύ. Έπειτα, η πηκτή τοποθετήθηκε και πάλι μέχρι βρασμού στον φούρνο μικροκυμάτων και έμεινε υπό ανάδευση για 10 min. Στη συνέχεια, το διάλυμα χρώσης αποχύθηκε και προστέθηκε εκ νέου διάλυμα οξικού οξέος 10 % v/v, το οποίο προστέθηκε ξανά σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου παρατηρηθεί βρασμός. Η τελευταία διαδικασία

επαναλήφθηκε για τρεις φορές και τέλος, το πήκτωμα έμεινε σε διάλυμα οξικού οξέος 10 % v/v μέχρι να αποχρωματιστεί από τη χρώση CoomassieBlue. [18]

2.6 Κινητικές μελέτες έναντι της GP

Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση είναι αμφίδρομη *invitro*. Στις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έναντι της GP μελετήθηκε η αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, δηλαδή η ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο ώστε να προκύψει γλυκογόνο με ένα περισσότερο κατάλοιπο γλυκόζης με παράλληλη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά ώστε να ποσοτικοποιηθούν με την μέθοδο του ασκορβικού οξέος. Κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση των κατάλληλων συγκεντρώσεων υποστρωμάτων και ενζυμικού διαλύματος για την ανάπτυξη του πρωτοκόλλου, καθώς και για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής (K_i) ως προς την γλυκόζη.

2.6.1 Φασμαφωτομετρικός προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ιόντων

Η αρχή της μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων βασίζεται στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των φωσφορικών ιόντων, με τη δημιουργία χρωμοφόρου συμπλόκου ένωσης. Τα ορθοφωσφορικά ιόντα σχηματίζουν σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου (Zn^{2+}), το οποίο ανάγεται από το ασκορβικό οξύ και παράγεται ένα χρωμοφόρο, το οποίο έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε pH 5.0. Απουσία ορθοφωσφορικών ιόντων, το χρωμοφόρο δεν παράγεται.

Παρασκευή διαλυμάτων:

- 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου και 100 mM οξικού ψευδαργύρου. Το pH του μίγματος ρυθμίζεται στο 5.0 με πυκνό HCl.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10 % w/v, pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με πυκνό NaOH και το διάλυμα φυλάσσεται σε αδιαφανές μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου.

Αφού ετοιμάσουμε τα δύο διαλύματα και ρυθμίσουμε το pH, αναμιγνύουμε το διάλυμα οξικού ψευδαργύρου/μολυβδαινικού αμμωνίου με το διάλυμα ασκορβικού οξέος σε αναλογία 4:1 σε ένα αδιαφανές σκούρο δοχείο. Το μίγμα αυτό επωάζεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτευχθεί ο σχηματισμός της έγχρωμης ένωσης. Στη συνέχεια, προσθέτουμε στα δείγματα κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος και τα αφήνουμε για επώαση σε θερμοκρασία 30°C για άλλα 15 min σε υδατόλουτρο. Επιπλέον, παρασκευάζουμε ένα δείγμα αναφοράς ορθοφωσφορικών, στο οποίο θα μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση, για να το

χρησιμοποιήσουμε ως πρότυπο κατά τον υπολογισμό της ποσότητας των φωσφορικών που έχουν παραχθεί κατά την αντίδραση στα άγνωστα δείγματα.[15]

2.6.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, παρασκευάζεται ένα ενζυμικό διάλυμα σε σωληνάκι (βλ. Ενότητα 2.6.3) και τοποθετείτε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C για επώαση για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, ετοιμάζονται τα διαλύματα υποστρωμάτων (βλ. Ενότητα 2.6.4) σε ένα plate (B1-B5 σειρά-οριζόντια) και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο για 5 min πριν την λήξη των 15 min της επώασης του ενζυμικού διαλύματος, ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ένζυμο. Ακολούθως, από το σωληνάκι του ενζυμικού διαλύματος μεταφέρουμε 75 μL σε κάθε βοθρίο του πιάτου (A1-A5 σειρά-οριζόντια). Μετά το πέρας της επώασης λαμβάνουμε με τη χρήση πολυπιπέτας 72 μL από το ενζυμικό διάλυμα, που βρίσκεται στην A σειρά, και τα προσθέτουμε στα 288 μL του διαλύματος υποστρώματος, που βρίσκεται στην B σειρά. Εκείνη τη χρονική στιγμή, όπου $t=0$, ξεκινάει η ενζυμική αντίδραση, η οποία εξελίσσεται σε όγκο αντίδρασης ίσο με 360 μL . Στη συνέχεια, λάβαμε 40 μL από το μείγμα της αντίδρασης (B σειρά) και τα αποθέσαμε σε 20 μL SDS 0.5% (σειρά C, D, E ,F ,G, H), ανά διαφορετικές μονάδες χρόνου. Κατά την ανάπτυξη του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου έγινε δοκιμή διαφορετικών χρονικών στιγμών που σταματήσαμε την αντίδραση, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις του ενζύμου που μελετήσαμε κάθε φορά. Κατόπιν, κάναμε έντονη ανάδευση με την πιπέτα ώστε να σταματήσει τελείως η αντίδραση. Έπειτα, παρασκευάσαμε τα διαλύματα τυφλών (βλ. Ενότητα 2.6.5) στο πιάτο εις διπλούν (A6-E6, A7-E7-κάθετη σειρά) και το τοποθετήσαμε σε θερμοκρασία 4 °C. Ακολούθως, παρασκευάσαμε το διάλυμα φωτομέτρησης και προσθέσαμε 250 μL με τη χρήση πολυπιπέτας σε όλα τα δείγματα καθώς και στα τυφλά. Επώασαμε για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C και φασματοφωτομετρήσαμε σε μήκος κύματος 850 nm αφού πρώτα μηδενίσαμε με το τυφλό dH_2O χρησιμοποιώντας το μηχάνημα platereader (PerkinEnspire).

