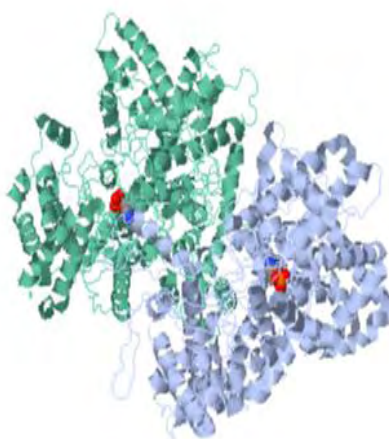




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**  
**ΑΠΟ ΕΝΑΝ ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ β-ΓΛΥΚΟΖΗΣ**



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΚΑΡΑΒΑΣΙΑΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2019**

**Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΕΝΑΝ  
ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ β-ΓΛΥΚΟΖΗΣ**

**THE INHIBITION OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE FROM A p-  
COUMAROYL GLUCOSE**

**Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΕΝΑΝ  
ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ β-ΓΛΥΚΟΖΗΣ**

**ΟΝΟΜΑ: ΚΑΡΑΒΑΣΙΛΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΕΩΝΙΔΑΣ**

**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:** ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ 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 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I Περίληψη.....	7
II Abstract.....	8
III Ευχαριστίες.....	9
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	10
1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1.....	10
1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.....	11
1.2 Ομοιόσταση της γλυκόζης.....	12
1.2.1 Ινσουλίνη- ανοχή στην ινσουλίνη.....	12
1.2.2 Γλυκαγόνη.....	14
1.2.3 Το γλυκογόνο και ο μεταβολισμός του.....	15
1.3 Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	19
1.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	20
1.4.1 Η συμμετοχή της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP).....	22
1.4.2 Η κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	22
1.4.2.1 Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14.....	23
1.4.2.2 Καταλυτικό κέντρο.....	24
1.4.2.3 Κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου.....	24
1.4.2.4 Κέντρο αναστολής.....	24
1.4.2.5 Αλλοστερικό κέντρο.....	26
1.4.2.6 Νέο αλλοστερικό κέντρο.....	27
1.4.2.7 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης.....	28
1.4.3 Η αλλοστερική μετάπτωση στην GP.....	29
1.4.4 Η GP ως στόχος αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων.....	30
1.5 Κρυσταλλογραφία.....	31
1.5.1 Η δομή του κρυστάλλου.....	31
1.5.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων.....	31
1.5.3 Η θεωρία περίθλασης ακτίνων X.....	32
1.5.4 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου.....	33
1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων.....	33
1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα.....	36
1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων.....	36
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
2.1 Αντιδραστήρια.....	40
2.2 Οργανολογία.....	41
2.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	41
2.4 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων.....	42

2.5	Κινητικές μελέτες έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP).....	46
2.5.1	Φωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου.....	46
2.5.2	Ενζυμικό διάλυμα.....	47
2.5.3	Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων.....	48
2.5.4	Ανάλυση κινητικών δεδομένων.....	50
2.6	Κρυσταλλογραφία.....	52
2.6.1	Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb.....	52
2.6.2	Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	52
2.6.3	Βελτιστοποίηση δομικού μοντέλου.....	53
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	54
3.1	Απομόνωση και καθαρισμός rmGPb.....	54
3.2	Κινητικές παράμετροι.....	55
3.3	Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής.....	55
3.4	Μελέτη κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	56
4	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	59

## I. Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια μεταβολική διαταραχή με σημαντικές επιπλοκές. Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί σήμερα μία από τις σημαντικότερες αιτίες θνησιμότητας ανά την υφήλιο. Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Η στρατηγική αντιμετώπισης της νόσου έχει ως στόχο αφενός τον μακροχρόνιο γλυκαιμικό έλεγχο του ασθενούς και αφετέρου τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Σε φυσιολογική κατάσταση τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος μεταβάλλονται σε μικρό βαθμό μέσα στα φυσιολογικά όρια (70-125 mg/dl). Ο γλυκαιμικός έλεγχος είναι αποτέλεσμα της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ απορρόφησης της γλυκόζης και μεταβολισμού της. Το ήπαρ κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση αυτήν καθώς τα ηπατοκύτταρα εκφράζουν τα ένζυμα των οποίων η δράση ρυθμίζεται από την τα επίπεδα της γλυκόζης. Για τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα τα ένζυμα, καθώς και υποδοχείς που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της γλυκόζης, χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για τη σύνθεση αναστολέων, μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού ενώσεων, επιφέροντας αντι-υπεργλυκαιμική δράση.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP, EC: 2.4.1.1) συμμετέχει στον καταβολισμό του γλυκογόνου και συγκεκριμένα καταλύει το πρώτο βήμα της αποικοδόμησης, προς παράγωγη 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η GP υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία: τη φωσφορυλιωμένη GP<sub>a</sub> (βρίσκεται στην R στεροδιαμόρφωση και έχει υψηλή δραστηριότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα) και την αποφωσφορυλιωμένη GP<sub>b</sub> (βρίσκεται στην T στεροδιαμόρφωση και έχει χαμηλή δραστηριότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα). Η ηπατική ισομορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων.

Σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση της GP<sub>b</sub> από κονίκλους (tmGP<sub>b</sub>) και έλαβαν χώρα κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής ( $K_i$ ) της π-κουμαρικής γλυκόζης, μίας φυσικής ένωσης, ως προς GP. Η τιμή της  $K_i$  που προσδιορίστηκε ήταν  $33.1 \pm 2.4 \mu\text{M}$ . Στην συνέχεια αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι της tmGP<sub>b</sub> για τη διεξαγωγή κρυσταλλογραφικών μελετών. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στην ανάδειξη του τρόπου πρόσδεσης του αναστολέα στο ένζυμο καθώς και στην περαιτέρω ανάλυση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου. Τα αποτελέσματα αυτά συμβάλουν στην καλύτερη κατανόηση της GP ώστε μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων να συντεθούν νέες ενώσεις που θα έχουν χαμηλότερες τιμές σταθερών αναστολής με αποτέλεσμα να επιφέρουν πιο ισχυρή αναστολή του ενζύμου.

## II Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder that can lead to significant complications, and today, it is one of the most important causes of mortality worldwide. Diabetes mellitus is characterized by an increase in blood glucose concentration (hyperglycaemia) and a glucose metabolism disorder, either as a result of decreased insulin secretion or reduced insulin sensitivity of body cells. The control strategy aims at the patients' long-term glycemic control and the maintenance of blood glucose levels in physiological levels. Glycemic control is the result of a dynamic balance between glucose uptake and metabolism. The liver plays a central role in this regulation as hepatocytes express enzymes whose activity is regulated by glucose levels. To maintain normal glucose levels, enzymes as well as receptors involved in glucose metabolism are used as molecular targets for the structure-driven synthesis of inhibitors for anti-hyperglycemic action.

Glycogen phosphorylase (GP, EC: 2.4.1.1) is involved in glycogen catabolism by catalyzing the first step of the glycogen degradation to glucose 1-phosphate. GP is present in two interchangeable forms that exist in equilibrium: the phosphorylated form, GP<sub>a</sub> (R state; active; high affinity for substrate) and the unphosphorylated form, GP<sub>b</sub> (T state; inactive; low affinity for substrate). The hepatic isoform of glycogen phosphorylase is one of the most important molecular targets for the design of new anti-hyperglycemic drugs.

In the presented Thesis, purification of GP<sub>b</sub> from rabbit muscles (rmGP<sub>b</sub>) was performed and kinetic studies were conducted to determine the inhibition constant ( $K_i$ ) of p-coumaric glucose, a natural compound. The  $K_i$  was determined to  $33.1 \pm 2.4 \mu\text{M}$ . Crystals of rmGP<sub>b</sub> were then grown to perform crystallographic studies. Structural analysis results revealed the binding site of the inhibitor to the enzyme as well as the interactions it forms within active site. These results contribute to a better understanding of GPs that through the structure-driven drug design, new compounds with increased potency will be designed.



### III Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία διεξήχθη στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Δημήτρη Λεωνίδα. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία. Η καθοδήγηση και η βοήθεια του υπήρξαν καθοριστικές και πολύτιμες. Επίσης, είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική και Δρ. Μπαλατσό Νικόλαο για την συνεργασία και την ανάγνωση της διπλωματικής εργασίας μου. Οφείλω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη καίρια βοήθεια τους και τις υποδείξεις τους. Επίσης αποδίδω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή Somsák László καθώς η χημική ένωση που μελετήθηκε συντέθηκε στο εργαστήριο του, στο Πανεπιστήμιο του Debrecen της Ουγγαρίας.

Αποτίνω ιδιαίτερες ευχαριστίες στον υποψήφιο διδάκτορα Κυριάκη Ευθύμιο και τον Δρ. Στραβοδήμο Γεώργιο για την ενθάρρυνση και την απεριόριστη βοήθεια τους, καθώς επίσης και για την υπομονή και τη διάθεσή τους όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την ηθική υποστήριξη και την πολύτιμη συμβολή τους όλα αυτά τα χρόνια.

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί μια από τις πιο συχνές μεταβολικές διαταραχές στον κόσμο. Η αστικοποίηση οδήγησε σε σημαντικές αλλαγές στον τρόπο και τους ρυθμούς ζωής, ιδίως στις αναπτυσσόμενες χώρες, γεγονός που εκτιμάται ότι συνδέεται με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης νόσων όπως ο Σακχαρώδης Διαβήτης. Τα τελευταία χρόνια γίνονται μελέτες σχετικά με τον πληθυσμό που αναμένεται να νοσήσει από Σακχαρώδη Διαβήτη. Εξαιρετικά ανησυχητικό όμως διαφαίνεται το γεγονός πως παρότι οι προβλέψεις αυξάνονται, ο αριθμός των ανθρώπων που νοσεί τις ξεπερνά, εκτιμάται μάλιστα ότι ο αριθμός των ενηλίκων που νοσεί έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Το 2015 έπασχαν από Σακχαρώδη Διαβήτη 415 εκατομμύρια ενήλικοι και ο αριθμός αναμένεται να ανέλθει στα 642 εκατομμύρια έως το 2040 σύμφωνα με την Διεθνή Ομοσπονδία για τον διαβήτη (International Diabetes Federation) [1].

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) είναι μια συστημική μεταβολική ανωμαλία η οποία εν γένη χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία. Τα αίτια εκδήλωσης της νόσου είναι είτε δυσλειτουργία ή/και απώλεια των β-παγκρεατικών κυττάρων, από τα οποία παράγεται η ορμόνη ινσουλίνη, είτε η ελαττωμένη απόκριση του ιστού στην ινσουλίνη.

Τα κύρια συμπτώματα του σακχαρώδους διαβήτη είναι κατά κύριο λόγο η υπεργλυκαιμία, η πολυδιψία, η πολουρία, η απώλεια βάρους και σπανιότερα η πολυφαγία και η θολή όραση. Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια ασθένεια με σοβαρότατες μακροχρόνιες επιπλοκές (καρδιαγγειακά προβλήματα, νεφροπάθεια, ανωμαλίες στον μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και σεξουαλική δυσλειτουργία) καθώς επίσης και αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής αθηροσκλήρωσης και κετοξέωσης. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία, η έγκαιρη διάγνωση, η ευαισθητοποίηση γύρω από την νόσο αλλά και η αντιμετώπιση της.

Ο σακχαρώδης διαβήτης διακρίνεται σε δύο κύριες κατηγορίες, τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 και τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, ενώ διακρίνονται και κάποιες άλλες πιο ειδικές κατηγορίες διαβήτη, όπως είναι η εκ γενετής απώλεια των β-παγκρεατικών κυττάρων, ο επαγόμενος από φάρμακα και χημικά, ο διαβήτης της κύησης, και ο σχετιζόμενος με γενετικές ανωμαλίες στην γλυκόζη [2].

### 1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1

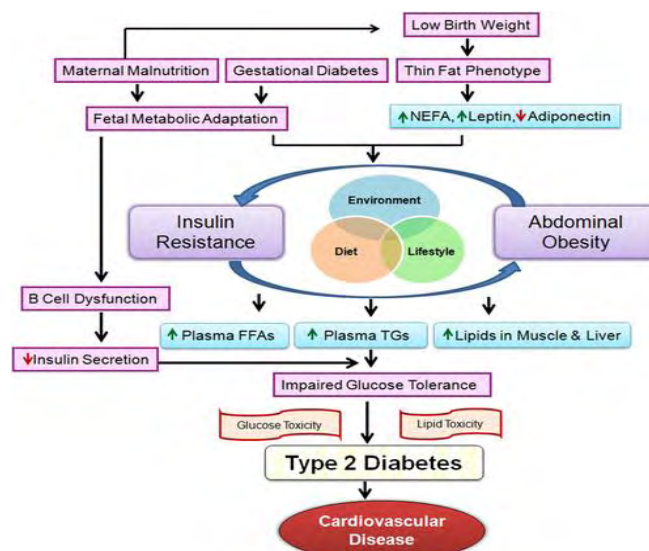
Ο ΣΔ τύπου 1 χαρακτηρίζεται από αυτοάνοση καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων, από τα οποία παράγεται η ορμόνη ινσουλίνη. Ο ρυθμός καταστροφής των κυττάρων δεν είναι σταθερός ανάμεσα στους ασθενείς, όπου καταλήγουν τελικά σε χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης για την επιβίωσή τους. Παλαιότερα θεωρούνταν ότι αποτελεί μια διαταραχή που εκδηλώνονταν σε παιδιά και εφήβους αλλά τις τελευταίες δεκαετίες η άποψη αυτήν εγκαταλείφθηκε, αναιρώντας την πεποίθηση που ήθελε την ηλικία να αποτελεί περιοριστικό παράγοντα της νόσου. Ο ΣΔ τύπου 1 σχετίζεται άμεσα

με περιβαλλοντικούς παράγοντες που δεν είναι ακόμη καθορισμένοι και τα αίτια εκδήλωσης της νόσου μπορεί να ποικίλουν ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα.

Φυσιολογικά η χαμηλή συγκέντρωση της ινσουλίνης διεγείρει την απελευθέρωση άλλων ορμονών και κυρίως της γλυκόζης, της οποίας μάλιστα τα επίπεδα στο ήπαρ αυξάνονται σημαντικά. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την μειωμένη χρήση της περιφερειακά αποτελεί την κύρια παθολογική διαταραχή για την διαβητική κετοξέωση[3].

### 1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Ο διαβήτης τύπου 2 ή αλλιώς μη ινσουλινοεξαρτώμενος, χαρακτηρίζεται από ανοχή των ιστών-στόχων στις επιδράσεις της ινσουλίνης και συνήθως σχετίζεται με ανωμαλίες στην έκκριση της ινσουλίνης [4]. Οι μεταβολικές διαταραχές στον ΣΔ 2 περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων ανάπτυξη αθηρογενετικής δυσλιπιδαιμίας, αυξημένα επίπεδα ελεύθερων λιπαρών οξέων και διαταραχή της ενδοθηλιακής λειτουργίας.



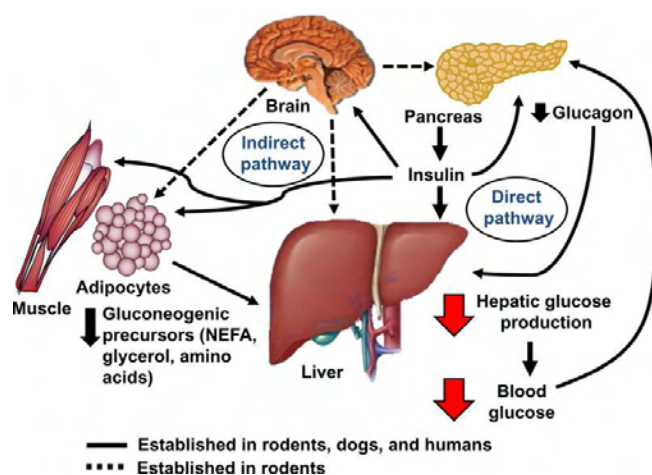
**Εικόνα 1.1:** Παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του ΣΔ 2 και καρδιαγγειακών νόσων. Η ανάπτυξη και η εξέλιξη της καρδιαγγειακής νόσου συνεπάγεται σύνθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του περιβάλλοντος και του τρόπου ζωής ενός ανθρώπου συμπεριλαμβάνοντας στοιχεία της εμβρυϊκής ζωής και των πρώτων σταδίων ανάπτυξης των ατόμων. Κατά την γέννηση διάφοροι γενετικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν συγκεκριμένα τον φαινότυπο του ατόμου ώστε ενώ εμφανίζει φυσιολογικό δείκτη μάζας σώματος, να έχει χαμηλή μυϊκή μάζα και υψηλή περιεκτικότητα σε σωματικό λίπος. Ο διαβήτης της κύησης προωθεί τη μεταφορά μεταβολικών δυσλειτουργιών στο έμβryo. Η ανθυγιεινή διατροφή, ο τρόπος ζωής και το άγχος συμβάλλουν στην παχυσαρκία και στην αντίσταση στην ινσουλίνη οδηγώντας τελικά στην εμφάνιση μεταβολικών συνδρόμων όπως η υπεργλυκαιμία και η συσσώρευση ενδιάμεσων λιπιδίων σε μη λιπώδη ιστό, οδηγώντας σε κυτταρική δυσλειτουργία [5].

Η αδυναμία των β-παγκρεατικών κυττάρων να παράγουν και να απελευθερώσουν την απαραίτητη ινσουλίνη αποτελεί το πλέον κρίσιμο σημαντικό στοιχείο για την ανάπτυξη του ΣΔ 2. Τα β-κύτταρα των διαβητικών ασθενών εμφανίζουν μείωση του αριθμού τους, που οφείλεται σε σημαντική αύξηση της απόπτωσής τους, γεγονός που αντανακλά την αδυναμία τους να παράγουν την απαραίτητη ινσουλίνη [5]. Η δυσλειτουργία των β-κυττάρων οδηγεί στην έκκριση ειδικών δεικτών όπως η προϊνσουλίνη η οποία μαζί με τα ινίδια αμυλοειδούς καταδεικνύουν την προοδευτική καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων.

Η μετφορμίνη χρησιμοποιείται ευρέως για τη μείωση της απελευθέρωσης της γλυκόζης από το ήπαρ, πράγμα που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ανταπόκρισης του σώματος στην ινσουλίνη, καθώς και την μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο πλάσμα [6].

## 1.2 Ομοιόσταση της γλυκόζης

Το ήπαρ κατέχει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης στο αίμα. Μετά από ένα γεύμα, τα θρεπτικά συστατικά απορροφώνται μέσω της γαστρεντερικής οδού στην πυλαία φλέβα και συνεπώς περνούν από το ήπαρ προτού εισέλθουν στην συστηματική κυκλοφορία. Το ήπαρ αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην διατήρηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, ώστε να περιορίζεται σε ένα φυσιολογικό εύρος, καθώς αποθηκεύει ένα μεγάλο κλάσμα της απορροφούμενης γλυκόζης με την μορφή γλυκογόνου, ενώ συγχρόνως μειώνει την απελευθέρωση της πίσω, στην κυκλοφορία. Σε καταστάσεις νηστείας όπου και απαιτείται αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης για αποφυγή της υπογλυκαιμίας μειώνεται η έκκριση της ινσουλίνης ενώ η έκκριση της γλυκόζης τείνει να αυξάνεται. Η γλυκαγόνη δρα στα ηπατοκύτταρα για την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης τόσο μέσω της γλυκογονόλυσης (κινητοποιώντας το απόθεμα του γλυκογόνου) όσο και μέσω της γλυκονεογένεσης, ενώ η ινσουλίνη γενικά ανταγωνίζεται τις δράσεις της γλυκαγόνης [7]. Στην **εικόνα 1.2** παρουσιάζονται οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η ινσουλίνη ασκεί έλεγχο στην παραγωγή της γλυκόζης από το ήπαρ.