2.6.3 Ενζυμικό διάλυμα

Για την παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος απαιτείται ένζυμο, ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1, γλυκογόνο και νερό. Σε κάθε απαιτούμενη χρήση, το ένζυμο, το οποίο είναι αποθηκευμένο σε 50 % v/v γλυκερόλη σε θερμοκρασία -20 °C, αραιώνεται και προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά η συγκέντρωσή του σε μήκος κύματος 280 nm.

Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου κατά την ενζυμική αντίδραση, οι οποίες ήταν 1.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 360 μL .

➤ **Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος με τελική συγκέντρωση 1.1 µg/mL**

Η συγκέντρωση του αραιωμένου ενζύμου ήταν $C=350$ µg/mL. Στο ενζυμικό διάλυμα το ένζυμο έχει συγκέντρωση 5.5 µg/mL σε όγκο 2400 µL, ώστε στον όγκο της αντίδρασης που είναι 360 µL, να έχουμε 1.1 µg/mL.

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Glycogen 10% w/v: 240 µL	Glycogen: 1% w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1: 120 µL	Ρυθμιστικό διάλυμα: 2.5:2.5:0.05
rmGPb: 37.7µL	rmGPb: 5.5µg/mL
dH₂O: 2002.3µL	
V _τ =2400 µL	

Πίνακας 2 : Παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος rmGPb με τελική συγκέντρωση 1.1 µg/mL.

➤ **Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος με τελική συγκέντρωση 1.5 µg/mL**

Η συγκέντρωση από την αραιώση του ενζύμου ήταν $C=309$ µg/mL. Στο ενζυμικό διάλυμα το ένζυμο έχει συγκέντρωση 7.5 µg/mL σε όγκο 2400 µL, ώστε στον όγκο της αντίδρασης που είναι 360 µL, να έχουμε 1.5 µg/mL.

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Glycogen 10% w/v: 240 µL	Glycogen: 1% w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1: 120 µL	Ρυθμιστικό διάλυμα: 2.5:2.5:0.05
rmGPb: 58.3µL	rmGPb: 7.5 µg/mL
dH₂O: 1981.7µL	
V _τ =2400 µL	

Πίνακας 3 : Παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος rmGPb με τελική συγκέντρωση 1.5 µg/mL.

➤ **Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος με τελική συγκέντρωση 3 µg/mL**

Η συγκέντρωση από την αραιώση του ενζύμου ήταν $C=309$ µg/mL. Στο ενζυμικό διάλυμα το ένζυμο έχει συγκέντρωση 15 µg/mL σε όγκο 2400 µL, ώστε στον όγκο της αντίδρασης που είναι 360 µL, να έχουμε 3 µg/mL.

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Glycogen 10% w/v: 240 µL	Glycogen: 1% w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1: 120 µL	Ρυθμιστικό διάλυμα: 2.5:2.5:0.05
rmGPb: 116.6µL	rmGPb: 15µg/mL
dH₂O: 1923.4 µL	
V _τ =2400µL	

Πίνακας 4 : Παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος rmGPb.

2.6.4 Διαλύματα υποστρωμάτων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην πειραματική διαδικασία μελετήθηκε η αντίστροφη πορεία της αντίδρασης που καταλύει η φωσφορυλάση, δηλαδή η προσθήκη της G1P στο μακρομόριο του γλυκογόνου. Επομένως, το υπόστρωμα στις παρούσες κινητικές μελέτες ήταν η α-D-1-φωσφορική γλυκόζη (G1P).

Αρχικά, παρασκευάστηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 1 (AssayBuffer 1), το οποίο περιείχε 400 mM KCl, 200 mM ιμιδαζόλιο, 4 mM DTT, 4 mM EDTA, pH 6.8. Από αυτό με αραιώση παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 2 (AssayBuffer 2), το οποίο περιείχε 270 mM KCl, 135 mM ιμιδαζόλιο, 2.7 mM DTT, 2.7 mM EDTA, pH 6.8. Οι διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος που μελετήθηκαν βρίσκονταν αραιωμένες σε αυτό το ρυθμιστικό διάλυμα (AssayBuffer 2).

Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις G1P προέκυψαν από ένα πυκνό υδατικό διάλυμα G1P με συγκέντρωση 400mM, στο οποίο το pH ρυθμίστηκε στο 6.8. Αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -20°C, αφού πρώτα διαμοιράστηκε σε κλάσματα των 500 μL. Από την G1P με συγκέντρωση 400mM παρασκευάστηκε G1P με συγκέντρωση 90 mM ως εξής:

Αρχικές συγκεντρώσεις και ποσότητες	Τελικές συγκεντρώσεις
G1P400mM: 1912.5 μL	G1P: 90mM
Assay Buffer 1: 5737.5 μL	Assay Buffer 2
dH₂O: 850μL	
V _τ =8500μL	

Πίνακας 5 : Παρασκευή G1P 90 mM

Οι υπόλοιπες αραιώσεις G1P που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν με αραιώση από την G1P 90 mM χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2. Από αυτές τις αραιώσεις παρασκευάσαμε τα υποστρώματα (πίνακας 5) ώστε οι συγκεντρώσεις της G1P στην αντίδραση (360 μL) να ήταν 2, 3, 4, 6 και 8 mM, όπως φαίνεται στον πίνακα 6.

G1P 90mM(μL)	Assay buffer 2 pH 6.8 (μL)	Συγκέντρωση της αραιωμένης G1P (mM)	[G1P], mM σε 360 μL της αντίδρασης
100	900	9	2
150	850	13.5	3
200	800	18	4
300	700	27	6
400	600	36	8
V _τ =1000μL			

Πίνακας 6 : Παρασκευή πυκνών διαλυμάτων των υποστρωμάτων

2.6.4.1 Προσδιορισμός της K_M

Για τον προσδιορισμό της K_M τα διαλύματα υποστρωμάτων περιείχαν: *G1P* και *AMP*. Ο όγκος του κάθε διαλύματος υποστρώματος ήταν 288 μL .

Υποστρώματα	
[AMP]: 25 mM	14.4 μL
dH ₂ O	193.6 μL
[G1P]: 9, 13.5, 18, 27 και 36 mM	80 μL
V _τ =288 μL	

Πίνακας 7 : Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος για κάθε συγκέντρωση G1P

Οι συνθήκες διεξαγωγής του της αντίδρασης στα 360 μL ήταν pH6.8, θερμοκρασία 30 °C, 60 mM KCl, 30 mM μιδαζόλιο, 0.6 mM DTT, 0.6 mM EDTA, 1 % ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1

2.6.4.2 Προσδιορισμός της K_i

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής (K_i) της α -D γλυκόζης ως προς την *gmGPb*, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία, προσδιορίζοντας την K_M παρουσία σταθερής συγκέντρωσης γλυκόζης, δηλαδή προσδιορίσαμε τις φαινομενικές τιμές της K_M (apparent, $K_{M(\text{app.})}$). Για να προσδιοριστεί η K_i απαιτούνται τουλάχιστον 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Ο προσδιορισμός της K_i έγινε για την α -D γλυκόζη παρουσία συγκεντρώσεων 0.5, 1, 1.5, 2 mM σε 360 μL της αντίδρασης. Η α -D γλυκόζη έχει μοριακό βάρος 180.16 g/mole. Ζυγίσαμε 0.0504 g και τα διαλύσαμε σε 5 mL dH₂O, και έτσι παρασκευάζεται διάλυμα α -D γλυκόζης με συγκέντρωση 50 mM. Με αραιώση, παρασκευάζουμε ένα διάλυμα με συγκέντρωση 5 mM.[14] Αυτή η αραιώση χρησιμοποιήθηκε για να παρασκευάσουμε τα διαλύματα των υποστρωμάτων, όπως παρουσιάζονται παρακάτω:

➤ 0.5 mM α -D-γλυκόζη

Υποστρώματα	
[AMP]: 25 mM	14.4 μL
dH ₂ O	157.6 μL
[Γλυκόζη], 5 mM	36 μL
[G1P]: 9, 13.5, 18, 27 και 36 mM	80 μL
V _τ =288 μL	

Πίνακας 8: Υποστρώματα με συγκέντρωση α -D-γλυκόζης 0.5 mM

➤ 1mM α-D-γλυκόζη

Υποστρώματα	
[AMP]: 25 mM	14.4 μL
dH ₂ O	121.6 μL
[Γλυκόζη], 5 mM	72 μL
[G1P]: 9, 13.5, 18, 27 και 36 mM	80 μL
V _τ =288 μL	

Πίνακας 9: Υποστρώματα με συγκέντρωση α-D-γλυκόζης 1 mM

➤ 1.5 mM α-D-γλυκόζη

Υποστρώματα	
[AMP]: 25 mM	14.4 μL
dH ₂ O	85.6 μL
[Γλυκόζη], 5 mM	108 μL
[G1P]: 9, 13.5, 18, 27 και 36 mM	80 μL
V _τ =288 μL	

Πίνακας 10: Υποστρώματα με συγκέντρωση α-D-γλυκόζης 1.5 mM

➤ 2 mM α-D-γλυκόζη

Υποστρώματα	
[AMP]: 25 mM	14.4 μL
dH ₂ O	49.6 μL
[Γλυκόζη], 5 mM	144 μL
[G1P]: 9, 13.5, 18, 27 και 36 mM	80 μL
V _τ =288 μL	

Πίνακας 11: Υποστρώματα με συγκέντρωση α-D-γλυκόζης 2 mM

2.6.5 Προσδιορισμός τυφλών μαρτύρων

Όπως αναφέραμε και στην πειραματική διαδικασία (ενότητα 2.6.2), παρασκευάζουμε και διαλύματα τυφλών μαρτύρων ώστε να ποσοτικοποιήσουμε μόνο τα ορθοφωσφορικά ιόντα που παράγονται από την αντίδραση και όχι αυτά που υπάρχουν στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούμε.

Τυφλά	SDS 0.5% (w/v)	dH ₂ O	
T _{dH2O}	20 μL	40 μL	-
T _{rmGPb}	20 μL	32 μL	Αραίωση ενζυμικού διαλύματος: 8 μL
T _{G1P}	20 μL	31.1 μL	[G1P], 36 mM: 8.9 μL
T _{Pi}	20 μL	30 μL	[Pi], 1 mM: 10 μL

Πίνακας 12 : Παρασκευή τυφλών δειγμάτων

Επομένως στα τυφλά είχαμε 1.1 ή 1.5 ή 3 $\mu\text{g/mLrmGPb}$ (0.2 % γλυκογόνο, 1 % ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1), 8 mM G1P και 0.25 mM Pi. Από την απορρόφηση που πήραμε για τα 8 mM G1P, κάναμε αναγωγή για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις

2.6.6 Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων και η κατασκευή των διαγραμμάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα GraFit.[19] Αρχικά, προσδιορίστηκε η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ως προς τις συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, έτσι ώστε να υπολογιστούν οι κινητικές παράμετροι (K_M , V_{max} , K_i). Η ειδική δραστηριότητα ορίζεται ως τα μmole του υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε mg πρωτεΐνης, δηλαδή $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

Για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας από τις μετρήσεις του κινητικού πειράματος, υπολογίστηκαν αρχικά τα μmole φωσφορικών ιόντων που παρήχθησαν μόνο από την αντίδραση. Το πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων που είχε παρασκευαστεί, είχε συγκέντρωση 0.25 mM. Τα 0.25 mM ορθοφωσφορικών ιόντων αντιστοιχούσαν σε 0.01 μmol ορθοφωσφορικών ιόντων, διότι:

$$0.25 \text{ mM} = 0.25 \text{ mmole/Lt} = 0.25 \mu\text{mole/mL}$$

Άρα σε 1000 μL περιέχονταν 0.25 μmol ορθοφωσφορικών ιόντων. Επομένως, σε 40 μL που ήταν ο όγκος του τυφλού των ορθοφωσφορικών ιόντων που φωτομετρήθηκαν είχαμε 0.01 μmol ορθοφωσφορικών. Αν υποθέσουμε ότι το τυφλό των ορθοφωσφορικών ιόντων είχε απορρόφηση 1, τότε αυτή η απορρόφηση δηλώνει την παρουσία 0.01 μmol ορθοφωσφορικών ιόντων. Με αυτό τον τρόπο υπολογίσαμε την ποσότητα των ορθοφωσφορικών ιόντων σε μmol για κάθε μία από τις μετρήσεις που λάβαμε. Ας υποθέσουμε ότι μία μέτρηση έδωσε απορρόφηση 2. Για να υπολογίσουμε τα μmole ορθοφωσφορικών ιόντων που υπήρχαν μέσα στο δείγμα έπρεπε να αφαιρέσουμε τις απορροφήσεις που προήλθαν από το ενζυμικό διάλυμα και την G1P. Έτσι, η απορρόφηση των ορθοφωσφορικών ιόντων ισούταν με:

$$(\text{Απορρόφηση-2} - \text{Abs}_{\text{τυφλού ενζυμικού διαλύματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού G1P}}) = \text{Abs}_{\text{φωσφορικών του δείγματος}} = C$$

Εφόσον γνωρίζουμε ότι τα 0.01 μmol έδωσαν απορρόφηση-1, τότε τα μmole των ορθοφωσφορικών ιόντων στο δείγμα ισούταν με:

$$\frac{c \times 0.01}{A} \text{ ή } \frac{B}{A \times 100} = \mu\text{mol ορθοφωσφορικών ιόντων στο άγνωστο δείγμα}$$

Έπειτα, υπολογίσαμε την ειδική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας μη γραμμική εξίσωση λαμβάνοντας υπόψη το ανώτατο όριο υδρόλυσης και ένα συντελεστή f.

$$\text{limit} = 0.78 [\text{G1P}] \text{ assay volume}$$

Όπου: 0.78 : το % ποσοστό της G1P που έχει καταναλωθεί για παραγωγή ορθοφωσφορικών ιόντων όταν η αντίδραση φτάσει σε ισορροπία.

[G1P] : η συγκέντρωση της G1P στην αντίδραση

Assay volume: Ο όγκος που λάβαμε για να σταματήσουμε την αντίδραση (40 μL).

Και,

Όπου : C : η συγκέντρωση του ενζύμου στον όγκο της αντίδρασης που ισούταν με 1.1×10^{-3} ή 1.5×10^{-3} ή $3 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_M , mM) και των φαινομενικών σταθερών Michaelis-Menten ($K_{M(\text{app.})}$, mM) παρουσία αναστολέων, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Michaelis-Menten

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

Όπου :

v: ταχύτητα

V_{max} : μέγιστη ταχύτητα

[S] : συγκέντρωση υποστρώματος

[T] K_M : σταθερά Michaelis-Menten.