**Εικόνα 1.2:** Μηχανισμοί άμεσων και έμμεσων επιδράσεων στον έλεγχο της παραγωγής ηπατικής γλυκόζης από την ινσουλίνη. Η ινσουλίνη αναστέλλει την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ είτε επιδρώντας άμεσα σε αυτό (μέσω δέσμευσής της στους υποδοχείς της στο ήπαρ) είτε έμμεσα από απομακρυσμένες θέσεις. Οι έμμεσοι μηχανισμοί με τους οποίους η ινσουλίνη ασκεί τις επιδράσεις της στο ήπαρ περιλαμβάνουν: καταστολή της έκκρισης γλυκογόνου από τα  $\alpha$ -παγκρεατικά κύτταρα, την αναστολή τόσο της λιπόλυσης στα λιποκύτταρα όσο και της πρωτεόλυσης στους σκελετικούς μύες μειώνοντας εν τέλει τη διαθεσιμότητα των κυκλοφορούντων γλυκερονικών προδρόμων στο ήπαρ. Στον εγκέφαλο η δράση της ινσουλίνης έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλει την έκκριση του παγκρεατικού γλυκογόνου και τη λιπόλυση, γεγονός που μπορεί να ενισχύσει τα περιφερειακά αποτελέσματα της ινσουλίνης σε αυτούς τους ιστούς [7].

### 1.2.1 Ινσουλίνη-Ανοχή στην ινσουλίνη

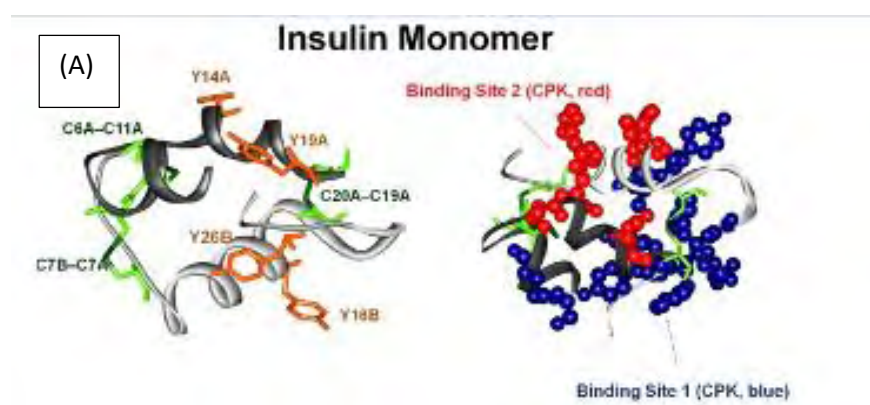
Η ινσουλίνη είναι μια μικρή πεπτιδική ορμόνη η οποία εκκρίνεται από τα  $\beta$ -κύτταρα του παγκρέατος. Συντίθεται αρχικά ως ένα ανενεργό μόριο, την προϊνσουλίνη, και

αφού αφαιρεθεί ένα πεπτίδιο με πρωτεολυτική διάσπαση προκύπτει τελικά η ινσουλίνη [8]. Η ινσουλίνη εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η διαφοροποίηση των κυττάρων, η μεμβρανική μεταφορά ουσιών και ο μεταβολισμός [9].

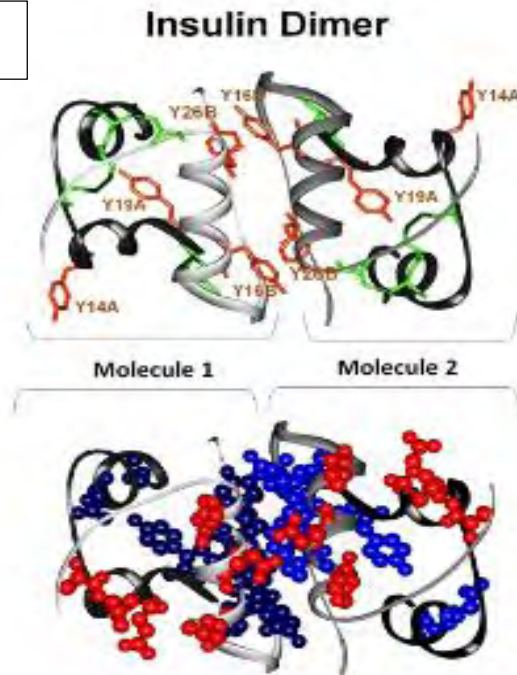
Η ινσουλίνη αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς της οι οποίοι εντοπίζονται στα μυϊκά κύτταρα, στο ήπαρ και στον λιπώδη ιστό και διεγείρει την πρόσληψη της γλυκόζης, την οξείδωση της γλυκόζης, την γλυκόλυση, την λιπογένεση, την πρωτεϊνοσύνθεση ενώ αναστέλλει την γλυκονεογένεση, την λιπόλυση, την οξείδωση των λιπαρών οξέων και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών [10].

Σε όλα σχεδόν τα είδη, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, το μόριο της ινσουλίνης αποτελείται από δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, με μοριακό βάρος 6.000 Da, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς.

Αν και η ινσουλίνη δεσμεύεται στον υποδοχέα της ως μονομερές εναλλακτικά δύναται να σχηματίσει και άλλες δομές, λόγω χάριν διμερή, τετραμερή ή εξαμερή, ακόμη και συσσωματώματα [11]. Η μορφή της εξαρτάται από την συγκέντρωσή της, το pH και την σύνθεση του διαλύτη καθώς και απ' την συγκέντρωση των μεταλλικών ιόντων, η οποία μπορεί να επηρεάσει το φορτίο και άρα την διαλυτότητα του μορίου της ινσουλίνης. Σε φυσιολογικό pH μονομερή μόρια της ανθρώπινης ινσουλίνης ανιχνεύονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ( $1 \times 10^{-9}$  M). Στο αίμα, φυσιολογικά, η συγκέντρωση της ινσουλίνης είναι μικρότερη από  $1 \times 10^{-9}$  M οπότε το μόριο της ινσουλίνης εντοπίζεται και εξασκεί τις βιολογικές του επιδράσεις ως μονομερές. Η συσσωμάτωση της ινσουλίνης αρχίζει με αύξηση της συγκέντρωσής της [8].



(B)



**Εικόνα 1.3:** Μονομερές (Α) και διμερές (Β) μόριο ινσουλίνης, όπως απομονώθηκαν από εξαμερές μόριο ινσουλίνης χοίρου, κρυσταλλικό σύμπλοκο με δύο ιόντα ψευδαργύρου (4INS.pdb), 3D απεικόνιση. Οι α- αλυσίδες της ινσουλίνης παρουσιάζονται με γκρι χρώμα και οι β- αλυσίδες παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα. (Α) Τα 4 αμινοξικά κατάλοιπα Tyr (Y, πορτοκαλί) και τα 6 αμινοξικά κατάλοιπα Cys (C, πράσινο) στο μόριο της ινσουλίνης εμπλέκονται σε 3 δισουλφιδικές γέφυρες (SS) οι οποίες απεικονίζονται με πορτοκαλί και πράσινο. Οι δύο θέσεις πρόσδεσης της ινσουλίνης καταδεικνύονται με τα βέλη και διακρίνονται μεταξύ τους σε θέση πρόσδεσης 1 (μπλε χρώμα) και θέση πρόσδεσης 2 (κόκκινο χρώμα) [8].

### 1.2.2 Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη, αποτελούμενη από 29 αμινοξέα, η οποία γενικά αντισταθμίζει την δράση της ινσουλίνης, διεγείροντας την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ, αυξάνοντας μ' αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα [12].

Όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα μειώνονται σημαντικά (υπογλυκαιμία), τα α-παγκρεατικά κύτταρα απελευθερώνουν γλυκαγόνη. Η γλυκαγόνη ασκεί τις επιδράσεις της στο ήπαρ όπου, κινητοποιεί τα αποθέματα του γλυκογόνου, προάγει την γλυκογονόλυση, αναστέλλει το σχηματισμό γλυκογόνου αυξάνοντας έτσι την συγκέντρωση της γλυκόζης στην κυκλοφορία [13].

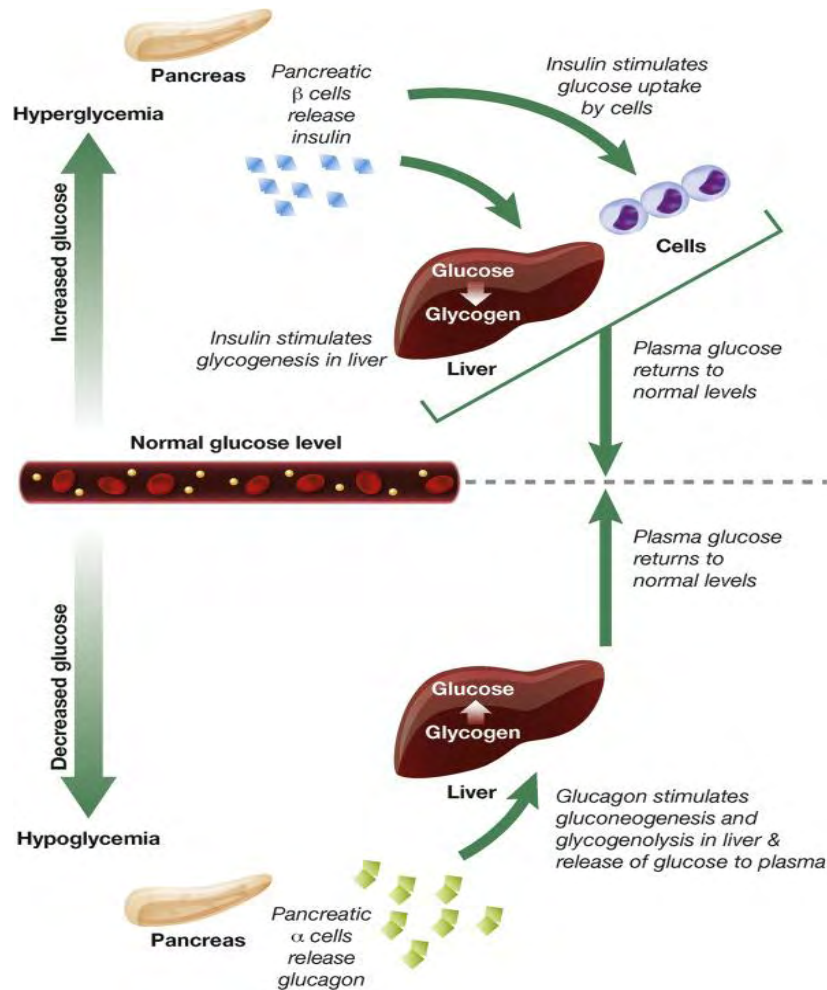
Τα παραπάνω γεγονότα είναι αποτέλεσμα των παρακάτω αλυσιδωτών αντιδράσεων:

- ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης στην μεμβράνη των ηπατικών κυττάρων
- σχηματισμός κυκλικής AMP (cAMP)
- ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA)



- ο ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) η οποία εν συνεχεία προάγει τη διάσπαση του γλυκογόνου [14].

Συνολικά, η ομοιόσταση της γλυκόζης και η διατήρησή της σε ένα φυσιολογικό εύρος, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ισορροπία στην έκκριση γλυκαγόνης και ινσουλίνης, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.4**.



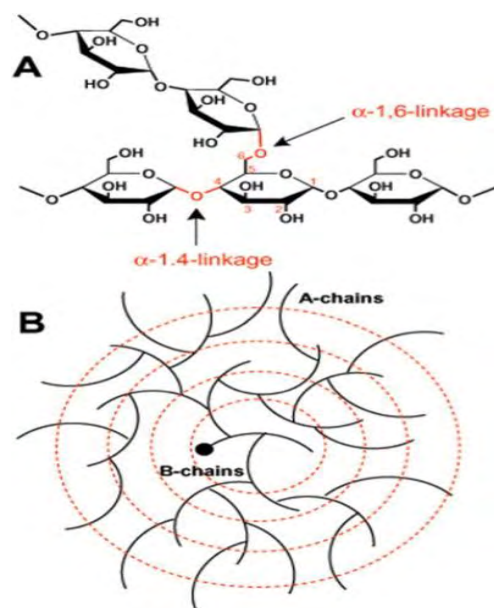
**Εικόνα 1.4:** Η ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα γίνεται από την γλυκαγόνη και την ινσουλίνη. Σε υγιή άτομα η γλυκαγόνη και η ινσουλίνη συνεργάζονται για να διατηρήσουν την γλυκόζη του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Κατά τη διάρκεια της υπεργλυκαιμίας, τα παγκρεατικά β- κύτταρα απελευθερώνουν ινσουλίνη, η οποία διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης από κύτταρα που καταναλώνουν ενέργεια, και τον σχηματισμό γλυκογόνου στο ήπαρ. Κατά τη διάρκεια της υπογλυκαιμίας, τα παγκρεατικά α- κύτταρα απελευθερώνουν γλυκαγόνη, η οποία διεγείρει τη γλυκονογένεση και τη γλυκογονόλυση στο ήπαρ και άρα την απελευθέρωση γλυκόζης στο πλάσμα [13].

### 1.2.3 Το γλυκογόνο και ο μεταβολισμός του

Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης και αποτελεί μέσο αποθήκευσης της γλυκόζης στα κύτταρα, για χρήση του σε περιόδους νηστείας όταν η προσλαμβανόμενη γλυκόζη δεν επαρκεί. Το γλυκογόνο υπάρχει σε πολλούς οργανισμούς, από βακτήρια και αρχαία μέχρι και τον άνθρωπο. Τα φυτά συνθέτουν επίσης συναφή πολυμερή γλυκόζης με την μορφή του αμύλου, συνεπώς ο πολυμερισμός της γλυκόζης φαίνεται να είναι ένας καθολικός μηχανισμός αποθήκευσης της ενέργειας στην φύση.

Το γλυκογόνο πολυμερίζεται από  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των μονομερών της γλυκόζης και ακολούθως εισάγονται διακλαδώσεις από  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το γλυκογόνο που απομονώνεται από βιολογικές πηγές αφορά σε έναν πληθυσμό μορίων διαφορετικών μεγεθών ενώ ταυτόχρονα τα σημεία όπου εισάγονται διακλαδώσεις δεν βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις, με αποτέλεσμα στα μόρια του γλυκογόνου με ίσες μάζες να μην μπορούν να αποδοθούν ταυτόσημες χημικές ιδιότητες. Ως εκ τούτου η τρισδιάστατη δομή του γλυκογόνου δεν μπορεί να αποδοθεί από τις κλασσικές προσεγγίσεις της δομικής βιολογίας.

Ένα μοντέλο για την δομή του γλυκογόνου κατηγοριοποιεί τις αλυσίδες ως εσωτερικές B, οι οποίες περιέχουν κατά κύριο λόγο δύο διακλαδώσεις, και ως εξωτερικές A, οι οποίες είναι μη διακλαδισμένες.



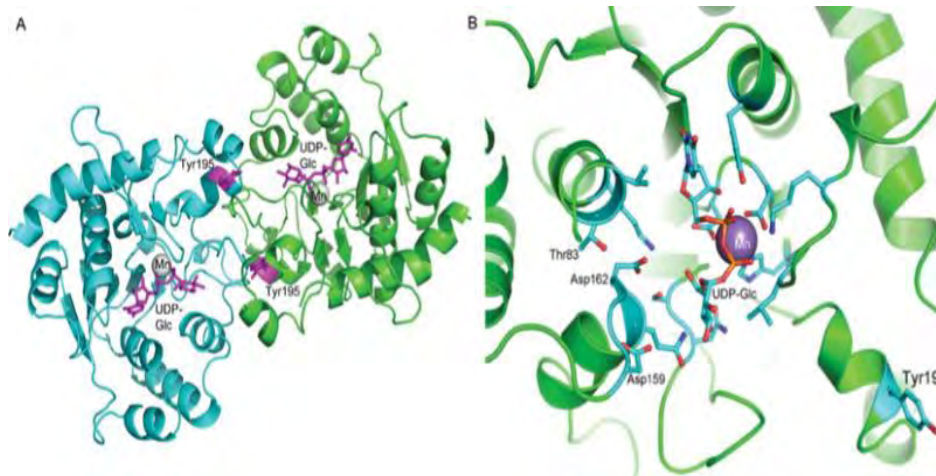
**Εικόνα 1.5:** (A) Ο πολυμερισμός του γλυκογόνου. Μεταξύ των μονομερών της γλυκόζης ο πολυμερισμός παρέχεται από  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ στο σημείο της διακλάδωσης ο πολυμερισμός παρέχεται από  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. (B) Το μοντέλο της δομής του γλυκογόνου. Στην εικόνα φαίνεται η θέση καθώς και τα χαρακτηριστικά των αλυσίδων του μορίου [15].

Στα θηλαστικά η γλυκόζη εναποτίθενται κυρίως στους σκελετικούς μύες και στο συκώτι. Η άμεση οδός σύνθεσης του γλυκογόνου περιλαμβάνει αρχικά την μεταφορά της γλυκόζης εντός των κυττάρων από έναν ή περισσότερους μεταφορείς της γλυκόζης (GLUTs). Ακολούθως το ένζυμο εξοκινάση μετατρέπει την γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη και στην συνέχεια το ένζυμο φωσφογλυκομουτάση μετατρέπει την 6-φωσφορική γλυκόζη σε 1-φωσφορική γλυκόζη. Έπειτα δρα το ένζυμο πυροφωσφορυλάση της UDP γλυκόζης όπου μετατρέπει την 1-φωσφορική γλυκόζη σε 5'ουριδινοδιφωσφορική UDP γλυκόζη, μετατρέποντας ταυτόχρονα το UTP σε UDP.

Στο σημείο αυτό η γλυκογονίνη I, της οποίας η δομή παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1.6**, σχηματίζει μια μικρή εναρκτήρια αλυσίδα πολυμερούς γλυκόζης. Η γλυκογονίνη μέσω του μεγάλου καρβοξυτελικού άκρου της αλληλεπιδρά άμεσα με την συνθάση του γλυκογόνου, η οποία είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό του μεγαλύτερου μέρους του

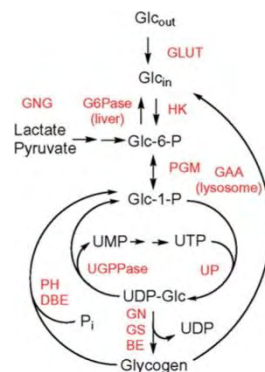


μορίου του γλυκογόνου, αφού είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των α-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών, χρησιμοποιώντας την UDP γλυκόζη ως δότη γλυκοζυλίου.



**Εικόνα 1.6:** (A) Το διμερές της γλυκογονίνης. Το ενεργό κέντρο υποδεικνύονται από το δεσμευμένο υπόστρωμά της, την UDP-γλυκόζη. Επίσης υποδεικνύεται και η Tyr195 κοντά στην επιφάνεια διασύνδεσης των δύο υπομονάδων. (B) Το ενεργό κέντρο της γλυκογονίνης. Καταδεικνύεται και η θέση του ιόντος μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ) που είναι απαραίτητο για την καταλυτική διεργασία (μωβ σφαίρα) [15].

Η συνθάση του γλυκογόνου ρυθμίζεται αρνητικά με ομοιοπολική φωσφορυλίωση, ενώ υπόκεινται σε αλλοστερική ενεργοποίηση από την 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία μάλιστα μπορεί να άρει την απενεργοποίηση λόγω φωσφορυλίωσης.

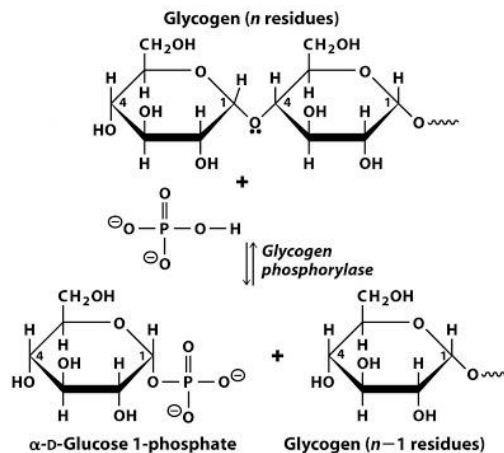


**Εικόνα 1.7:** Πορεία σύνθεσης του γλυκογόνου.  $Glc_{out}$ , εξωκυτταρική γλυκόζη.  $Glc_{in}$ , ενδοκυτταρική γλυκόζη. HK, εξοκινάση. G6Pase, γλυκόζη-6-φωσφατάση. PGM, φωσφογλυκομουτάση. UP, πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης. GN, γλυκογενίνη; GS, συνθάση γλυκογόνου. BE, ένζυμο διακλάδωσης. PH, ένζυμο αποδιακλάδωσης. DBE, ένζυμο αποδιακλάδωσης. GAA, λυσοσωμική α-γλυκοσιδάση. GNG, γλυκονεογένεση [15].

Κατά την αντίστροφη πορεία, δηλαδή την πορεία αποικοδόμησης του γλυκογόνου και του σχηματισμού της γλυκόζης, έχουμε δράση του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου και του ενζύμου αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου που οδηγούν στην παραγωγή της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Ακολούθως η φωσφογλυκομουτάση μετατρέπει, αντίστροφα αυτήν την φορά, την 1-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία δύναται είτε να από-φωσφορυλιωθεί και να εξέλθει του κυττάρου ως ελεύθερη γλυκόζη (μια διαδικασία που συνοδεύεται από απελευθέρωση ανόργανου φωσφόρου), είτε να εισέλθει στην γλυκολυτική πορεία [15].

## Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP)

Η Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) καταλύει τη διάσπαση των  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικών δεσμών μεταξύ των μονομερών του γλυκογόνου οδηγώντας τελικά σε παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης, η οποία εισέρχεται στην γλυκολυτική πορεία για να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Η GP καταλύει την φωσφορόλυση των  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικών δεσμών, κινούμενη από τα μη αναγωγικά άκρα της αλυσίδας του γλυκογόνου, μέχρι και το τέταρτο κατάλοιπο από το σημείο της διακλάδωσης.



**Εικόνα 1.8:** Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου από το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η φωσφορολυτική διάσπαση του μορίου από την GP οδηγεί τελικά στην παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης και του μορίου του γλυκογόνου με ένα λιγότερο κατάλοιπο γλυκόζης.

Στην ολοκληρωτική διάσπαση του γλυκογόνου συμμετέχει και το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου καθώς και άλλα ένζυμα. Η διαδικασία της φωσφορόλυσης πραγματοποιείται με την βοήθεια του συνενζύμου φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) [16].

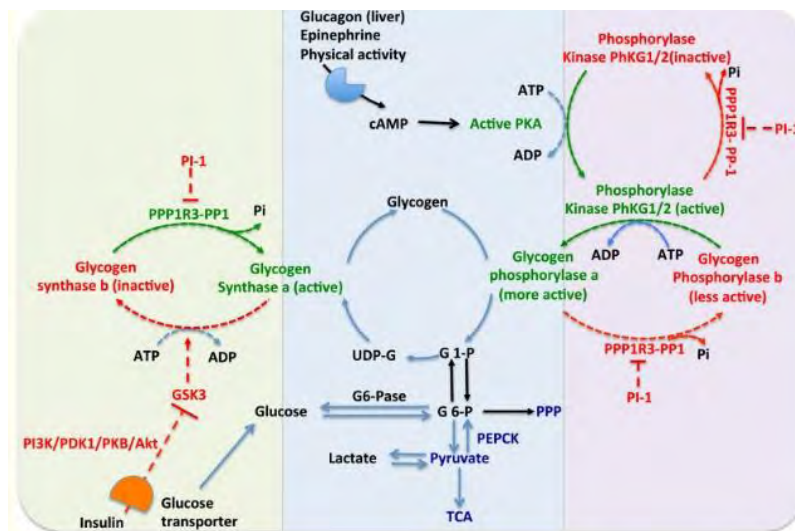
## Ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου (GDE)

Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές, εντούτοις η GP αδυνατεί να επιτύχει την πλήρη αποικοδόμηση του καθότι όπως αναφέρθηκε σταματά την διάσπαση των  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικών δεσμών όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο της διακλάδωσης. Η εν λόγω αντίδραση, στον άνθρωπο, καταλύεται από το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου (GDE). Η λειτουργική σημασία του GDE διαφαίνεται από το γεγονός ότι οι ανεπάρκεια του ενζύμου σχετίζεται με την ασθένεια αποθήκευσης του γλυκογόνου τύπου II. Το GDE διαθέτει δραστηριότητα μεταφοράς και  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτάσης. Με την δράση της μεταφοράς πραγματοποιεί την μετακίνηση τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια διακλάδωση σε ένα γειτονικό μη αναγωγικό άκρο, σχηματίζοντας έναν  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ τους. Μέσω αυτής της μεταφοράς, στο σημείο της διακλάδωσης υπάρχει ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικό δεσμό. Με την δράση της  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτάσης το GDE υδρολύει τον  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικό δεσμό

απελευθερώνοντας ένα μόριο γλυκόζης το οποίο φωσφορυλιώνεται από το ένζυμο εξοκινάση [18].

### Ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου (GBE)

Το ένζυμο συνθάση του γλυκογόνου δεν αρκεί για να γίνει το γλυκογόνο ένα διακλαδισμένο πολυμερές, καθότι καταλύει την σύνθεση των α-1,4 γλυκοζιτικών δεσμών. Ο α-1,6 γλυκοζιτικός δεσμός παρέχεται από το ένζυμο διακλάδωσης του γλυκογόνου (GBE). Το GBE καταλύει την μεταφορά μια αλυσίδας γλυκοζιλίου (6-8 κατάλοιπα) στο γλυκογόνο, εισάγοντας με αυτόν τον τρόπο τις διακλαδώσεις του μορίου του γλυκογόνου. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό προκαλούν την ασθένεια Andersen. Η συγγενής ανεπάρκεια του ενζύμου διακλάδωσης, είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή, που οδηγεί σε ενδοκυτταροπλασματική συσσώρευση ασυνήθιστα διακλαδισμένου γλυκογόνου, σε πολλούς ιστούς (ήπαρ, καρδιά, σκελετικούς μύες) [19].

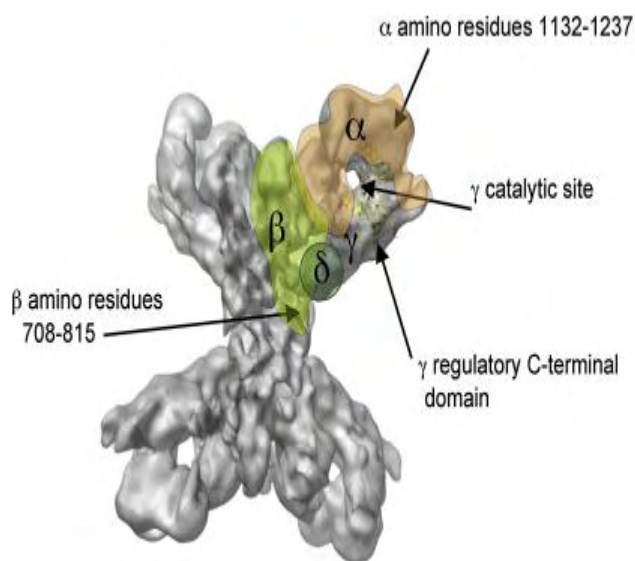


**Εικόνα 1.9:** Ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου από τα ένζυμα: συνθάση του γλυκογόνου και φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Η PKA φωσφορυλιώνει και μετατρέπει σε ενεργή μορφή την κινάση της φωσφορυλάσης (PhK). Επίσης, η PKA μετατρέπει τη δραστήρια μορφή της συνθάσης του γλυκογόνου α (GSa) σε μια ανενεργή μορφή συνθάσης του γλυκογόνου b (GSb). Η πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) από-φωσφορυλιώνει την GPα και και σχηματίζει την λιγότερο ενεργή GPb. Η GPα καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου σε G1P και αναστέλλει επίσης την PP1 η οποία με τη σειρά της μετατρέπει την αδρανή συνθάση του γλυκογόνου (GSb) στην ενεργή συνθάση του γλυκογόνου α (GSa). Στην εικόνα τα ένζυμα καθώς και τα βέλη με πράσινο χρώμα αντιπροσωπεύουν την ενεργοποίηση, ενώ με το κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύουν την απενεργοποίηση [20].

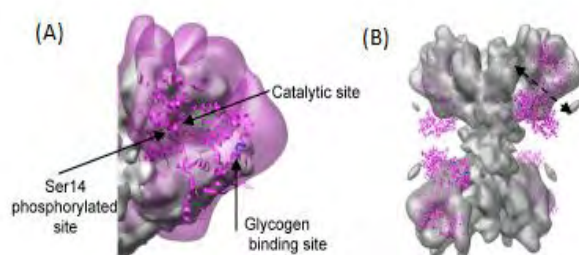
### 1.3 Η Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Phk)

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) είναι ένα βασικό ένζυμο που συμμετέχει στην ρύθμιση της γλυκογονόλυσης. Η PhK ανταποκρίνεται σε ποικίλα ερεθίσματα προκειμένου να προάγει τον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Συγκεκριμένα η PhK φωσφορυλιώνει ένα και μόνο αμινοξύ- την Ser14 της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και μ' αυτόν τον τρόπο οδηγεί σε μετατροπή της GPb, που είναι ανενεργή, σε ενεργή μορφή GPα.

Η PhK είναι μια απ' τις μεγαλύτερες και πολύπλοκες πρωτεϊνικές κινάσες. Αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες με στοιχειομετρία (αβγδ)<sub>4</sub> και μοριακό βάρος  $1.3 \times 10^6$  Da. Οι α (138 KDa) και β (125 KDa) υπομονάδες είναι ρυθμιστικές, και η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση τους από την PKA, ως απόκριση σε ορμονικά ερεθίσματα, μπορεί να οδηγήσει ενεργοποίηση της PhK. Επιπροσθέτως η απελευθέρωση ασβεστίου, που προηγείται της συστολής των μυών, αποτελεί έναν ακόμη τρόπο ενεργοποίησης της PhK, καθ' ότι η δ υπομονάδα (16.7 KDa) είναι η ασβεστιοτροποποιητίνη, ένας αισθητήρας ασβεστίου. Η γ υπομονάδα (44.7 KDa) είναι καταλυτική και είναι υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση της GP στην Ser14 [21].



**Εικόνα 1.10:** Σχηματική απεικόνιση της PhK όπου φαίνονται και οι υπομονάδες (α,β,γ και δ) του ενζύμου από μελέτες κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της PhK [21].



**Εικόνα 1.11:** (A) Σχηματική απεικόνιση της PhK από μελέτες κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της. Με γκρι χρώμα απεικονίζεται η PhK συνδεδεμένη με το υπόστρωμά της, την GPb, και με διάφανο μωβ χρώμα απεικονίζεται η PhK. (B) Πιθανή θέση των περιοχών όπου δεσμεύονται τα διμερή της GPb στην PhK [21].

#### 1.4 Η Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Ο έλεγχος των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα κρίνεται αναγκαίος με σκοπό την πρόληψη ή/και την αντιμετώπιση των επιπλοκών του ΣΔ τύπου II καθιστώντας την GP ελκυστικό μοριακό στόχο των προγραμμάτων ανακάλυψης αντιδιαβητικών φαρμάκων [22]

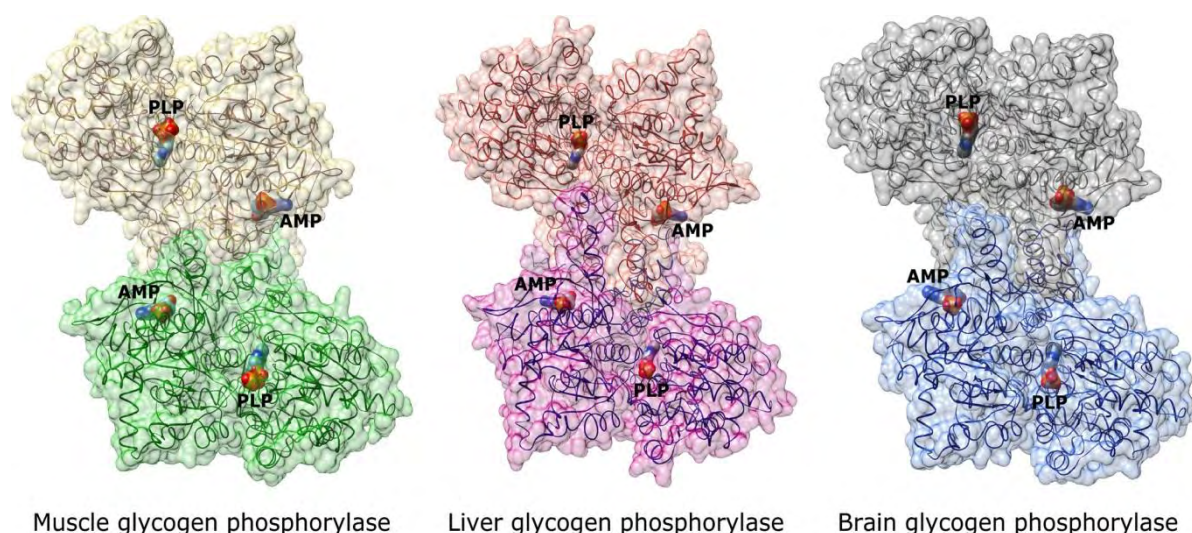
Σε φυσιολογικές συνθήκες η GP καταλύει την προσθήκη φωσφορικού οξέος στον α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ δύο μονομερών του γλυκογόνου αποδίδοντας τελικά, 1-



φωσφορική γλυκόζη και γλυκογόνο με ένα λιγότερο κατάλοιπο γλυκόζης, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1.7**. Η φωσφορολυτική διάσπαση από την GP εκτυλίσσεται απ' τα μη αναγωγικά άκρα της αλυσίδας του γλυκογόνου και συνεχίζεται μέχρι το τέταρτο κατάλοιπο από το σημείο της διακλάδωσης. Η αντίδραση που πραγματοποιεί η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι αντιστρέψιμη *in vitro*, ωστόσο μέσα στα κύτταρα η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτήν της 1-φωσφορικής γλυκόζης γεγονός που δεν ευνοεί την αντίστροφη πορεία.

Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές την GP: η ηπατική, η μυϊκή και του εγκεφάλου. Ενώ η ισομορφή της GP των μυών και του εγκεφάλου εξασκεί σχεδόν αποκλειστικά τις επιδράσεις της στους αντίστοιχους ιστούς, η GP του ήπατος κατέχει ομοιοστατικό ρόλο και εκφράζεται παντού εκτός από τον εγκέφαλο και τους σκελετικούς μύες, ικανοποιώντας τις απαιτήσεις ολόκληρου του οργανισμού σε γλυκόζη.

Η GP είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο και εντοπίζεται πάντα σε δύο μορφές: μια ενεργή R, με υψηλή αγγιστεία για υποστρώματα και προσδέτες, και μια ανενεργή T, με χαμηλή αγγιστεία για υποστρώματα και προσδέτες, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία. Η GP υπόκεινται σε ρύθμιση από την δέσμευση αλλοστερικών τελεστών στις υπομονάδες της. Στους μύες η ενέργεια που παρέχεται για την συστολή αποδίδεται στην αλλοστερική μετάπτωση της GP των μυών από την στερεοδιαμόρφωση T στην R παρουσία της AMP, η οποία με αυτόν τον τρόπο λειτουργεί ως αλλοστερικός ενεργοποιητής της GP. Αντίθετα, στο ήπαρ σε συνθήκες περίσσειας γλυκόζης αυτήν προσδένεται στην GPα μετατοπίζοντας την αλλοστερική ισορροπία από την ενεργό μορφή R στην ανενεργό μορφή T. Έτσι, η γλυκόζη λειτουργεί ως αλλοστερικός αναστολέας της GP. Η ρύθμιση του ενζύμου από αλλοστερικούς τελεστές το καθιστά ικανό να ανταποκρίνεται στις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου [23].



**Εικόνα 1.12:** Οι τρεις ισομορφές της ανθρώπινης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Αναπαρίστανται η GP του μυός (muscle), του ήπατος (liver) και του εγκεφάλου (brain). Τα τρία ισοένζυμα σχηματίζουν ομοδιμερή και συνολικά παρουσιάζουν πολύ παρόμοιες δομές. Ο συμπαράγοντας PLP βρίσκεται στο καταλυτικό κέντρο κάθε μονομερούς. Η θέση δέσμευσης της AMP βρίσκεται στη περιοχή της διεπαφής των υπομονάδων του διμερούς [24].

#### 1.4.1 Η συμμετοχή της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP)

Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) λειτουργεί ως συνένζυμο για μεγάλο αριθμό ενζύμων σε πλήθος αντιδράσεων που γενικότερα περιλαμβάνουν τον μεταβολισμό των αμινοξέων, αλλά και άλλων βιολογικών ενώσεων, όπως το γλυκογόνο.