Ακολουθως, έγινε η καμπύλη (nonlinearfit) $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού. Η K_M και οι $K_{M(\text{app.})}$, υπολογίστηκαν από το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου Lineweaver-Burk. [28] Για τον υπολογισμό της K_i , αφού υπολογίστηκαν πρώτα οι $K_{M(\text{app.})}$ παρουσία του αναστολέα, κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα που στον γγ' άξονα τοποθετήθηκαν οι τιμές των $K_{M(\text{app.})}$ και στον xx' οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν. Τέλος, χρησιμοποιώντας γραμμική εξίσωση (linearfit) υπολογίστηκε η K_i στο σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα xx', το σημείο αυτό ισούται με το $-K_i$. Η γραμμική αυτή εξίσωση ήταν του τύπου:

$$y = ax + b$$

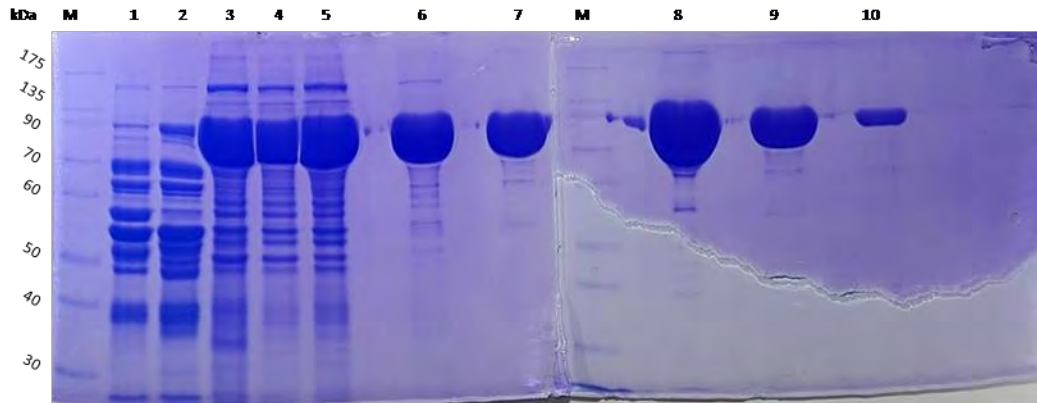
Όπου:

a : η κλίση της ευθείας (gradient ή slope)

b : η τεταγμένη επί της αρχής (intercept)

3. Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση και καθαρισμός της gmGPb



Εικόνα 12: 10% SDS-PAGE ανάλυση, από την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (97 kDa). Στη διαδρομή με την αναγραφή Marker: παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Σε κάθε διαδρομή έχουμε διαφορετικά δείγματα από τα διάφορα στάδια της απομόνωσης του ενζύμου. Στην διαδρομή 1(Δείγμα Α): το μυϊκό εκχύλισμα μετά την διήθηση μέσω υαλοβάμβακα., στη 2(Δείγμα Β): καταβύθιση με θειικό αμμώνιο, στη 3(Δείγμα Γ) από διαύγαση, προσθήκη β-μερκαπταιθανόλης και EDTA και ρύθμιση pH, στη 4: (Δείγμα Δ) διαύγαση και φυγοκέντρηση, στη 5:(Δείγμα Ε) 1η ανακρυστάλλωση, στην 6:(Δείγμα ΣΤ) 2η ανακρυστάλλωση, στην 7:(Δείγμα Ζ) 3η ανακρυστάλλωση (χωρίς προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$), στην 8:(Δείγμα Η) 4η ανακρυστάλλωση, στην 9:(Δείγμα Θ) 5η ανακρυστάλλωση, στη 10: Το τελικό προϊόν, μετά από αραίωση

Παρατηρούμε πως η καθαρότητα και η ποσότητα της πρωτεΐνης αυξάνεται σημαντικά κατά τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων. Στις ανακρυσταλλώσεις κρυσταλλώνεται η gmGPb ενώ οι πρωτεΐνες που δεν κρυσταλλώνονται απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. Τέλος, στη διαδρομή 10, φαίνεται πως η καθαρότητα της φωσφορυλάσης είναι περισσότερη από 95 %.

Η συνολική απόδοση της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού ήταν:

1.085 g ανά 2.340 kg σκελετικών μυών κονίκλων.