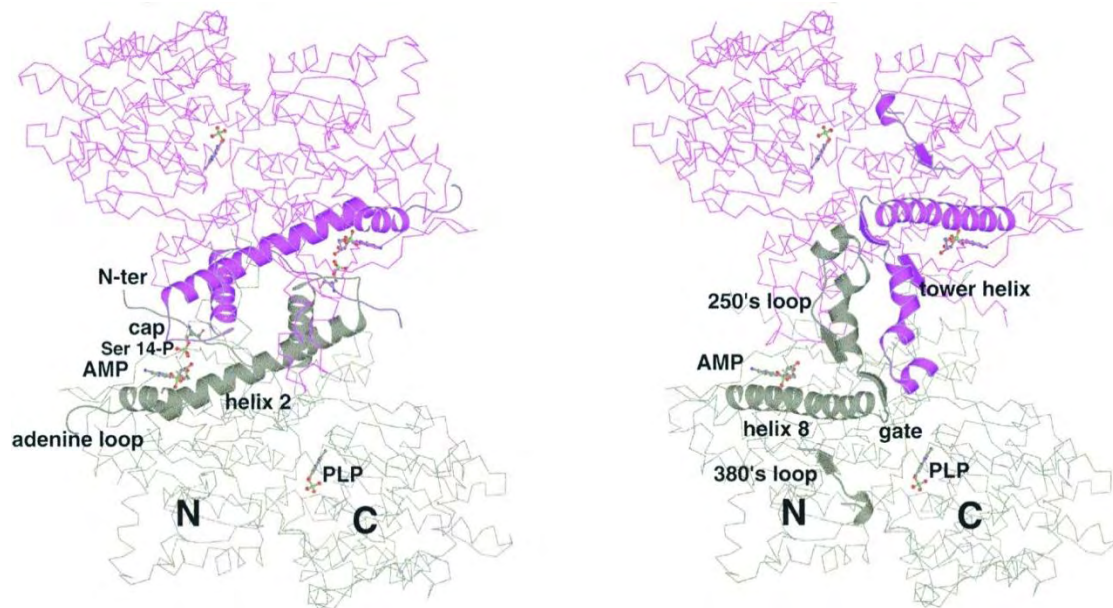
Η PLP παίζει καθοριστικό ρόλο στην δραστηριότητα της GP και αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου [25]. Η αλδεϋδική ομάδα της PLP συνδέεται με την Lys680 της πρωτεΐνης μέσω μιας βάσης Schiff. Κατά την πορεία αποικοδόμησης του γλυκογόνου από την GP, αρχικά λαμβάνει χώρα η μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου (H) από την φωσφορική ομάδα της PLP στην φωσφορική ομάδα του υποστρώματος. Στην συνέχεια διασπάται ο γλυκοζιτικός δεσμός μέσω της πρωτονίωσης του οξυγόνου του γλυκοζιδίου από την υδροξυλική ομάδα του φωσφορικού του υποστρώματος. Τέλος, ένα άτομο οξυγόνου του φωσφορικού της PLP ασκεί νουκλεόφιλη επίθεση στον C-1 του μορίου της γλυκόζης, οδηγώντας εν τέλει, στον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης [26].

#### 1.4.2 Η κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η GP είναι μια διμερής πρωτεΐνη η οποία συγκροτείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες με μοριακό βάρος περίπου 97 KDa η καθεμιά. Κάθε υπομονάδα της GP περιλαμβάνει μια N-τελική (480 κατάλοιπα) και μια C-τελική (360 κατάλοιπα) περιοχή οι οποίες αναδιπλώνονται, και το μόριο τελικά παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. Η PLP συνδέεται με μέσω βάσης Schiff με την Lys680 στην C-τελική περιοχή, και μαζί με την N-τελική περιοχή σχηματίζουν το καταλυτικό κέντρο. Η φωσφορυλιωμένη Ser14, εντοπίζεται σε μια περιοχή που αποτελεί την περιοχή διεπαφής μεταξύ των δύο υπομονάδων, και γενικά αφορά στην περιοχή μέσω της οποίας μεταφέρονται αλλαγές στην διαμόρφωση μεταξύ των δύο υπομονάδων[27].

Η GP περιέχει τουλάχιστον επτά ρυθμιστικές περιοχές, οι οποίες είναι:

- Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14
- Το καταλυτικό κέντρο
- Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου
- Το κέντρο αναστολής
- Το αλλοστερικό κέντρο
- Το νέο αλλοστερικό κέντρο
- Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης [16]



**Εικόνα 1.13:** Η δομή της ενεργούς φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος. Μία υπομονάδα του διμερούς είναι χρωματισμένη μωβ, η άλλη γκρι. Επισημαίνονται επίσης το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο κάθε υπομονάδας. Το καταλυτικό κέντρο χαρακτηρίζεται από τον συμπάραγοντα PLP.

Στην **εικόνα 1.13**, το πρώτο κατάλοιπο που εντοπίζεται στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας επισημαίνεται με N. Η θέση φωσφορυλίωσης (Ser-14-P) εντοπίζεται κατά μήκος του καλύμματος (42° κατάλοιπο -45° κατάλοιπο) από την θέση δέσμευσης του AMP. Η έλικα 2 ακολουθεί μετά την δομική περιοχή cap μεταξύ 48<sup>ου</sup> καταλοίπου - 78<sup>ου</sup> καταλοίπου, που σχηματίζει τη βάση της θέσης πρόσδεσης της AMP και εκτείνεται σε όλη την πρωτεΐνη. Η έλικα 2 σχηματίζει τη βάση της θέσης πρόσδεσης της AMP της άλλης υπομονάδας. Το εξωτερικό άκρο της θέσης πρόσδεσης της AMP περιορίζεται από το βρόχο αδενίνης (κατάλοιπα 315-324). Στην εικόνα επισημαίνονται επίσης τα 40 αμινοξικά κατάλοιπα που υφίστανται δομική αναδιάταξη κατά την ενεργοποίηση. Ο βρόχος 380 (κατάλοιπα 376–386) και 280s (κατάλοιπα 282-287) είναι πλέον μετατοπισμένοι με τέτοιο τρόπο ώστε απομακρύνονται από το καταλυτικό κέντρο [23].

#### 1.4.2.1 Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14

Η φωσφορυλίωση της Ser14 από την PhK οδηγεί σε μετατροπή της GP από την ανενεργή μορφή b στην ενεργή μορφή a. Η τροποποίηση αυτήν, σταθεροποιεί την ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου μέσω πολυάριθμων αλληλεπιδράσεων. Το φορτίο του φωσφορικού στην Ser14 εξουδετερώνεται από την αλληλεπίδραση με την Arg69 που εντοπίζεται στην α-2 έλικα και την Arg43 της γειτονικής υπομονάδας του διμερούς που εντοπίζεται στην περιοχή του επικαλύμματος (cap). Το αλειφατικό τμήμα κάθε μιας από τις προαναφερθείσες αργινίνες συμβάλλει στην θωράκιση του φωσφορικού [28].

#### 1.4.2.2 Το καταλυτικό κέντρο

Στο μόριο της GP υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, γνωστές ως πύργος (tower) και ως επικάλυμμα (cap). Οι έλικες των πύργων (κατάλοιπα 267-274) κάθε υπομονάδας έρχονται κοντά, καθώς αναπτύσσονται μεταξύ τους δεσμοί υδρογόνου, σχηματίζοντας μια βαθιά σχισμή, η οποία αποτελεί το καταλυτικό κέντρο. Στο άκρο της έλικας του πύργου εντοπίζεται ο βρόχος 250 (κατάλοιπα 250-260) και ο βρόχος 280s. Η πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο καθορίζεται από την συντονισμένη κίνηση στην σχισμή που είτε εκθέτει, είτε αποκλείει το καταλυτικό κέντρο. Κατά την μετάβαση στη R διαμόρφωση, ο βρόχος 280s μετακινείται προς τα πάνω και μακριά, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο στο υπόστρωμα να προσεγγίσει το καταλυτικό κέντρο. Κρυσταλλογραφικές μελέτες στην GP που απομονώθηκε από κονίκλους έδειξαν ότι η πρόσβαση υποστρωμάτων και μικρών μορίων στο καταλυτικό κέντρο επιτυγχάνεται όταν ο βρόχος 280s εκτοπίζεται, ενώ αντίθετα αποτρέπεται όταν ο βρόχος 280s αποκλείει την είσοδο από το καταλυτικό κέντρο [29]. Η γλυκόζη αναστέλλει την GP σταθεροποιώντας την αδρανή διαμόρφωση του ενζύμου. Η εξάρτηση της GP από την γλυκόζη είναι ένα ενδιαφέρον στοιχείο για τον σχεδιασμό ενός αναστολέα της GP, ο οποίος θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανό αντιδιαβητικό φάρμακο. Αν επιτευχθεί η παρασκευή ενός φαρμάκου με ελαφρώς ανασταλτική επίδραση στην GP όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι χαμηλά, τότε δύναται να μειώσει τον κίνδυνο υπογλυκαιμικών επεισοδίων, διατηρώντας παράλληλα την αποτελεσματικότητα του ως φάρμακο [30].

#### 1.4.2.3 Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου

Ο ακριβής ρόλος του κέντρου αποθήκευσης του γλυκογόνου δεν είναι πλήρως γνωστός, εντούτοις γνωρίζουμε ότι το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου λειτουργεί ως μια περιοχή μέσω της οποίας το ένζυμο συνδέεται με το μόριο του γλυκογόνου αποτελώντας μια πρόσθετη περιοχή ρύθμισης. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου εντοπίζεται στην επιφάνεια του ενζύμου, περίπου 30 Å από την καταλυτικό κέντρο, 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 50 Å από το νέο αλλοστερικό κέντρο. Εκτός από το γλυκογόνο στο κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου μπορούν να προσδεθούν και ολιγοσακχαρίτες. Μάλιστα, οι α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνες συνδέονται στο κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου και έχει βρεθεί ότι λειτουργούν ως συναγωνιστικοί αναστολείς του ενζύμου αφού συναγωνίζονται το γλυκογόνο ως προς την σύνδεσή τους στο εν λόγω κέντρο [31].

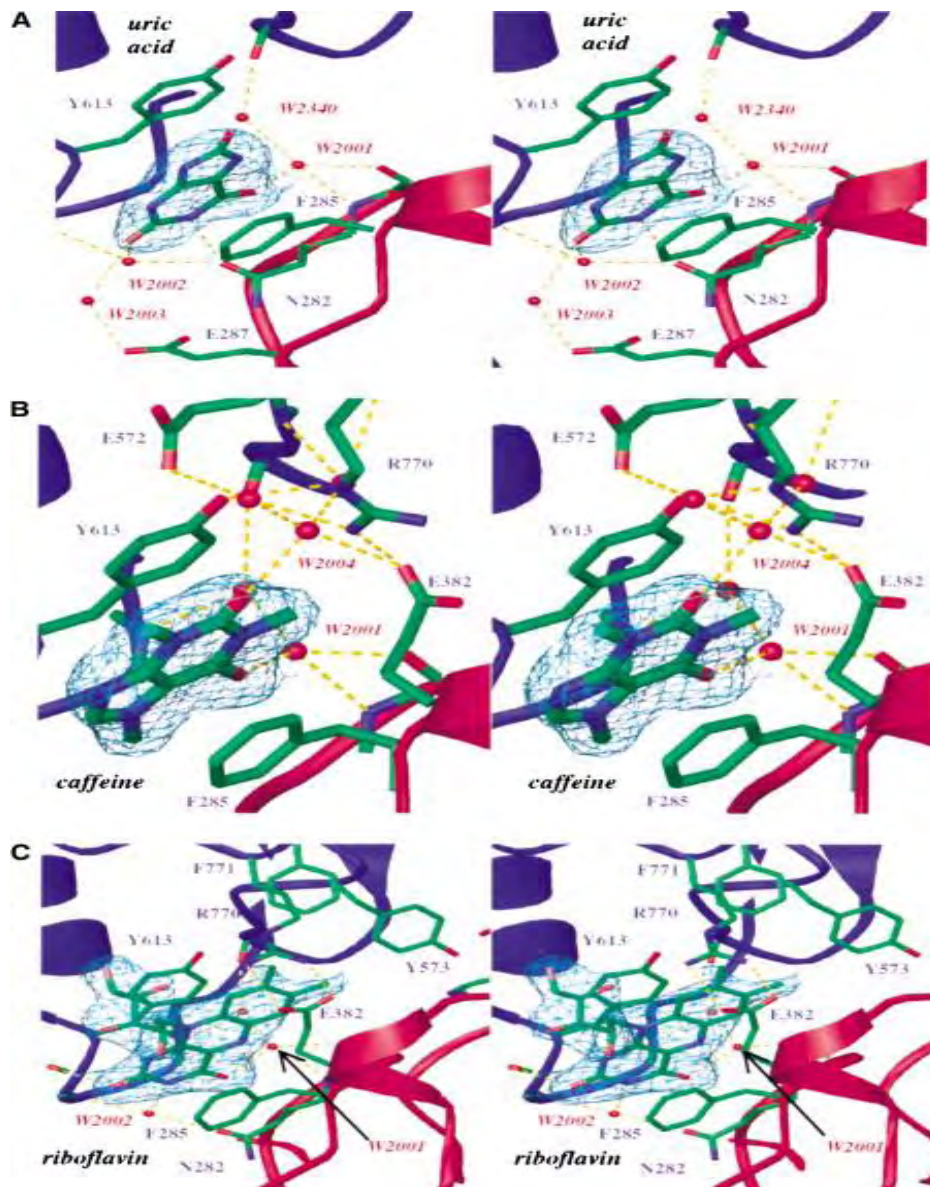
#### 1.4.2.4 Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής της GP εντοπίζεται στην επιφάνεια του ενζύμου, στην περιοχή της διεπαφής των δύο υπομονάδων, σε απόσταση περίπου 12 Å από το καταλυτικό κέντρο. Το κέντρο αναστολής μοιάζει με σχισμή στο ένζυμο, μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αρωματικών αμινοξέων: Phe285 και Tyr613. Όταν ένας προσδέτης προσεγγίζει το κέντρο αναστολής μεταξύ αυτού και των πλευρικών αλυσίδων των αρωματικών αμινοξέων Phe285 και Tyr613 αναπτύσσονται υδροφοβικές και



ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες οδηγούν στη σύνδεση του προσδέτη στο κέντρο αναστολής. Επιπλέον τη σύνδεση αυτήν ενισχύουν και οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των μορίων ύδατος που περιβάλλουν το κέντρο αναστολής και δημιουργούν ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων, τόσο με τον ίδιο τον προσδέτη, όσο και με τα γειτονικά κατάλοιπα του κέντρου αναστολής.

Η ριβοφλαβίνη, η καφεΐνη και το ουρικό οξύ δεσμεύονται όλα στο κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Από τα τρία σύμπλοκα, η ένωση με τη χαμηλότερη συγγένεια για την ανθρώπινη ηπατική GPα (h1GPα) είναι το ουρικό οξύ ( $K_D = 550 \mu\text{M}$ ). Το ουρικό οξύ δημιουργεί μια ισχυρή αλληλεπίδραση με τον αρωματικό δακτύλιο της Phe285. Η θέση του ουρικού οξέος σε σχέση με τον δακτύλιο της Tyr613 είναι ελαφρώς μετατοπισμένη έτσι ώστε η ισχυρότερη αλληλεπίδραση να είναι με τα άτομα Ca και Cβ της Tyr613 και όχι με τον φαινολικό δακτύλιο. Η h1GPα δεσμεύει την καφεΐνη με 5 φορές μεγαλύτερη συγγένεια από το ουρικό οξύ. Η καφεΐνη σχηματίζει επιπρόσθετες van der Waals αλληλεπιδράσεις τόσο με τις αλειφατικές όσο και με την φαινολική ομάδα της Tyr613. Αυτό συμβαίνει επειδή η υδρόφοβη επιφάνεια της καφεΐνης είναι μεγαλύτερη από αυτήν του ουρικού οξέος εξαιτίας της παρουσίας των τριών μεθυλικών ομάδων. Η ριβοφλαβίνη αποτελεί την ένωση με την υψηλότερη συγγένεια ( $K_D = 17 \mu\text{M}$ ) Η υδρόφοβη επιφάνεια της ριβοφλαβίνης συγκριτικά με τις αλληλεπιδράσεις που συμμετέχουν οι δακτύλιοι στις περιπτώσεις του ουρικού οξέος και της καφεΐνης επιτρέπει εκτενείς αλληλεπιδράσεις με τις αλειφατικές ομάδες και τους δακτυλίους των Phe285 και Tyr613, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην πρόσδεση [30].



**Εικόνα 1.14:** Στερο-απεικόνιση: (Α) Η δέσμευση του ουρικού οξέος (Β) η δέσμευση της καφεΐνης και (C) η δέσμευση της ριβοφλαβίνης στο κέντρο αναστολής. Για κάθε προσδέτη ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας  $2F_o - F_c$  έχει διαμορφωθεί σε  $1\sigma$ . Στην εικόνα τα δομικά στοιχεία του αμινοτελικού άκρου είναι χρωματισμένα με κόκκινο ενώ τα δομικά στοιχεία της καρβοξυτελικής περιοχής με μπλε. Τα άτομα οξυγόνου αποτυπώνονται κόκκινα, τα άτομα αζώτου μπλε, τα άτομα άνθρακα πράσινο και τα μόρια ύδατος παρίστανται ως κόκκινες σφαίρες [30].

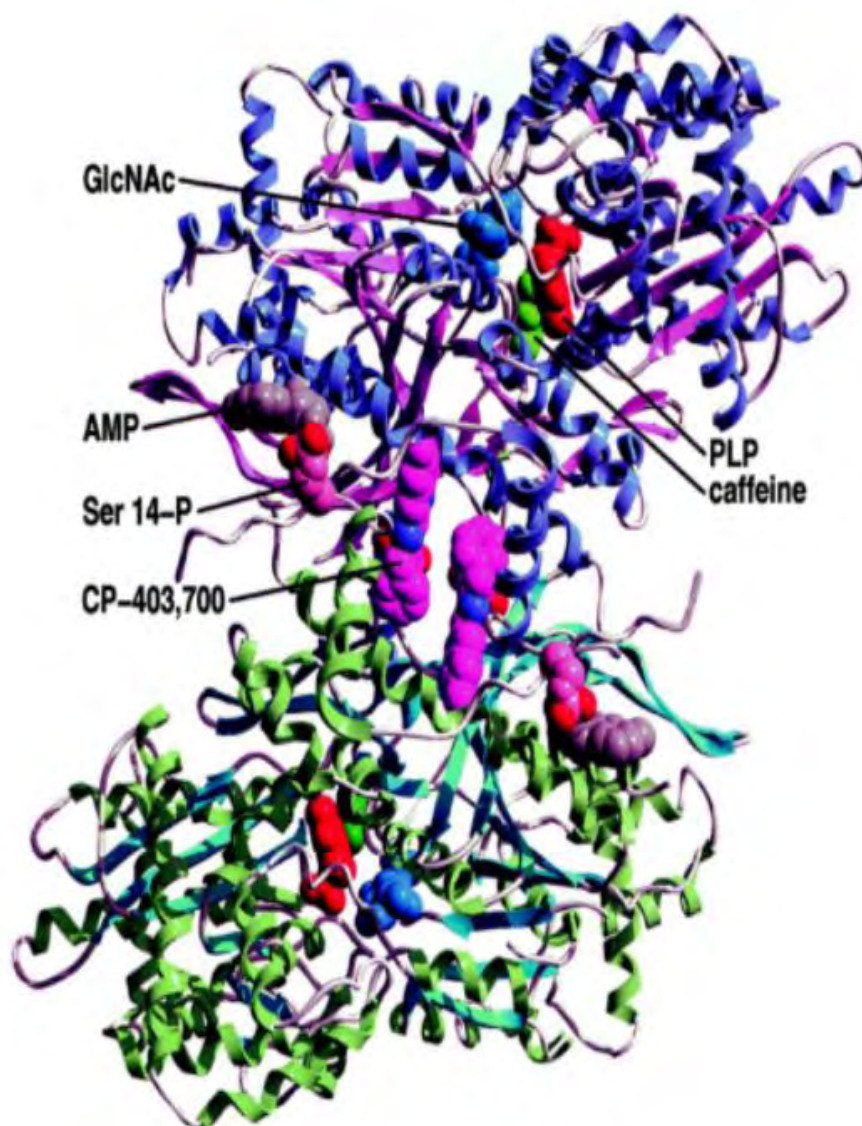
#### 1.4.2.5 Αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στην διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων περίπου  $30 \text{ \AA}$  από το καταλυτικό κέντρο. Εντοπίζεται στην περιοχή όπου τα καρβοξυτελικά άκρα των ελικών  $\alpha 2$  και  $\alpha 8$  έρχονται κοντά, με τρόπο τέτοιο ώστε το αλλοστερικό κέντρο φαίνεται να είναι επενδυμένο από τις προαναφερθείσες έλικες και από το πτυχωτό φύλλο  $\beta 7$ . Στο αλλοστερικό κέντρο έχουν βρεθεί ότι προσδένονται ποικίλα μόρια μεταξύ των οποίων είναι η AMP, η IMP, η ATP, η 6-φωσφορική γλυκόζη, το NADH με κάποια από αυτά να επάγουν την δράση του ενζύμου ενώ αντίθετα, κάποια να την αναστέλλουν.