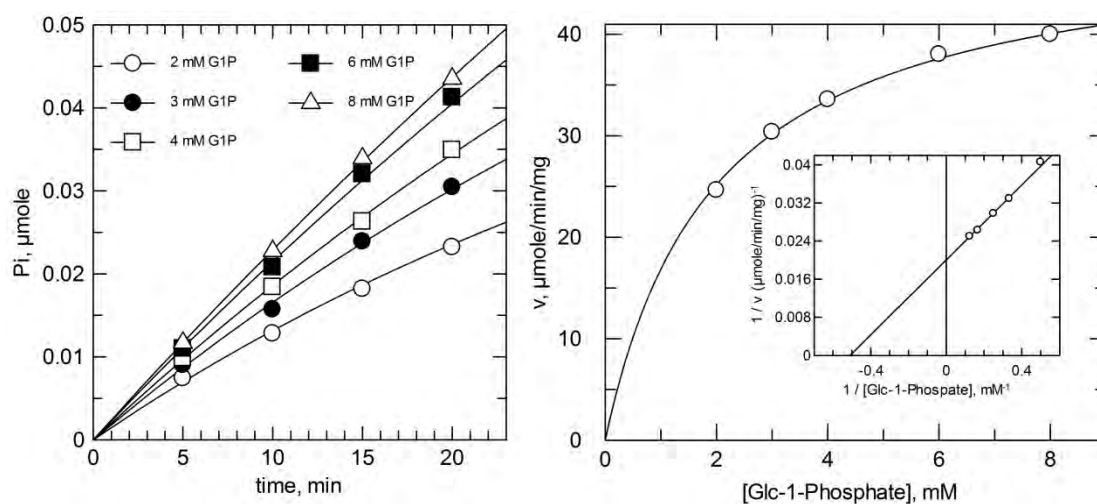
3.2 Κινητικές μελέτες

Μετά από πολλές δοκιμές, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, ενζύμου, χρόνων και όγκου διαλύματος φωτομέτρησης καταλήξαμε στα εξής:

- Συγκέντρωση ενζύμου: 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Συγκεντρώσεις G1P : 2,3,4,6,8 mM
- Χρόνοι όπου σταματούσαμε την αντίδραση: 5, 10, 15, 20 min
- Όγκος διαλύματος φωτομέτρησης: 250 μL

3.2.1 Προσδιορισμός της K_M

Για τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής έγινε αρχικά προσδιορισμός της K_M και της V_{max} του ενζύμου που απομονώθηκε.



Διάγραμμα 1: Αριστερά: Οι καμπύλες προϊόντος/χρόνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Δεξιά: Το διάγραμμα *Michaelis-Menten* και στο ένθετο παρουσιάζεται το διάγραμμα *Lineweaver-Burck*.

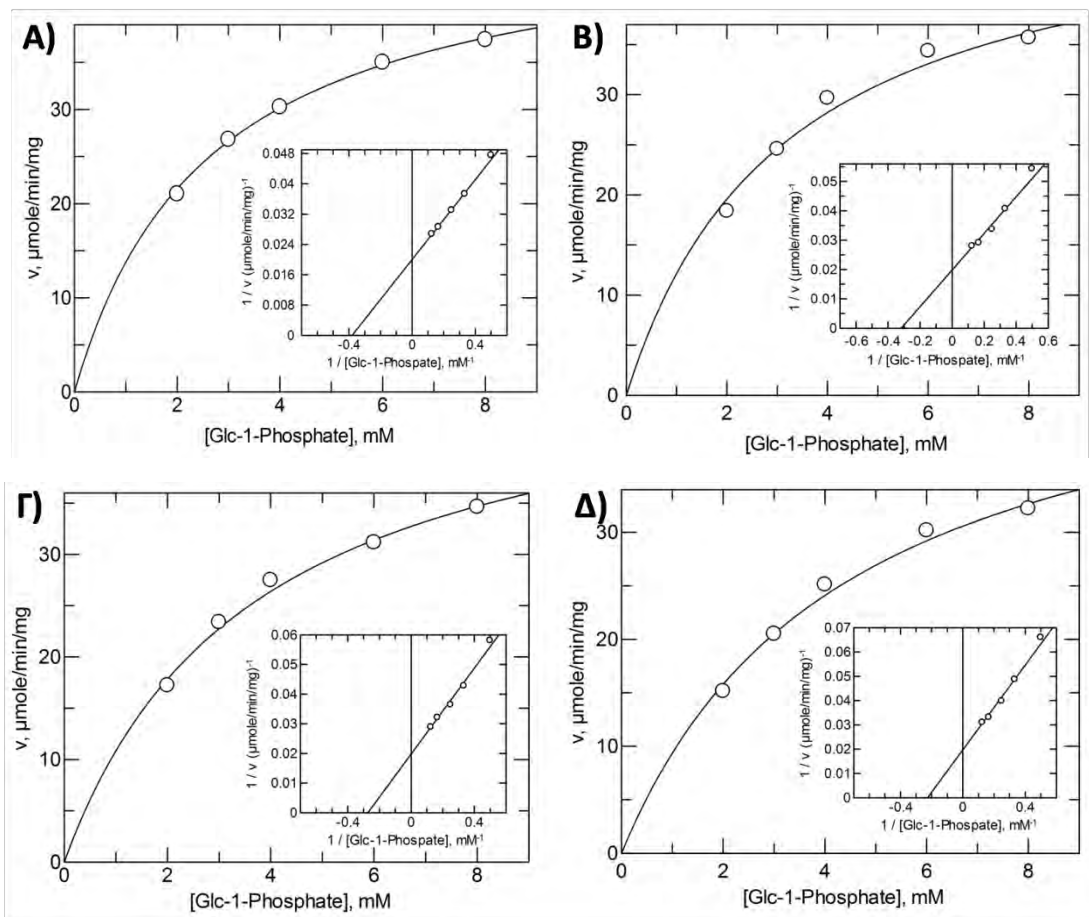
Οι κινητικές παράμετροι υπολογίστηκαν στα:

$$K_M: 1.96 \pm 0.08 \text{ mM}$$

$$V_{max}: 49.88 \pm 0.49 \text{ μmole/min/mg}$$

3.2.1 Προσδιορισμός της K_i της α -D γλυκόζης ως προς την *rmGPb*

Μετά τον προσδιορισμό της K_M συνεχίσαμε με τον προσδιορισμό των φαινομενικών τιμών της K_M (apparent, $K_{M(app.)}$). Για να προσδιοριστεί η K_i χρειάζονται τουλάχιστον 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Ο προσδιορισμός της K_i έγινε για την α -D γλυκόζη παρουσία συγκεντρώσεων 0.5, 1, 1.5, 2 mM δεδομένου ότι από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό πως η K_i ως προς την *rmGPb* είναι 1.7 mM [14]. Στα διαγράμματα 2Α,Β,Γ,Δ παρουσιάζονται τα διαγράμματα *Michaelis-Menten* και στο ένθετο τα διαγράμματα *Lineweaver-Burk* από τα οποία υπολογίστηκαν οι $K_{M(app.)}$ και $V_{max(app.)}$.



Διάγραμμα 2: Παρουσιάζονται τα διαγράμματα *Michaelis-Menten* και στο ένθετο τα διαγράμματα *Lineweaver-Burk* κατά τον προσδιορισμό των $K_{M(app.)}$ παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων α -D γλυκόζης: Α) 0.5 mM Β) 1.5 mM Γ) 1.5 mM και Δ) 2 mM

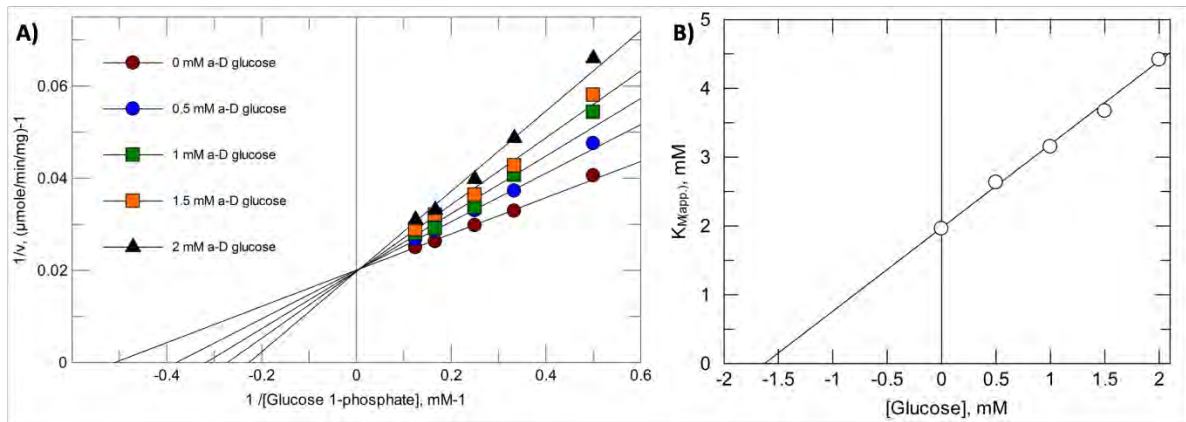
Οι τιμές των $K_{M(app.)}$ και $V_{max(app.)}$ που υπολογίστηκαν κατά τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής παρουσιάζονται στον πίνακα 13.

[α -D γλυκόζη], mM	$K_{M(app.)}$, mM	$V_{max(app.)}$, $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$
0	1.9617 ± 0.0821	49.8827 ± 0.4950
0.5	2.6334 ± 0.1391	49.9767 ± 0.8750
1	3.1512 ± 0.5116	50.4443 ± 3.0460
1.5	3.6718 ± 0.3680	50.6117 ± 2.0795
2	4.4171 ± 0.6251	50.6980 ± 3.0760

Πίνακας 13 : Οι τιμές των $K_{M(app.)}$ και $V_{max(app.)}$ που υπολογίστηκαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων α -D γλυκόζης

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα $K_{M(app.)}/[\alpha$ -D γλυκόζη], από το οποίο προσδιορίστηκε η σταθερά αναστολής στο σημείο τμήσης του x' (διάγραμμα 3B). Η τιμή της σταθεράς αναστολής υπολογίστηκε σε 1.63 ± 0.07 mM, τιμή παρόμοια με αυτήν που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (1.7 mM). Τέλος, κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα $(1/v)/(1/[G1P])$, το οποίο έδωσε γραμμές που τέμνονται στον άξονα y' (διάγραμμα 3A), κάτι το οποίο δηλώνει ότι η α -D

γλυκόζη δρα ως συναγωνιστικός αναστολέας ως προς την *mGPb*, κάτι το οποίο περιγράφεται στη βιβλιογραφία, μιας και η γλυκόζη προσδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.