Η AMP αποτελεί έναν ισχυρό ενεργοποιητή της GPb ενώ η ATP και η 6-φωσφορική γλυκόζη αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου με την 6-φωσφορική γλυκόζη να αποτελεί τον ισχυρότερο φυσικό αναστολέα της GPb που προσδέεται στο αλλοστερικό κέντρο. Ως εκ τούτου προκύπτει ότι η μετάπτωση της GPb από την T διαμόρφωση στην R διαμόρφωση και αντίστροφα εξαρτάται από το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου. Όταν οι μύες βρίσκονται σε ηρεμία το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή GPb, με την έναρξη της άσκησης όπου αυξάνεται η παραγωγή της AMP δεσμεύεται στην GPb και σταθεροποιεί το ένζυμο στην κατάσταση R [32].

#### **1.4.2.6 Νέο αλλοστερικό κέντρο**

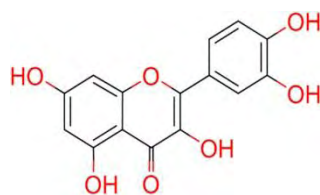
Το νέο αλλοστερικό κέντρο ανακαλύφθηκε το 2000 από το Δρ Ν.Γ. Οικονομάκο και τους συνεργάτες του κατά τη μελέτη της δράσης της ένωσης CP320626 στην GP. Ο CP320626 δεσμεύεται σε μια περιοχή, η οποία μέχρι τότε δεν είχε παρατηρηθεί να δεσμεύει προσδέτες, και βρίσκεται περίπου 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολής [33]. Η περιοχή αυτήν εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δύο υπομονάδων, στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς του ενζύμου [34]. Ο CP320626 δεσμεύεται στο νέο αλλοστερικό κέντρο αναπτύσσοντας έξι δεσμούς υδρογόνου και συμμετέχοντας σε ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων Van der Waals. Ο CP320626 ασκεί ανασταλτική επίδραση στην GPb μεταβάλλοντας την αλλοστερική ισορροπία και σταθεροποιώντας την κατάσταση T. Το νέο αλλοστερικό κέντρο είναι μια επιπλέον περιοχή η οποία μπορεί να αποτελέσει στόχο για την αναζήτηση ενώσεων που μπορούν να αναστείλουν την GP [33].



**Εικόνα 1.15:** Σχηματική αναπαράσταση του διμερούς της hGPa, που εντοπίζονται το καταλυτικό, το αλλοστερικό, το νέο αλλοστερικό κέντρο στο οποίο φαίνεται δεσμευμένοι και οι αναστολείς CP-403, 700, καθώς και το κέντρο αναστολής. Το καταλυτικό κέντρο, περιλαμβάνει τον απαραίτητο συμπαράγοντα PLP. Το ανάλογο γλυκόζης (GlcNAc) δεσμεύεται στο καταλυτικό κέντρο και προωθεί την κατάσταση T, στην οποία το μόριο έχει χαμηλή αγκιστεία για υποστρώματα και προσδέτες, μέσω σταθεροποίησης του βρόχου 280s. Το αλλοστερικό κέντρο, εντοπίζεται στην περιοχή της διεπαφής μεταξύ των υπομονάδων περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και αποτελεί την περιοχή η οποία δεσμεύει: τον αλλοστερικό τελεστή AMP οδηγώντας σε ενεργοποίηση της φωσφορύλασης του γλυκογόνου, την 6 φωσφορική γλυκόζη και ενώσεις ακυλουρίας οδηγώντας σε απενεργοποίηση του ενζύμου. Το κέντρο αναστολής, στο οποίο δεσμεύονται ενώσεις πουρίνης όπως η καφεΐνη και η φλαβοπιριδόλη (Oikonomakos et al., 2000a) βρίσκεται στην είσοδο της σήραγγας του καταλυτικού κέντρου, που σχηματίζεται από τα δύο υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα: Phe285 και Tyr613 [34].

#### 1.4.2.7 Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Η κερσετίνη ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών, οι οποίες είναι φυσικές ενώσεις που αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες για τα φυτά. Είναι ευρέως διαδεδομένες για τις αντιφλεγμονώδεις και τις καρδιοπροστατευτικές τους ιδιότητες [35]. Η κερσετίνη απαντάται στους καρπούς των φαρμακευτικών φυτών *Phyllanthus* και *Vaccinium oxycoccos*.



Εικόνα 1.16: Η δομή του μορίου της κερσετίνης [36].

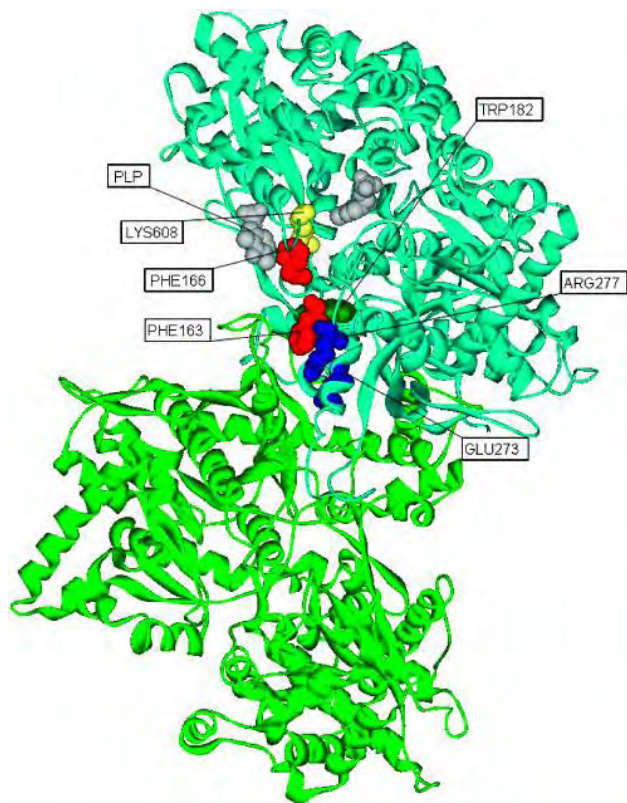
Μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ έδειξαν ότι η κερσετίνη προσδένεται σε ένα κέντρο του ενζύμου, κοντά στην επιφάνεια της σε απόσταση 15 Å από το καταλυτικό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Η κερσετίνη αλληλεπιδρά με τα κατάλοιπα: Gly177, Trp173, Thr85 και Thr219 της GP αναπτύσσοντας δεσμούς υδρογόνου. Η κερσετίνη αναστέλλει ισχυρά την GP καθώς παρουσιάζει τιμές IC50 4.8 μM έναντι της GPa, γεγονός που την καθιστά αξιοσημείωτο αντι-υπεργλυκαιμικό παράγοντα ο οποίος μπορεί να θεωρηθεί πιθανό υποψήφιο φάρμακο για τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 [37].

### 1.4.3 Η αλλοστερική μετάπτωση στην GP

Όπως αναφέρεται εκτενέστερα και στα εδάφια που παρατίθενται στην συνέχεια, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου μπορεί να υπάρξει σε δύο αλληλομετατρέπομενες μορφές T και R οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία. Η φωσφορυλίωση του ενζύμου στην Ser14 αλλά και η μη ομοιοπολική δέσμευση αλλοστερικών τελεστών οδηγούν σε μεταβολές της διαμόρφωσης, οι οποίες μεταδίδονται από το κέντρο της φωσφορυλίωσης και το αλλοστερικό κέντρο στο καταλυτικό κέντρο. Η «επικοινωνία» μεταξύ των προαναφερθέντων κέντρων του ενζύμου έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου.

Έχουν εντοπιστεί έξι αμινοξικά κατάλοιπα στο μονομερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου: Phe163, Phe166, Trp182, Glu273, Arg277, Lys608 τα οποία υποδεικνύονται και στην **Εικόνα 1.17**. Τα αμινοξέα Phe163 και Phe166 ανήκουν στη β στροφή (κατάλοιπα 162-166), της οποίας η δομή αλλάζει κατά την μετάβαση από την στερεοδιαμόρφωση T- στην R- διαμόρφωση καθώς ο βρόχος 280s εκτοπίζεται. Η Trp182 έρχεται σε άμεση επαφή με την Phe163 και πιθανώς συμμετέχει στη μετάδοση των μεταβολών στην διαμόρφωση από τα γεγονότα της αλληλεπίδρασης πύργου/πύργου στο καταλυτικό κέντρο. Η Arg277 βρίσκεται στην άκρη της έλικας του πύργου, η οποία εντοπίζεται έναντι της αντίστοιχης έλικας του πύργου της συμμετρικής υπομονάδας. Κατά την μετάβαση από T- στην R- διαμόρφωση, οι έλικες του πύργου αλλάζουν τη γωνία τους και το εν λόγω αμινοξύ μετατοπίζεται για να επιτρέψει δομικές αλλαγές στο καταλυτικό κέντρο. Επιπλέον, η μετάβαση από T- στην R- διαμόρφωση συνεπάγεται την αντικατάσταση του δεσμού υδρογόνου που δημιουργείται μεταξύ της Lys608 και του καταλοίπου Arg569 του καταλυτικού κέντρου με έναν νέο δεσμό υδρογόνου μεταξύ της Lys608 και του καταλοίπου Asp283 του βρόγχου 280s γεγονός που τονίζει την σημασία της Lys608 κατά την μετάπτωση την T- στην R- διαμόρφωση [38].





**Εικόνα 1.17:** Η δομή του ομοδιμερούς της φωσφορυλάσης γλυκογόνου απομονωμένη από κόνικλο. Οι δύο υπομονάδες του ομοδιμερούς είναι χρωματισμένες μπλε (αλυσίδα Α) και πράσινη (αλυσίδα Β). Ο συμπαράγοντας PLP με γκρι χρώμα. Τα κατάλοιπα που δεσμεύονται στην PLP είναι χρωματισμένα με κίτρινο, τα κατάλοιπα που βρίσκονται σε μία από τις έλικες του πύργου εμφανίζονται με μπλε χρώμα, τα κατάλοιπα που ανήκουν στην β στροφή είναι χρωματισμένα κόκκινα και τέλος το κατάλοιπο Trp182 που βρίσκεται βαθιά στην δομή της GP έχει χρώμα σκούρο πράσινο [38].

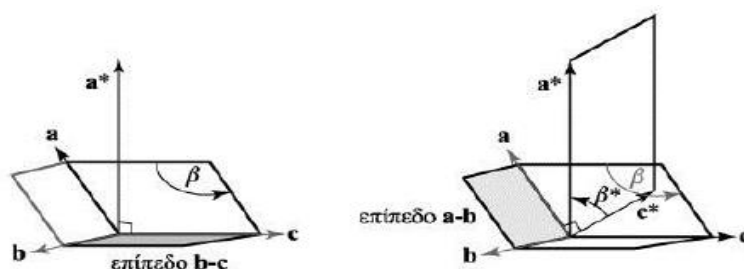
#### 1.4.4 Η GP ως στόχος αντι-υπεργλυκαιμικών ενώσεων

Η GP αποτελεί το κυρίαρχο ένζυμο στον μεταβολισμό του ανθρώπου, αφού παίζει κρίσιμο ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ως εκ τούτου η GP αποτελεί έναν ελκυστικό μοριακό στόχο για τον σχεδιασμό αναστολέων για την διαχείριση του ΣΔ τύπου 2. Οι περισσότερες ενώσεις έναντι της GP είναι ανάλογα γλυκόζης. Να σημειωθεί ότι οι αναστολείς δε δεσμεύονται κατ' ανάγκη στο καταλυτικό κέντρο και ως εκ τούτου, στο στόχαστρο των ερευνητικών προγραμμάτων ανάπτυξης νέων φαρμάκων, βρίσκονται και τα υπόλοιπα κέντρα του ενζύμου. Μέσω της χρήσης των H/Y αλλά και των γνώσεων γύρω από την δομή της GP μπορούν να σχεδιαστούν ενώσεις που θα προσδένονται και θα εκδηλώνουν το βιολογικό τους αποτέλεσμα και στα προαναφερθέντα κέντρα του ενζύμου GP [39]. Επιπλέον, φυσικές ενώσεις έχουν βρεθεί ότι αναστέλλουν ισχυρά την GP, ενώ το ένζυμο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί και ως μοντέλο για την εφαρμογή της κρυσταλλογραφίας συγγένειας, κάτι το οποίο οδήγησε στη εύρεση της πιο βιοδραστικής φυσικής ένωσης ως προς την GP [40].

## 1.5 Κρυσταλλογραφία

### 1.5.1 Η δομή του κρυστάλλου

Οι κρύσταλλοι είναι στερεά σώματα που αποτελούνται από ακριβείς επαναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου, το οποίο ονομάζεται μοναδιαία κυψελίδα. Στην **Εικόνα 1.18** απεικονίζονται τα στοιχεία ενός κρυστάλλου. Αρχίζοντας από την ασύμμετρη μονάδα, που αντιστοιχεί στο μέρος ενός κρυστάλλου που δεν εμφανίζει καμία συμμετρία, εφαρμόζεται μια πράξη συμμετρίας για να παραχθεί τελικά το κρυσταλλικό πλέγμα. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιλαμβάνει όλα τα άτομα των μοτίβων του κρυσταλλικού πλέγματος και της ασύμμετρης μονάδας. Οι ακμές της μοναδιαίας κυψελίδας ορίζουν ένα σύνολο μοναδιαίων διανυσματικών αξόνων  $a$ ,  $b$ ,  $c$ .



**Εικόνα 1.18:** Κατασκευή μιας μοναδιαίας κυψελίδας του αντίστροφου χώρου (αντίστροφη μοναδιαία κυψελίδα) από μία μοναδιαία κυψελίδα του πραγματικού χώρου. Οι γωνίες μεταξύ των αξόνων ορίζονται ως  $\alpha$  μεταξύ  $b$  και  $c$ ,  $\beta$  μεταξύ  $a$  και  $c$  και  $\gamma$  μεταξύ  $a$  και  $b$  [41].

Όλες οι μοριακές ιδιότητες ενός κρυστάλλου μπορούν να αποδοθούν σε εκείνες της ασύμμετρης μονάδας. Κατά συνέπεια για την περιγραφή της δομής ενός κρυστάλλου αρκεί απλώς να περιγράψουμε την δομή της ασύμμετρης μονάδας [41].

### 1.5.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων

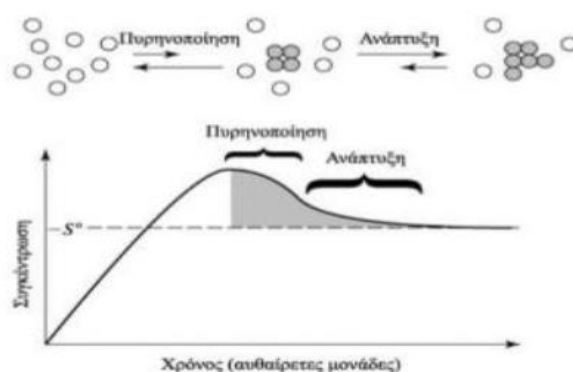
Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο εδάφιο ο κρύσταλλος είναι ένα στερεό σώμα. Ωστόσο τα μακρομόρια υπάρχουν κατά κύριο λόγο σε μορφή υδατικών διαλυμάτων, εντούτοις για να δημιουργήσουμε έναν κρύσταλλο πρέπει να κατακρημνίσουμε τα διαλυμένα μόρια με έναν ελεγχόμενο τρόπο που να ευνοεί την τάξη. Ένα μόριο εγκαταλείπει το διάλυμα όταν η συγκέντρωσή του υπερβεί την εγγενή του διαλυτότητα ( $S_0$ ). Η διαλυτότητα εξαρτάται τη θερμοκρασία, την πίεση και το διαλύτη.

Αύξηση της συγκέντρωσης του πρωτεΐνης στην υπέρκορη κατάσταση μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό κρυστάλλου. Μια στρατηγική για την αύξηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης αποτελεί η αφαίρεση μέρους του διαλύτη με αποτέλεσμα την ελάττωση του συνολικού όγκου του διαλύματος. Μια άλλη στρατηγική για την ελάττωση της διαλυτότητας ενός πρωτεϊνικού μορίου είναι να τροποποιηθεί η ιοντική ισχύ του διαλύματος. Η βέλτιστη διαλυτότητα ( $S_0$ ) βρίσκεται συνήθως σε μια συγκεκριμένη περιοχή συγκέντρωσης άλατος. Εάν προστεθεί άλας (εναλάτωση) ή εξατμισθεί το ύδωρ του διαλύματος η ιοντική ισχύς θα αυξηθεί, ενώ αντίθετα αν μειωθεί (εξαλάτωση), π.χ. με διαπίδυση, η  $S_0$  θα μειωθεί και το μόριο θα κατακρημνιστεί.

Στην ανάπτυξη ενός πρωτεϊνικού κρυστάλλου σημαντικοί παράγοντες αποτελούν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η θερμοκρασία, το pH, η ιοντική ισχύς και η βιοχημική καθαρότητα του δείγματος (σημαντικότερο παράγοντας). Συνήθως μία πρωτεΐνη για να οδηγηθεί σε κρυστάλλωση πρέπει να είναι περισσότερο από 95% βιοχημικά καθαρό.

Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου συμβαίνει σε δύο βήματα:

- Ένα βήμα χαμηλής πιθανότητας για πυρηνοποίηση
- Ένα βήμα υψηλής πιθανότητας για την αύξηση του μεγέθους του κρυστάλλου



**Εικόνα 1.19:** Η ανάπτυξη του κρυστάλλου. Ο σχηματισμός κρυστάλλων ενός ελάχιστου κρυσταλλικού πλέγματος, που αποτελεί και το αρχικό βήμα κρυστάλλωσης, είναι ένα χαμηλής πιθανότητας βήμα και λαμβάνει χώρα σε ένα υπέρκορο διάλυμα. Εν συνεχεία ο κρύσταλλος αναπτύσσεται με την προσθήκη μορίων στην επιφάνεια του πυρήνα, σε συγκέντρωση κοντά στην εγγενή διαλυτότητα  $S_0$  [41].

Το στάδιο της πυρήνωσης οδηγείται από την αύξηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε τιμή αρκετά υψηλότερη από την  $S_0$  (υπερκορεσμός). Η επακόλουθη προσθήκη μορίων στις κρυσταλλικές επιφάνειες λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τον υπερκορεσμό κοντά στην εγγενή διαλυτότητα. Η πυρήνωση αποτελεί το σημαντικότερο από τα δύο βήματα.

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για να διευκολύνουν την διαδικασία της κρυστάλλωσης πρωτεϊνών. Οι δύο πλέον χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η διάχυση ατμών και η μικρο-διαπίδυση. Και οι δύο μέθοδοι έχουν ως σκοπό την τροποποίηση του διαλύματος, μειώνοντας την διαλυτότητα της πρωτεΐνης με έναν ελεγχόμενο και αργό τρόπο [41].

### 1.5.3 Η θεωρία της περίθλασης των ακτίνων X

Το μήκος της ακτινοβολίας των ακτίνων-X είναι κατάλληλο για τη διάκριση ατόμων σε απόσταση ομοιοπολικού δεσμού. Η συμβολή των σκεδαζόμενων ακτίνων-X οδηγεί στο γενικό φαινόμενο της περίθλασης. Στην περίθλαση των ακτίνων-X, αντιμετωπίζεται η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ως κύμα. [41].



#### 1.5.4 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου

Η ποιότητα του υπολογιζόμενου χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας εξαρτάται πολύ από την ποιότητα των πειραματικών δεδομένων και από το μοντέλο. Η ποιότητα των δεδομένων μπορεί να αλλαχθεί στην περίπτωση που συλλεχθούν καλύτερα δεδομένα περίθλασης. Εντούτοις μπορεί να γίνει βελτίωση του μοντέλου με βελτιστοποίηση της δομής, ώστε να ταιριάζει καλύτερα με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Σε αυτή την διαδικασία βελτιστοποίησης, το μοντέλο υποβάλλεται σε μικρές αλλαγές για την βελτίωση των λεπτομερειών του. Ένα αντικειμενικότερο κριτήριο για την αξιολόγηση του πόσο καλά ένα μοντέλο συμφωνεί με τα δεδομένα είναι ο δείκτης αξιοπιστίας R (ή παράγοντας R)

$$R = \frac{\sum |F(S)_{obs} - F(S)_{calc}|}{\sum |F(S)_{obs}|}$$

Σε αυτήν την περίπτωση, συγκρίνονται μόνο τα μέτρα των μετρηθέντων και υπολογισθέντων παραγόντων δομής. Γενικά, οι δείκτες αξιοπιστίας R κυμαίνονται μεταξύ του 70% (0,7) για ένα τυχαίο «ταίριασμα» και μίας τιμής που πλησιάζει το 0% για ένα ιδανικό τέλει ταίριασμα. Οι κρυσταλλογράφοι έχουν αναγνωρίσει την ανάγκη ύπαρξης ενός μέτρου αξιολόγησης της συμβατότητας του μοντέλου, χωρίς αυτό να προκαταλαμβάνεται από το ίδιο μοντέλο. Η προσέγγιση που χρησιμοποιείται είναι η εξής: αρχικά διαχωρίζεται ένα μέρος (10%) από τα συνολικά πειραματικά δεδομένα για να χρησιμοποιηθεί ως σετ δεδομένων ελέγχου. Το μοντέλο βελτιστοποιείται μόνο ως προς τα υπόλοιπα δεδομένα (σετ δεδομένων τα οποία χρησιμοποιούνται). Κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης του μοντέλου, ο παράγοντας R υπολογίζεται τόσο για το σετ δεδομένων εργασίας όσο και για το σετ ελέγχου. Ο δεύτερος παράγοντας R καλείται R<sub>free</sub>, αναγνωρίζοντας ότι θα πρέπει να είναι απαλλαγμένος από την επίδραση του μοντέλου [41].

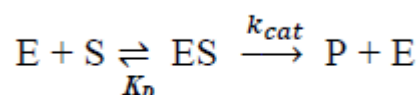
#### 1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που δρουν ως βιολογικοί καταλύτες στον οργανισμό, επιταχύνοντας δηλαδή μια αντίδραση δίχως όμως να καταναλώνονται κατά την διάρκεια αυτής. Προκύπτει λοιπόν ότι δεν υπάρχει στοιχειομετρική σχέση ανάμεσα στον καταλύτη με τα αντιδρώντα και τα προϊόντα.

Σε πολλά χημικά συστήματα για να λάβει χώρα μια αντίδραση πρέπει να διατεθεί ενέργεια ώστε να αυξηθεί η συχνότητα των ενεργοποιημένων μορίων. Στα βιολογικά συστήματα αυτό επιτυγχάνεται μέσω καταλυόμενων αντιδράσεων, και το ίδιο συμβαίνει και στις βιοχημικές αντιδράσεις. Τα ένζυμα μειώνουν την ενέργεια που χρειάζεται για την ενεργοποίηση των μορίων, και έτσι υποβοηθούν στην επίτευξη της ισορροπίας σε μια χημική αντίδραση. Οι Michaelis και Menten (1913) δέχονται ότι σε μια ενζυμική αντίδραση που μετέχει υπόστρωμα S και αλληλεπιδρά με το ένζυμο E, το πρώτο στάδιο αποτελεί απλώς ένα στάδιο ισορροπίας και επιτυγχάνεται ταχύτατα Σ'

αυτό το στάδιο σχηματίζεται το σύμπλοκο ES το οποίο ελέγχεται από την σταθερά διαστάσεως  $K_D$  ίση με  $\frac{[E] \times [S]}{[ES]}$  (A)

Ως δεύτερο και βραδύτερο στάδιο θεωρούν τη μετατροπή του δεσμευμένου στο ένζυμο υποστρώματος σε προϊόν P (χημική μετατροπή), αντίδραση που ελέγχεται από την σταθερά ταχύτητας  $k_{cat}$ , και συνοδεύεται από ανάκτηση του ενζύμου σε ελεύθερη μορφή. Συνεπώς συνολικά ισχύει:



Όπου:

$K_D$ : σταθερά διαστάσεως του συμπλόκου ES (1/mol ή 1/M)

$k_{cat}$ : σταθερά ταχύτητας καταλύσεως

E: ένζυμο

S: υπόστρωμα

ES: σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P: προϊόν

Η συνολική συγκέντρωση του ενζύμου  $[E_0]$  ισούται με το άθροισμα της συγκέντρωσης του ελεύθερου ενζύμου  $[E]$  συν την συγκέντρωση του συμπλοκοποιημένου ενζύμου  $[ES]$ . Σύμφωνα με τα παραπάνω και την σχέση (A) έχουμε:

$$K_D = \frac{([E_0] - [ES]) \times [S]}{[ES]}$$

ή

$$[ES] = \frac{[E_0] \times [S]}{K_D + [S]} \quad (B)$$

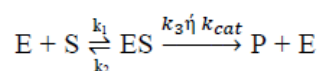
Η καταλυτική μετατροπή που πραγματοποιείται στο δεύτερο στάδιο έχει ταχύτητα  $u$ , και καθορίζει την ταχύτητα του συνολικού φαινομένου ( και των δύο σταδίων). Επειδή η αντίδραση είναι πρώτης τάξης έπεται ότι:

$$u = k_{cat} \times [ES] \quad (Γ)$$

Συνδυάζοντας τις σχέσεις (B) και (Γ) προκύπτει η σχέση:

$$u = \frac{k_{cat} \times [E_0] \times [S]}{K_D + [S]}$$

Στην παραπάνω μαθηματική σχέση καταλήγει η υπόθεση των Michaelis και Menten ωστόσο αποτελεί διαφορετική σχέση από την που έχει βαπτιστεί ως “εξίσωση των Michaelis και Menten” και προέρχεται από την υπόθεση της σταθεροποιημένης καταστάσης Briggs και Haldane, σύμφωνα με την οποία μετά την ανάμιξη των αντιδρώντων η ταχύτητα διασπάσεως του ES αυξάνει γρήγορα και πολύ σύντομα φθάνει την ταχύτητα σχηματισμού του, δημιουργώντας σταθεροποιημένη κατάσταση για την αντίδραση:



Όπου  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ , οι σταθερές των αντίστοιχων αντιδράσεων

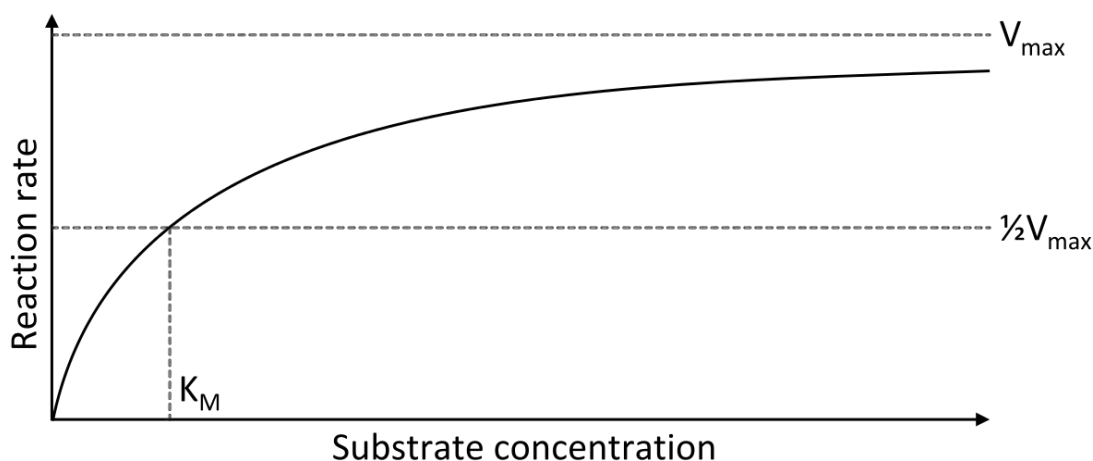
Στη σταθεροποιημένη κατάσταση το σύμπλοκο ES διατηρεί σχεδόν σταθερή τη συγκέντρωση του, ενώ για το ίδιο χρονικό διάστημα παρατηρείται σημαντική μεταβολή των απόλυτων τιμών των συγκεντρώσεων  $[S]$  και  $[P]$ , γεγονός που συνεπάγεται ότι  $d[ES]/dt = 0$ .

Ως σταθερά Michaelis-Menten ( $K_M$ ) ορίζεται ο λόγος  $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$

Η εξίσωση των Michaelis-Menten που αποτελεί θεμέλιο της κινητικής των ενζύμων και προκύπτει από την υπόθεση της σταθεροποιημένης καταστάσεως είναι η παρακάτω:

$$u = \frac{k_3 \times [E_0] \times [S]}{K_M + [S]}$$

Όπου  $[E_0]$  η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου [42].



**Εικόνα 1.20:** Διάγραμμα της ταχύτητας  $V_0$  μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten. Στο διάγραμμα φαίνεται ότι η σταθερά  $K_M$  είναι η συγκέντρωση εκείνη του υποστρώματος, που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας  $\frac{V_{max}}{2}$  [43].

### 1.6.1 Αλλοστερικά ένζυμα

Σε μια απ' τις κλασικές δημοσιεύσεις τους οι Monod, Changeaux και Jacob πρότειναν την έννοια του αλλοστερικού τροποποιητή για να περιγράψουν ρυθμιστικά μόρια που είτε αναστέλλουν είτε ενεργοποιούν ένα συγκεκριμένο ένζυμο. Ο αλλοστερικός τροποποιητής δεσμεύεται αμφίδρομα σε μια περιοχή δέσμευσης του ενζύμου. Η δημιουργία συμπλόκου ενζύμου-αλλοστερικού τροποποιητή προκαλεί μια σαφή και αμφίδρομη τροποποίηση στην διαμόρφωση της δομής του ενζύμου, που ονομάζεται αλλοστερική μετάπτωση, και τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, επηρεάζοντας μια/ή και περισσότερες κινητικές παραμέτρους, που χαρακτηρίζουν την λειτουργικότητα του συγκεκριμένου ενζύμου. Για την μελέτη των αλλοστερικών φαινομένων έχει προταθεί επίσης και το μοντέλο Koshland το οποίο προτείνει ότι η δέσμευση ενός μορίου δεσμευτή σε μια περιοχή δέσμευσης προκαλεί μία δομική μεταβολή στην περιοχή αυτήν, η οποία μεταβολή μεταφέρεται σε μια γειτονική περιοχή μέσω των επαφών που συνδέουν τις δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, γεγονός που τελικά δύναται να επηρεάσει την διαμόρφωση μιας μακρινής περιοχής του ενζυμικού μορίου.

Η κινητική των αλλοστερικών ενζύμων συνήθως διαφέρει από εκείνη των κανονικών ενζύμων. Στα αλλοστερικά ένζυμα η καμπύλη της ταχύτητας σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του υποστρώματος είναι συνήθως σιγμοειδής. Τα αλλοστερικά ένζυμα κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες σε ομοτροπικά, ετεροτροπικά και σε ομοτροπικά-ετεροτροπικά. Στην περίπτωση των ομοτροπικών ενζύμων το ίδιο το υπόστρωμα είναι και ο αλλοστερικός τροποποιητής μιας και δεσμεύεται τόσο στο ενεργό κέντρο όσο και στο αλλοστερικό κέντρο και επιταχύνει, συνήθως, την αντίδραση. Οι τροποποιητές των ετεροτροπικών ενζύμων είναι φυσικές ενώσεις χαμηλού συνήθως μοριακού βάρους, διαφορετικής στερεοχημικής δομής από το υπόστρωμα, που όταν δεσμεύονται στα αλλοστερικά κέντρα μπορούν ή να επιταχύνουν την αντίδραση (παίζοντας τον ρόλο του ενεργοποιητή) ή να την παρεμποδίσουν (παίζοντας τον ρόλο του αναστολέα). Όταν τέλος το υπόστρωμα δρα σαν ένας από δύο ή περισσότερους τροποποιητές, τότε το ένζυμο είναι ομοτροπικό-ετεροτροπικό.

Η GP, που υπακούει στο μοντέλο των MWC, είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο που υπάρχει σε δύο μορφές T και R που βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους, στην οποία οφείλεται και η ύπαρξη της σιγμοειδούς καμπύλης, και δεσμεύουν το υπόστρωμα με μεγαλύτερη ή μικρότερη δυσκολία αντίστοιχα. Απουσία του υποστρώματος το αλλοστερικό ένζυμο βρίσκεται εξ' ολοκλήρου στην κατάσταση T, καθώς όμως προστίθενται το υπόστρωμα η ισορροπία μετατοπίζεται προς την μορφή R [44].

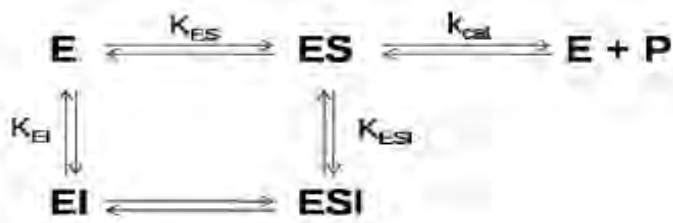
### 1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Η μελέτη της επίδρασης των αναστολέων σε αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα κρίνεται εξαιρετικής σημασίας καθώς μπορεί να αποκαλύψει πληροφορίες για τις δομές των ενεργών κέντρων των ενζύμων. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε

αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από ένα ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Ένας αντιστρεπτός αναστολέας μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα και όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά την δραστηριότητά του.. Όταν το ένζυμο βρίσκεται σε αναστολή εξακολουθεί να υπακούει την κινητική των Michaelis και Menten, με την διαφορά ότι για την  $K_M$  και για την  $V_{max}$  διαμορφώνονται νέες τιμές, οι οποίες ονομάζονται φαινομενικές και συμβολίζονται ως  $K_{M(app)}$  και για την  $V_{max(app)}$ . Όλα τα είδη αντιστρεπτών αναστολέων χαρακτηρίζονται από την σταθερά διαστάσεως του αναστολέα  $K_i$ , η οποία αφορά τη διάσταση του συμπλόκου EI (όπου E το ένζυμο και I ο αναστολέας) και επηρεάζει την  $K_M$  ή την  $V_{max}$  του ενζύμου. Οι φαινομενικές τιμές προσδιορίζονται ώστε τελικά να υπολογιστεί η σταθερά αναστολής  $K_i$  [44].

Διακρίνονται τρεις τύποι αντιστρεπτής αναστολής:

- **Συναγωνιστική αναστολή.** Σ' αυτού του τύπου την αναστολή το υπόστρωμα και ο αναστολέας ανταγωνίζονται για την πρόσδεση στο ίδιο κέντρο του ενζύμου. Η  $V_{max}$  παραμένει ανεπηρέαστη αλλά η  $K_{M(app)}$  αυξάνεται. Ο αναστολέας συγκρατεί μέρος του ενζύμου στην μορφή του συμπλόκου EI. Ο όρος συναγωνιστική αναστολή προκύπτει επειδή σε περίπτωση που η συγκέντρωση του υποστρώματος αυξηθεί σημαντικά, η ανασταλτική επίδραση στην ταχύτητα μπορεί να ξεπεραστεί. Διάφοροι συναγωνιστικοί αναστολείς έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την διασαφήνιση των ενζυμικών μηχανισμών κάνοντας χρήση ακτίνων X.
- **Μη συναγωνιστική αναστολή.** Σ' αυτού του τύπου την αναστολή η πρόσδεση του υποστρώματος στο ένζυμο δεν επηρεάζει την πρόσδεση του αναστολέα. Η  $K_M$  παραμένει σταθερή, ενώ η  $V_{max(app)}$  μειώνεται. Ο αναστολέας προκαλεί μετάπτωση του ενζύμου αλλά και του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος στις ανενεργές μορφές. Σε αντιδιαστολή με την συναγωνιστική αναστολή, η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, δεν οδηγεί σε άρση της ανασταλτικής επίδρασης του αναστολέα στην ταχύτητα.
- **Ανταγωνιστική αναστολή.** Υπάρχουν λίγες περιπτώσεις ανταγωνιστικής αναστολής σε αντιδράσεις ενός υποστρώματος, συνήθως τέτοιου τύπου αναστολή συναντάται σε ένζυμα που καταλύουν πολυ-υποστρωματικές αντιδράσεις. Ο αναστολέας σε αυτήν την περίπτωση επιδρά και στην  $K_M$  και στην  $V_{max}$  του ενζύμου [45].



**Εικόνα 1.21:** Το γενικό σχήμα της αναστολής των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Τα  $K_{ES}$ ,  $K_{EI}$ ,  $K_{ESI}$ , αποτελούν τις σταθερές διάστασης. Το ESI θεωρείται ανενεργό σύμπλοκο [41].

Όπως αναφέραμε, η εξίσωση των Michaelis και Menten που προκύπτει από την υπόθεση της σταθεροποιημένης κατάστασης είναι :

$$V = \frac{k_3 \times [E_0] \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

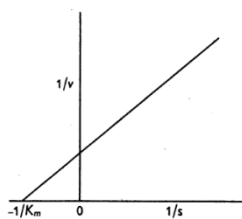
Από την ερμηνεία της παραπάνω εξίσωσης προκύπτει ότι η  $V$  θα τείνει στην μέγιστη τιμή της καθώς η συγκέντρωση του υποστρώματος,  $[S]$ , αυξάνεται. Η μέγιστη ταχύτητα ( $V_{max}$ ) θα παρατηρηθεί όταν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην μορφή του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (ES) και θα ισούται με  $k_3 \times [E_0]$ . Επομένως η παραπάνω εξίσωση μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$\frac{1}{V_{max}} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

Όταν  $V = \frac{V_{max}}{2}$  τότε  $[S] = K_M$ . Επομένως η  $K_M$  αντιστοιχεί στην συγκέντρωση εκείνη του υποστρώματος που επιτρέπει την καταλυτική αντίδραση να «προχωρά» με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας. Η σταθερά Michaelis-Menten υπολογίζεται συνήθως με τη μέθοδο των Lineweaver-Burk, που είναι γνωστή και σαν μέθοδος του διπλού αντιστρόφου. Απαραίτητη είναι η προσεκτική επιλογή των τιμών των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων  $[S]$ , ώστε οι αντίστοιχες αντίστροφες τιμές να είναι ομοιόμορφα κατανομημένες στον άξονα των τετμημένων. Η εξίσωση των Lineweaver-Burk προκύπτει παίρνοντας το ανάστροφο κλάσμα και των δύο μερών της εξίσωσης (2). Οπότε έχουμε:

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

Έτσι ένα διάγραμμα του  $\frac{1}{v}$  ως προς  $\frac{1}{[S]}$  μας δίνει μια ευθεία γραμμή με κλίση  $\frac{K_M}{V_{max}}$ . Το σημείο όπου η ευθεία τέμνει τον άξονα των τετμημένων ισούται με  $\frac{-1}{K_M}$  και το σημείο όπου η ευθεία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων ισούται με  $\frac{1}{V_{max}}$ . Η μέγιστη ταχύτητα εξαρτάται από την συγκέντρωση του ενζύμου και δεν αποτελεί σταθερά όπως η  $K_M$  [46].