Διάγραμμα 3: Α) Διάγραμμα $(1/v)/(1/[G1P])$ **Β)** Διάγραμμα $K_{M(\text{app.})}/[\alpha\text{-D γλυκόζη}]$

Συζήτηση

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι μία νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα. Αιτία αυτής της ασθένειας αποτελεί η αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένας έγκυρος φαρμακευτικός στόχος για την εύρεση θεραπείας του διαβήτη τύπου 2. Το ένζυμο καταλύει τη φωσφορόλυση του γλυκογόνου προς παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης (G1P), η οποία μετατρέπεται στο ήπαρ σε ελεύθερη γλυκόζη έτσι ώστε να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού, σε συνθήκες όπου δεν παρέχεται γλυκόζη από την διατροφή. Σε αυτήν την εργασία αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο υψηλής απόδοσης για την αξιολόγηση μικρών μορίων ως αναστολέων της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κονίκλους (gmGP). Η λειτουργία του πρωτοκόλλου επιβεβαιώθηκε με τον έλεγχο της ανασταλτικής επίδρασης της γλυκόζης. Η α-D-γλυκόζη είναι ο φυσιολογικός αναστολέας της GP με σταθερά αναστολής (K_i) 1.7 mM για την GPb. Με τη χρήση αυτού του πρωτοκόλλου η K_i υπολογίστηκε σε 1.63 ± 0.07 mM, τιμή παρόμοια με αυτήν της βιβλιογραφίας, και φάνηκε πως η γλυκόζη συναγωνίζεται το υπόστρωμα για την πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο. Η δημιουργία του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου προσφέρει το μεγάλο πλεονέκτημα ότι όλες οι αντιδράσεις για τον προσδιορισμό της K_i μπορούν να γίνονται ταυτόχρονα, κάτι το οποίο μειώνει το πειραματικό σφάλμα αλλά επιπλέον μειώνει σημαντικά τον χρόνο της πειραματικής διαδικασίας. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ο προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής μειώθηκε από 1 μέρα σε 1-4 ώρες. Αυτό το πρωτόκολλο υψηλής απόδοσης μας δίνει τη δυνατότητα να επιταχύνουμε τις διαδικασίες που χρειάζονται για τον χαρακτηρισμό της δράσης μικρών μορίων με σκοπό την εύρεση νέων και πιο ισχυρών αναστολέων της GP που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε κλινικές δοκιμές.

Βιβλιογραφία

- [1] Guyton, Arthur C. Human physiology and mechanisms of disease. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders
- [2] Marshall W, Bangert S. Clinical Chemistry. 6th ed. ELSEVIER LIMITED, 2008
- [3] Katzung B. Basic and Clinical Pharmacology. 9th ed The McGraw-Hill Companies, 2004
- [4] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.
- [5] Price N, Stevens L. Fundamentals of Enzymology: Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999
- [6] Diabetes, D. O. F., & American Diabetes Association. (2009). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. <https://doi.org/10.2337/dc09-S062>
- [7] Zois, C. E., & Harris, A. L. (2016). Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. Journal of Molecular Medicine, 94(2), 137–154. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1377-9>
- [8] Vénien-Bryan, C., Jonic, S., Skamnaki, V., Brown, N., Bischler, N., Oikonomakos, N. G., ... Johnson, L. N. (2009). The Structure of Phosphorylase Kinase Holoenzyme at 9.9 Å Resolution and Location of the Catalytic Subunit and the Substrate Glycogen Phosphorylase. Structure. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.013>
- [9] Hayes, J. M., Kantsadi, A. L., & Leonidas, D. D. (2014). Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: Potential treatment for type 2 diabetes. Phytochemistry Reviews. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9360-6>
- [10] Freeman, S., Bartlett, J. B., Convey, G., Hardern, I., Teague, J. L., Loxham, S. J. G., ... Charles, A. D. (2006). Sensitivity of glycogen phosphorylase isoforms to indole site inhibitors is markedly dependent on the activation state of the enzyme. British Journal of Pharmacology, 149(6), 775–785. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706925>
- [11] Oikonomakos, N. G., Zographos, S. E., Skamnaki, V. T., & Archontis, G. (2002). The 1.76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase b complexed with glucose, and CP320626, a potential antidiabetic drug. Bioorganic and Medicinal Chemistry. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00394-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00394-7)
- [12] Einav, T., Mazutis, L., & Phillips, R. (2016). Statistical Mechanics of Allosteric Enzymes. Journal of Physical Chemistry B. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b01911>
- [13] Villaverde, A. (2003). Allosteric enzymes as biosensors for molecular diagnosis. FEBS Letters, 554(1–2), 169–172. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01160-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01160-8)
- [14] Martin JL, Veluraja K, Ross K, Johnson LN, Fleet GW, Ramsden NG, et al. Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: the design of potential drugs for diabetes. Biochemistry 1991;30:10101-16.
- [15] Tsirkone VG, Tsoukala E, Lamprakis C, Manta S, Hayes JM, Skamnaki VT, et al. 1- (3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. Bioorg Med Chem 2010;18:3413-25.
- [16] Gel, P., Tips, E., & Guide, T. (2011). Protein Gel Electrophoresis Tips and Troubleshooting Guide. Electrophoresis. <https://doi.org/10.4137/GRSB.S39861>.TYPE

[17]Gallagher, S. R. (2012). One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. Current Protocols in Protein Science. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1001s68>

[18]Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

[19]Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998

[20]Fischer EH, Krebs, E. G. Muscle Phosphorylase-B. Methods in Enzymology 1962;5:36973.