Εικόνα 1.22: Διάγραμμα  $\frac{1}{v}$  προς  $\frac{1}{[S]}$ . Προσδιορισμός της  $K_M$  [43].

Η σταθερά αναστολής  $K_i$ , δηλαδή η σταθερά ισορροπίας μεταξύ του ενζύμου και ενός συναγωνιστικού αναστολέα που συνδέεται με αντιστρεπτό τρόπο, υπολογίζεται συνήθως με βασιζόμενοι στις εξίσωση των Michaelis-Menten για ένα συναγωνιστικό σύστημα:

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_M \times \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) + [S]} \quad (A)$$

Όπου  $[i]$  η συγκέντρωση του αναστολέα

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Αντιδραστήρια

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Πυκνό διάλυμα αμμωνιάς	Fluka
Acetic acid (CH <sub>3</sub> COOH)	Sds
α-D-Glucose 1-Phosphate Dipotassium Salt hydrate	Sigma
Acrylamide	Serva
Activated Charcoal	Sigma
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma
Adenosine Triphosphate (ATP)	Sigma
Ammonium Molybdate	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Ammonium sulfate	Chemlab
BES	Sigma
Bis acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay 5x	Biorad
Bromophenole blue	Research Organics
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycerol	Appllichem
Glycine (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Appllichem
Imidazole 99%	Sigma
Inosine Monophosphate (IMP)	Sigma
KHCO <sub>3</sub>	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
Magnesium acetate tetrahydrate (CH <sub>3</sub> COOH) <sub>2</sub> Mg	Appllichem
Methanol	
NaCl	Scharleu
NaOH	Merck
Potassium chloride (KCl)	Merck
SDS	Serva
Sodium carbonate anhydrous	Sds
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Spermine	Sigma
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra Pure	Appllichem
Zinc acetate	Sigma



$\alpha$ -D-glucose-1-Phosphate	Sigma
$\beta$ -GP	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma

## 2.2 Οργανολογία

ΟΡΓΑΝΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Πεχάμετρο	Metrohm
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρηση (mini gel)	BioRad
Σύστημα απεικόνισης	Protein Simple
Υδατόλουτρο, WiseBath	Wisd
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.45 $\mu$ M	Sartorius Stedim
Φυγόκεντρος - Z36HK	Hermle
Φωτόμετρο	VWR

## 2.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Ηλεκτροφόρηση καλείται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο με καθαρό φορτίο μπορεί να μετακινηθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή, διότι η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει το διαχωρισμό. Τα μικρά μόρια μετακινούνται εύκολα διαμέσου των πόρων της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Το σημείο “κλειδί” της ηλεκτροφόρησης είναι το πήκτωμα. Αυτό καθορίζει κυρίως την ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εκτός από το φορτίο τους και τις σταθεροποιεί στη συγκεκριμένη θέση μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ώστε να οπτικοποιηθεί στη συνέχεια με χρώση του πηκτώματος. Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται κυρίως πολυακρυλαμίδη αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η αгарόζη για πρωτεΐνες με μέγεθος μεγαλύτερο από 500 kDa. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται διότι μπορούμε να καθορίσουμε το μέγεθος των πόρων, για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, και καθορίζεται επίσης από τις συνθήκες πολυμερισμού αλλάζοντας τη συγκέντρωση του μονομερούς, η αντίδραση πολυμερισμού είναι εύκολη, τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου είναι υδρόφιλα και ηλεκτρικά ουδέτερα τη στιγμή που παρασκευάζονται. Το πήκτωμα σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμιδίου και N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μακρών αλυσίδων ακρυλαμιδίου που συνδέονται με εγκάρσιες γέφυρες μορίων δισ-ακρυλαμιδίου, δημιουργώντας πηκτώματα με μέγεθος πόρων που εξαρτώνται από την αναλογία των δύο μορίων αλλά και από την ολική συγκέντρωσή. Έτσι αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου, οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των πόρων και το αντίστροφο. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί τελικά, εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε.

Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μίας ουσίας που παρέχει ελεύθερες ρίζες (απαρχητής) όπως π.χ. το υπερθειικό αμμώνιο (APS), και ενός καταλύτη, όπως είναι η N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού και έτσι η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να γίνεται απουσία O<sub>2</sub>, αφού αυτό μπορεί να δεσμεύει της ελεύθερες ρίζες και ως εκ τούτου να σταματήσει τη δημιουργία της πηκτής.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή μάζα τους. Στο μίγμα των πρωτεϊνών προστίθεται SDS (δωδεκάκυκλο-θειικό νάτριο) το οποίο συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Σε ένα εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο οι πρωτεΐνες, οι οποίες είναι πια αρνητικά φορτισμένες λόγω και του SDS, κινούνται προς την άνοδο με διαφορετικούς ρυθμούς ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Το σύστημα αποτελείται από το πήκτωμα επιστοίβαξης που έχει pH 6.8 (Tris-HCl, pH 6.8) το πήκτωμα διαχωρισμού με pH 8.8 (Tris HCl pH 8.8) και το διάλυμα ηλεκτροφόρησης με pH 8.3 (Tris-Glycine).

Τέλος έχουμε χρώση της πηκτής: Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε 10 % v/v διάλυμα οξικού οξέος μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 λεπτό. Απορρίπτουμε το οξικό και προστίθεται 0.1 % Coomassie Blue R250, 10 % οξικό οξύ και 50 % μεθανόλη. Τότε, τοποθετούμε και πάλι την πηκτή στο φούρνο μικροκυμάτων για μικρό χρόνο και αφήνεται να αναδευτεί για 10 λεπτά. Μετά το πέρας των 10 λεπτών αποχύνεται η χρωστική και προστίθεται ξανά διάλυμα οξικού οξέος 10 % v/v. Ακολουθεί ξανά βράσιμο σε φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό και το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται. Τέλος, το πήκτωμα μένει με διάλυμα οξικού οξέος 10 % v/v έως ότου αποχρωματιστεί εντελώς.

#### **2.4 Απομόνωση της GP από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGPb)**

Η απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έγινε από σκελετικούς μύες κονίκλων με την μέθοδο των Fischer και Krebs χρησιμοποιώντας β-μερκαπτοαιθανόλη έναντι L-κυστεΐνης σε όλα τα στάδια της πορείας του καθαρισμού.

**Βήμα 1<sup>ο</sup> :** *Παραλαβή του μυϊκού ιστού και κατεργασία για την εκχύλιση του ενζύμου.*

Ο μυϊκός ιστός παραλαμβάνεται από τρεις αρσενικούς κονίκλους, συγκεκριμένα από τα πίσω πόδια καθώς και από τους ραχιαίους μυς κοντά στην σπονδυλική στήλη, και τοποθετείται σε πάγο έως ότου ολοκληρωθεί η διαδικασία αφαίρεσης του. Στη συνέχεια ο μυϊκός ιστός ομογενοποιείται μηχανικά, ζυγίζεται, και επανατοποθετείται σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η άλεση όλου του ιστού. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν τρεις εκχυλίσεις, εν ψυχρώ, με απιονισμένο ύδωρ όπως περιγράφεται παρακάτω.

Εκχύλιση 1η (10 min)

Ο ομογενοποιημένος ιστός εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας ίσο όγκο απιονισμένου ύδατος για 8 min, ύστερα διηθήθηκε μέσω διπλής γάζας και το εκχύλισμα συλλέχθηκε εν ψυχρώ.

Εκχύλιση 2η (10 min)

Χρησιμοποιήθηκε το προϊόν της 1η εκχύλισης και ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος για 8 min. Ακολούθησε διήθηση μέσω διπλής γάζας και το εκχύλισμα συλλέχθηκε εν ψυχρώ.

Εκχύλιση 3η (10 min)

Χρησιμοποιήθηκε το προϊόν της 2η εκχύλισης και μισός όγκος απιονισμένου ύδατος για 8 min. Ύστερα διηθήθηκε κατά παρόμοιο τρόπο μέσω διπλής γάζας και το εκχύλισμα συλλέχθηκε εν ψυχρώ.

Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν ξεπέρασε τα 30 min, όπως και προβλέπεται. Το τελικό εκχύλισμα που συλλέχθηκε διηθήθηκε μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

**Βήμα 2<sup>ο</sup>** : *Οξίνη καταβύθιση για την κατακρήμνιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών*

Το pH του διαλύματος που παραλήφθηκε από το βήμα 1<sup>ο</sup> ρυθμίστηκε στο 5.1-5.2, με την προσθήκη διαλύματος CH<sub>3</sub>COOH 1 N, υπό ελαφρά ανάδευση. Προτού γίνει η ρύθμιση του pH συλλέχθηκε το **δείγμα 1** από το πρωτεϊνικό διάλυμα. Έπειτα το εκχύλισμα αφέθηκε για 5 min σε πάγο. Σε αυτό το στάδιο η θολερότητα του διαλύματος αυξήθηκε λόγω κατακρήμνισης πρωτεϊνών. Το εκχύλισμα τοποθετήθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρησης ισοζυγίστηκε και τοποθετείται στη φυγόκεντρο στις 5000 rpm, για 30 min σε θερμοκρασία 0-4° C όπου και απομακρύνονται οι εν λόγω πρωτεΐνες.

Το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω αντλίας κενού Buchner, εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Η συσκευή διήθησης αποτελείται από χωνί Buchner, κωνική φιάλη δύο λίτρων ή οποία πρέπει να βρίσκεται μέσα σε μία λεκάνη με πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της διήθησης, λαστιχάκι συνδεδεμένο με την αντλία κενού και χάρτινα φίλτρα διαμέτρου 18.5 cm. Η διαδικασία ξεκινά με την τοποθέτηση δύο χάρτινων φίλτρων στο χωνί Buchner και τη δημιουργία κενού με την λειτουργία της αντλίας κενού. Σταδιακά μικροί όγκοι εκχύνονται από τα δοχεία της φυγοκέντρου στο χωνί Buchner. Τα χάρτινα φίλτρα αλλάζουν μετά την απόχυση του περιεχομένου δύο δοχείων της φυγοκέντρου στο χωνί Buchner. Κατά την ολοκλήρωση της διήθησης του συνολικού όγκου του υπερκείμενου, αφαιρείται πρώτα το λάστιχο που συνδέει την κωνική φιάλη με την αντλία κενού ώστε να αποφευχθεί αναρρόφηση και ο συνολικός όγκος μετρήθηκε με ογκομετρικό κύλινδρο και υπολογίστηκε ίσος με 4910 mL, στο σημείο αυτό συλλέχθηκε το **δείγμα 2**. Έπειτα, ακολούθησε ρύθμιση του pH του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος στο 6.8 (ισοηλεκτρικό σημείο της φωσφορύλασης του γλυκογόνου) με κεκορεσμένο διάλυμα KHCO<sub>3</sub>.

### **Βήμα 3<sup>ο</sup>: Καταβύθιση του ενζύμου με θειικό αμμώνιο**

Το pH του διαλύματος του θειικού αμμωνίου (90% w/v) ρυθμίστηκε σε 6.8 στον απαγωγό με την προσθήκη πυκνής αμμωνίας (NH<sub>4</sub>OH). Ο έλεγχος του pH γίνεται με πεχαμετρικό χαρτί. Ο απαιτούμενος όγκος θειικού αμμωνίου που προστίθενται είναι ίσος με 0.837 για κάθε λίτρο διαλύματος. Ο συνολικός όγκος του διαλύματος υπολογίζεται ίσος με : 4910 mL + 78 mL (KHCO<sub>3</sub>) = 4.988 mL, επομένως ο όγκος του θειικού αμμωνίου που προστέθηκε : 0.837 × 4.988 ml = 4175 ml. Το διάλυμα του θειικού αμμωνίου προστέθηκε στο πρωτεϊνικό διάλυμα αργά και με συνεχή ανάδευση και το μίγμα αφέθηκε στον ψυκτικό θάλαμο για 24 ώρες.

Αρχικά παρασκευάστηκαν μεμβράνες διαπίδυσης. Κόψαμε τη μεμβράνη στο επιθυμητό μήκος και ζυγίσαμε 25 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 9.305 g EDTA για την προετοιμασία 500 mL διαλύματος. Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετήθηκαν στο διάλυμα και αφέθηκαν να βράσουν για 15 min. Στην συνέχεια τα σακουλάκια διαπίδυσης ξεπλύθηκαν πολύ καλά με απιονισμένο ύδωρ και τοποθετήθηκαν σε απιονισμένο ύδωρ και αφέθηκαν να βράσουν για 15 min. Έπειτα τα σακουλάκια διαπίδυσης ξεπλύθηκαν πολύ καλά με απιονισμένο ύδωρ και αποθηκεύτηκαν σε καθαρή αιθανόλη σε θερμοκρασία 4 °C.

Την επόμενη ημέρα και αφού ολοκληρώθηκε η καταβύθιση με θειικό αμμώνιο σχηματίστηκαν 2 φάσεις: υπερκείμενο-ίζημα. Η πρωτεΐνη βρίσκεται στο ίζημα και γι' αυτό ο μεγαλύτερος όγκος του υπερκείμενου αποχύθηκε με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C στις 5.110 rcf επί 40 min. Ακολούθως, το υπερκείμενο διάλυμα αποχύθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου. Το διαλυτοποιημένο ένζυμο τοποθετήθηκε σε σακουλάκια διαπίδυσης τα οποία εμβαπτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001 M, pH 7.5 στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα. Πριν τοποθετηθεί το διαλυτοποιημένο ένζυμο στα σακουλάκια διαπίδυσης συλλέχθηκε το **δείγμα 3**

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

Μετά τη διαπίδυση το πρωτεϊνικό διάλυμα συλλέχθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο και έλαβε χώρα η διαύγαση του με φυγοκέντρηση στις 17000 rpm για 15 min στους 0 – 4 °C). Στην συνέχεια ογκομετρήθηκε το υπερκείμενο υγρό, και συλλέχθηκε το **δείγμα 4** και ακολούθησε η προσθήκη των εξής διαλυμάτων:

- ο Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M, pH 7 όγκου ίσου με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος.
- ο EDTA 0.1 M, pH 7 όγκου ίσου με 5x10<sup>-3</sup> του πρωτεϊνικού διαλύματος μετά την προσθήκη της β-μερκαπτοαιθανόλης
- ο Διάλυμα Tris 2 M ώστε να γίνει ρύθμιση του pH του πρωτεϊνικού διαλύματος στο 8.8. Η προσθήκη γίνεται αργά και υπό ανάδευση και το pH μετράται με πεχάμετρο.

Εν συνεχεία το μίγμα επωάστηκε σε θερμοκρασία 37 °C για 1h με ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα και ακολούθως αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και το pH ρυθμίστηκε, με τη χρήση διαλύματος CH<sub>3</sub>COOH 1 N, σε τιμή 7 και κρατήθηκε **δείγμα 5**. Έπειτα έλαβε χώρα διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση στις 17000 rpm επί 10-15 min σε θερμοκρασία 25-30 °C με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

#### **Βήμα 5<sup>ο</sup>** : Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β

Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης ογκομετρήθηκε το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα και ο όγκος του υπολογίστηκε ίσος με 103.2 ml και συλλέχθηκε το **δείγμα 6**. Η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1 mL AMP 0.1 M pH 7 και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 1M pH 7.0 ανά 100 ml υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης όπου και είχε τοποθετηθεί το διάλυμα. Τέλος οι σωλήνες φυγοκέντρησης ισοζυγίστηκαν και αφέθηκαν σε πάγο σε θερμοκρασία 4°C για 16h για να κρυσταλλωθεί το ένζυμο (οι κρύσταλλοι αρχίζουν να εμφανίζονται σε 1-2 ώρες).

Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης στις 28.710 rcf σε θερμοκρασία 0 – 4 °C επί 10 min. Ακολούθησε διαλυτοποίηση του κρυσταλλικού ιζήματος, στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 (50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 50 mM β-φωσφορική γλυκερόλη και 1 mM EDTA) pH 6.8 σε θερμοκρασία 37 °C, εντός του υδατόλουτρου. Έπειτα έλαβε χώρα διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση, στις 28.710 rcf σε θερμοκρασία 25-30 °C επί 10 min, απ' όπου συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό το οποίο και ογκομετρήθηκε, στα 105 mL. Ακολούθησε η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP 0.1 M, pH 7 και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg, pH 7.0 όπως ακριβώς έγινε στην κρυστάλλωση, που περιγράφηκε παραπάνω. Στο σημείο αυτό συλλέχθηκε το **δείγμα 7**.

Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε μικρά δοχεία φυγοκέντρησης, ισοζυγίστηκε και αφέθηκε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 ώρες.

Η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης που περιγράφεται παραπάνω (1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση), επαναλήφθηκε ακριβώς με ίδιο τρόπο ύστερα από 3-4 ώρες και έτσι έλαβε χώρα η 2η ανακρυστάλλωση. Αυτήν την φορά ο όγκος που συλλέχθηκε ογκομετρήθηκε ίσος με 61 mL οπότε ακολούθησε η προσθήκη AMP 0.1 M, pH 7.0 και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg, pH 7.0, όγκου 0.61 mL το καθένα. Στο σημείο αυτό συλλέχθηκε το **δείγμα 8<sup>ο</sup>**, και το μίγμα αφέθηκε για 16h στον ψυκτικό θάλαμο.

Η διαδικασία της ανακρυστάλλωσης (1η ανακρυστάλλωση) επαναλήφθηκε για ακόμη δύο φορές. Το υπερκείμενο υγρό ογκομετρήθηκε, όγκος του υπολογίστηκε ίσος με 28 ml. Στο σημείο αυτό συλλέχθηκε το **δείγμα 9** το διάλυμα τοποθετήθηκε σε μικρά δοχεία φυγοκέντρησης, ισοζυγίστηκε και τέλος αφέθηκε στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 h. Έτσι συνολικά έλαβαν χώρα τέσσερις ανακρυσταλλώσεις, συνυπολογίζοντας και τις προαναφερθείσες. Ακολούθησαν άλλες δυο ανακρυσταλλώσεις χωρίς την προσθήκη AMP και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg (**δείγματα 10 και 11**).

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

Οι κρύσταλλοι της rmGPb αφού συλλέχθηκαν μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση, διαλυτοποιήθηκαν με επώαση σε θερμοκρασία 37° C με την προσθήκη του ελάχιστου δυνατού όγκου ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 pH 6.8. Ο τελικός όγκος του ενζυμικού διαλύματος ήταν 7.8 ml και η ενζυμική συγκέντρωση προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά, ως εξής:

5 μL ενζυμικού δείγματος προστέθηκαν σε 1300 μL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 και ακολούθησε φασματοφωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm. Η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίστηκε από τη σχέση:

$$[\text{GPb}], \text{ mg/mL} = \frac{\text{OD}_{280}}{1.32} \times \frac{1305}{5} = \frac{0.707}{1.32} \times \frac{1305}{5} = 139.8 \text{ mg/ml} \times 7.8 \text{ ml} = 1.09 \text{ g}$$

Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ( $\epsilon$ ) για την rmGPb ισούται με  $1.32 \frac{\text{ml}}{\text{mg} \times \text{cm}}$

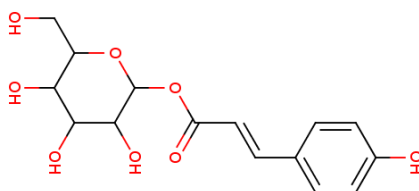
Το ενζυμικό διάλυμα ογκομετρήθηκε και προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης. Τέλος το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύτηκε στους -20° C (50 % v/v γλυκερόλη).

## 2.5 Κινητικές μελέτες έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP)

Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι αμφίδρομη. Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων, στο πειραματικό μέρος, μελετήσαμε *in vitro* την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, δηλαδή την προσθήκη μορίων 1- φωσφορικής γλυκόζης (G1P) στο γλυκογόνο με ταυτόχρονη απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων (Pi) από την G1P, τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν φασματοφωτομετρικά.

Γλυκογόνο ( $n$  κατάλοιπα γλυκόζης) + Pi  $\rightleftharpoons$  Γλυκογόνο ( $n-1$  κατάλοιπα γλυκόζης) + 1-φωσφορική γλυκόζη

Στην παρούσα εργασία οι κινητικές μελέτες έγιναν έναντι της rmGPb. Η ένωση που μελετήθηκε για την πιθανή ανασταλτική της δράση είναι η φυσική ένωση *p*- coumaroyl glucose (εικόνα 2.26) που αποτελεί ανάλογο γλυκόζης και η σύνθεση της έγινε από το εργαστήριο του καθηγητή Somsák László στο Πανεπιστήμιο της Ουγγαρίας, που εδρεύει στην πόλη Ντέμπρετσεν, στο τμήμα Οργανικής Χημείας.



Εικόνα 2.23 .: Η χημική δομή της *p*-coumaroyl glucose

### 2.5.1 Φωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου

Ο προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων αποτελεί μια μέθοδο η οποία χρησιμοποιείται κατά κόρον στην βιοχημεία κατά τον προσδιορισμό δραστηκότητας

ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Όσων αφορά την αντίδραση όπου συμμετέχει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η απελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου. Η μέθοδος για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων βασίζεται στον φωτομετρικό προσδιορισμό των φωσφορικών ιόντων, με τη δημιουργία χρωμοφόρου συμπλόκου ένωσης.

Την μέρα που έλαβε χώρα το πείραμα παρασκευάστηκαν φρέσκα τα ακόλουθα διαλύματα :

ο Μίγμα διαλύματος μολυβδαινικού (15 mM) και οξικού ψευδάργυρου (100 mM), σε pH 5.0, η ρύθμιση του pH έγινε με πυκνό HCl. Το διάλυμα φυλάχθηκε σε σκουρόχρωμο δοχείο, μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία και σε θερμοκρασία δωματίου.

ο Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10 % (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH έγινε με πυκνό NaOH. Η αποθήκευση του διαλύματος έγινε κατά παρόμοιο τρόπο με το προηγούμενο μίγμα.

Ακολούθησε ανάμειξη των παραπάνω διαλυμάτων με αναλογία όγκου **4** αντιδραστήριου μολυβδαινικού και οξικού ψευδάργυρου : **1** αντιδραστήριου ασκορβικού οξέος. Το νέο διάλυμα, το οποίο και ονομάζεται διάλυμα φωτομέτρησης, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία, για 15 λεπτά από την παρασκευή του, ώστε να σχηματιστεί η ένωση με κίτρινο χρώμα. Στη συνέχεια προστέθηκε στα δείγματα που λάβαμε από το κινητικό πείραμα 700  $\mu$ L του διαλύματος φωτομέτρησης και ακολούθως αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία 30 ° C για 15 min στο υδατόλουτρο. Το ορθοφωσφορικό ιόν σχηματίζει σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου ( $Zn^{2+}$ ) το οποίο ανάγεται από το ασκορβικό οξύ και παράγεται ένα χρωμοφόρο με πράσινο χρώμα με μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. Για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε την ποσότητα των ορθοφωσφορικών ανιόντων σε ένα δείγμα, παρασκευάστηκε ένα δείγμα αναφοράς ορθοφωσφορικών ανιόντων, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο (τυφλό) για τον υπολογισμό της ποσότητας των ορθοφωσφορικών ανιόντων στο άγνωστο δείγμα.

### 2.5.2 Ενζυμικό διάλυμα

Το ένζυμο φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20° C σε διάλυμα που περιέχει 50% γλυκερόλη και 50:50:1 ρυθμιστικού διαλύματος όπως αναλύεται σε προηγούμενο εδάφιο. Αρχικά παρασκευάσαμε μια αραιώση από το πυκνό ένζυμο προσθέτοντας 2  $\mu$ L από το πυκνό ένζυμο σε 1 mL διαλύματος 50:50:1 και υπολογίσαμε τη συγκέντρωση φασματοφωτομετρικά (0.387 mg/ml), όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Για την παρασκευή ενζυμικού διαλύματος λάβαμε τις ακόλουθες ποσότητες, όπως αναγράφονται στον **Πίνακα 1** που ακολουθεί, ώστε στον όγκο της αντίδρασης που ήταν 180  $\mu$ L να είχαμε 3  $\mu$ g/mL rmGPb και 0.2 % w/v γλυκογόνο. Τέλος προστέθηκε το νερό με τον τελικό όγκο του ενζυμικού διαλύματος να φτάνει στα 240  $\mu$ L.

Ποσότητα που λάβαμε	Τελικές συγκεντρώσεις
24 $\mu\text{L}$ Glycogen 10%	Glycogen 1%
12 $\mu\text{L}$ ρυθ.δ/μα 50:50:1, pH 6.8	Ρυθ. δ/μα 2.5:2.5:0.05
9.3 $\mu\text{L}$ rmGPb 0.387 mg/ml	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GPb
dH <sub>2</sub> O 194.7 $\mu\text{L}$	
V <sub>τελ</sub> = 240 $\mu\text{L}$	

Ακολούθως, αφήσαμε το ενζυμικό διάλυμα σε θερμοκρασία 30° C στο υδατόλουτρο για 15 min με σκοπό να επιτύχουμε την σύνδεση του ενζύμου με το γλυκογόνο.

### 2.5.3 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε αποσκοπούσε στην μελέτη της αντίστροφης πορείας της αντίδρασης που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, δηλαδή την προσθήκη μορίων G1P στο μόριο του γλυκογόνου. Επομένως, το υπόστρωμα στις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν ήταν η  $\alpha$ -D-1-φωσφορική γλυκόζη. Οι διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος που μελετήσαμε βρίσκονταν διαλυμένες σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 2 και προέκυψαν ύστερα από τις αραιώσεις που πραγματοποιήσαμε, από ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 1, όπως παρατίθενται παρακάτω στον **Πίνακα 2**:

ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 1	ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 2
400 mM KCl	270 mM KCl
200 mM imidazole	135 mM Imidazole
4 mM DTT	2.7 mM DTT
4 mM EDTA	2.7 mM EDTA

Αρχικά, παρασκευάσαμε ένα πυκνό υδατικό διάλυμα G1P με συγκέντρωση 400 mM και ρυθμίσαμε το pH του στο 6.8. Ακολούθως το χωρίσαμε σε κλάσματα των 500  $\mu\text{L}$  και το αποθηκεύσαμε σε θερμοκρασία -20°C. Από τα 400 mM παρασκευάσαμε G1P με συγκέντρωση 90 mM λαμβάνοντας τις ποσότητες που αναγράφονται στον **Πίνακα 3**:

Ποσότητα που λάβαμε	Τελικές συγκεντρώσεις
225 $\mu\text{L}$ G1P 400mM	90 mM G1P
675 $\mu\text{L}$ ρυθ. δ/μα αραιώσης 1, pH 6.8	Ρυθ. δ/μα αραιώσης 2
100 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O	
V <sub>τελ</sub> : 1000 $\mu\text{L}$	

Οι υπόλοιπες αραιώσεις G1P που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα παρασκευάστηκαν με αραιώση από την G1P 90 mM χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2 όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4**:



Αρχικές συγκεντρώσεις: όγκοι	Τελικές συγκεντρώσεις	[G1P] στην αντίδραση
- G1P 90 mM: 2000 $\mu$ L -Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2: 2000 $\mu$ L	G1P 45 mM Vτελ= 4000 $\mu$ L	10 mM
-G1P 90 mM: 1200 $\mu$ L -Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2: 2800 $\mu$ L	G1P 27 mM Vτελ= 4000 $\mu$ L	6 mM
-G1P 90 mM: 800 $\mu$ L -Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2: 3200 $\mu$ L	G1P 18 mM Vτελ= 4000 $\mu$ L	4 mM
-G1P 90 mM: 600 $\mu$ L -Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2: 3400 $\mu$ L	G1P 13.5 mM Vτελ= 4000 $\mu$ L	3 mM
-G1P 90 mM: 400 $\mu$ L -Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2: 3600 $\mu$ L	G1P 9 mM Vτελ= 4000 $\mu$ L	2 mM

Η rmGPb είναι κυρίως ανενεργή και βρίσκεται στην T-διαμόρφωση με αποτέλεσμα να απαιτεί την παρουσία κάποιου αλλοστερικού ενεργοποιητή, όπως η AMP, για να λάβει χώρα η αλλοστερική μετάπτωση από την T- διαμόρφωση στην R- διαμόρφωση οδηγώντας το ένζυμο σε ενεργοποίηση.

Ο αναστολέας διαλύθηκε σε κατάλληλο όγκο DMSO ώστε η συγκέντρωσή τους να είναι 100 mM. Στην συνέχεια έλαβαν χώρα διαδοχικές αραιώσεις και η συγκέντρωση του DMSO μειώθηκε στο 50% v/v ώστε στην αντίδραση (180  $\mu$ L) τελικά να έχουμε 2 % v/v DMSO.

Για τον προσδιορισμό των σταθερών  $K_M$  και  $K_{M(app)}$  χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (2, 3, 4, 6, και 10 mM G1P). Όσων αφορά τον υπολογισμό της  $K_M$  στο διάλυμα των υποστρωμάτων προστέθηκε 2 % v/v DMSO, όπως αναλύεται παρακάτω, ενώ για τον προσδιορισμό της  $K_{M(app)}$  το πείραμα πραγματοποιήθηκε παρουσία μίας σταθερής συγκέντρωσης αναστολέα. Για τον προσδιορισμό της  $K_i$  χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 50  $\mu$ M και 75  $\mu$ M, όπως φαίνεται στον παρακάτω **πίνακα 5**. Τα διαλύματα των υποστρωμάτων τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για περίπου 5 min, λαμβάνοντας υπ' όψη και τον χρόνο επώασης του ενζυμικού διαλύματος, ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ένζυμο.

	0 $\mu$ M	10 $\mu$ M	25 $\mu$ M	40 $\mu$ M	50 $\mu$ M	75 $\mu$ M
G1P	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L	40 $\mu$ L
AMP 25 mM	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L	7.2 $\mu$ L
DMSO/ Αναστολέας	7.2 $\mu$ L (50% DMSO)	7.2 $\mu$ L (0.025 mM)	7.2 $\mu$ L (0.625 mM)	7.2 $\mu$ L (1 mM)	7.2 $\mu$ L (1.25 mM)	7.2 $\mu$ L (1.875 mM)
dH <sub>2</sub> O	89.6 $\mu$ L	89.6 $\mu$ L	89.6 $\mu$ L	89.6 $\mu$ L	89.6 $\mu$ L	89.6 $\mu$ L
Vτελ	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L	144 $\mu$ L

Η AMP προστίθεται σε κορεσμό (1mM) ώστε όλο το ένζυμο να βρίσκεται στην ενεργή R-διαμόρφωση.

### Πορεία προσδιορισμού κινητικών παραμέτρων

Λαμβάνουμε 36  $\mu\text{L}$  από το ενζυμικό μας διάλυμα και προστίθενται στο πρώτο διάλυμα των υποστρωμάτων. Αυτή η χρονική στιγμή ορίζεται ως  $t=0$ , και ξεκινάει η ενζυμική αντίδραση η οποία εξελίχθηκε σε όγκο αντίδρασης 180  $\mu\text{L}$ . Οι συγκεντρώσεις της G1P είναι 2, 3, 4, 6 και 10 mM. Συνεχίζουμε το πείραμα παίρνοντας 40  $\mu\text{L}$  από το μίγμα της αντίδρασης ανά 5 min τοποθετώντας τα σε 10  $\mu\text{L}$  SDS 1 % w/v και κάνοντας έντονη ανάδευση με αποτέλεσμα τον τερματισμό της αντίδρασης. Στο τέλος της διαδικασίας τοποθετήσαμε τα δείγματα σε θερμοκρασία 4 °C.

Για τον προσδιορισμό της  $K_i$  ακολουθήσαμε την ίδια πορεία κρατώντας σταθερή μια συγκέντρωση αναστολέα κάθε φορά. Στη συνέχεια, παρασκευάσαμε διαλύματα τα οποία είχαν ρόλο “τυφλού μάρτυρα” και περιείχαν μόνο την ένωση για την οποία θέλαμε να μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση. Έτσι, παρασκευάσαμε τα παρακάτω διαλύματα (Πίνακας 6) εις διπλούν τα οποία περιείχαν όλα 10  $\mu\text{L}$  SDS 1 % (w/v):

Τυφλό $\text{H}_2\text{O}$	40 $\mu\text{L}$ d $\text{H}_2\text{O}$
Τυφλό ενζυμικού διαλύματος	32 $\mu\text{L}$ d $\text{H}_2\text{O}$ + 8 $\mu\text{L}$ ενζυμικού διαλύματος
Τυφλό G1P	31.1 $\mu\text{L}$ d $\text{H}_2\text{O}$ + 8.9 $\mu\text{L}$ G1P 45 mM
Τυφλό φωσφορικών	30 $\mu\text{L}$ d $\text{H}_2\text{O}$ + 10 $\mu\text{L}$ Pi 1 mM

Μετά το πέρας της διαδικασίας παρασκευάσαμε το διάλυμα φωτομέτρησης, όπως περιγράφεται παραπάνω. Μετά τα 15 min επώασης του διαλύματος φωτομέτρησης, προσθέσαμε σε κάθε δείγμα, αλλά και στα τυφλά, 700  $\mu\text{L}$  διαλύματος φωτομέτρησης. Αφού αναδεύσαμε, τα τοποθετήσαμε στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15 min ώστε να δημιουργηθεί το χρωμοφόρο σύμπλοκο.

Τέλος μετρήσαμε τις απορροφήσεις σε μήκος κύματος 850 nm αφού πρώτα μηδενίσαμε με το τυφλό του d $\text{H}_2\text{O}$ .

#### 2.5.4 Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων ( $K_M$ ,  $V_{\max}$ ,  $K_i$ ) έπρεπε αρχικά να προσδιορίσουμε την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήσαμε. Η ειδική δραστηριότητα ορίζεται ως τα  $\mu\text{mol}$  υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε mg πρωτεΐνης, δηλαδή  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . Για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας αρχικά υπολογίσαμε τα  $\mu\text{mol}$  φωσφορικών που παρήχθησαν από την αντίδραση. Για το λόγο αυτό είχαμε παρασκευάσει ένα πρότυπο διάλυμα φωσφορικών το οποίο είχε συγκέντρωση 0.25 mM. Τα 0.25 mM ορθοφωσφορικών ιόντων αντιστοιχούσαν σε 0.01  $\mu\text{mol}$  ορθοφωσφορικών ιόντων, διότι:

$$0.25 \text{ mM} = 0.25 \text{ mmol/L} = 0.25 \text{ } \mu\text{mol/mL}$$

Σύμφωνα με τον παραπάνω λόγο στα 1000  $\mu\text{L}$  περιέχονταν 0.25  $\mu\text{mol}$  ορθοφωσφορικών ιόντων. Επομένως, στα 40  $\mu\text{L}$  που ήταν ο όγκος του τυφλού των ορθοφωσφορικών ιόντων που φωτομετρήσαμε είχαμε 0.01  $\mu\text{mol}$  ορθοφωσφορικών ιόντων. Ακολουθώντας ορίσαμε A την απορρόφηση του τυφλού δείγματος ορθοφωσφορικών ιόντων πράγμα που σημαίνει ότι αυτή η απορρόφηση δηλώνει την παρουσία 0.01  $\mu\text{mol}$  ορθοφωσφορικών ιόντων.

Η ποσότητα των ορθοφωσφορικών ιόντων (σε  $\mu\text{mol}$ ) για κάθε δείγμα υπολογίστηκε αφού αφαιρέθηκαν οι οπτικές απορροφήσεις που προέρχονται από το ενζυμικό διάλυμα και την G1P σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$(B - Abs_{\text{τυφλού ενζυμικού διαλύματος}} - Abs_{\text{τυφλού G1P}}) = Abs_{\text{φωσφορικών του δείγματος}} = C$$

Όπου, B η απορρόφηση που έδωσε μια μέτρηση ενός δείγματος

Εφόσον γνωρίζουμε ότι τα 0.01  $\mu\text{mol}$  έδωσαν απορρόφηση A, τότε τα  $\mu\text{mol}$  των ορθοφωσφορικών ιόντων στο δείγμα ισούταν με:

$$\frac{B}{A \cdot 100} = \mu\text{mol φωσφορικών στο άγνωστο δείγμα}$$

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

$$\text{Όπου, } limit = 0.78 \cdot [G1P] \cdot assay \text{ volum}$$

0.78 είναι το επί τοις εκατό ποσοστό (78 %) της G1P που έχει καταναλωθεί για παραγωγή ορθοφωσφορικών ιόντων την στιγμή όπου η αντίδραση φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας.

Όπου, [G1P] η συγκέντρωση της G1P στην αντίδραση,

Assay volume ο όγκος που λάβαμε για να σταματήσουμε την αντίδραση (40  $\mu\text{L}$ ) και

$$f = \frac{limit}{assay \text{ volume} \times C}. \text{ Όπου } C, \text{ η συγκέντρωση του ενζύμου στον όγκο της αντίδρασης.}$$

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ) και των φαινομενικών σταθερών Michaelis-Menten ( $K_{M(app)}$ ) με τις τελευταίες να οφείλονται στην παρουσία του αναστολέα χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση :

$$u = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}, \text{ όπου:}$$

υ: η ταχύτητα

$V_{max}$  η μέγιστη ταχύτητα

[S]: συγκέντρωση υποστρώματος και

$K_M$ : σταθερά MichaelisMenten.

Τέλος, η καμπύλη (non linear fit)  $V=f([S])$ , έχει μορφή κινητικής κορεσμού. Η  $K_M$  και οι  $K_{M(app)}$ , υπολογίστηκαν από το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου Lineweaver-Burk. Για τον υπολογισμό της  $K_i$ , αφού υπολογίστηκαν πρώτα οι  $K_{Mapp}$  παρουσία του αναστολέα, κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα το οποίο στον άξονα των τεταγμένων (yy' άξονας) τοποθετήθηκαν οι τιμές των  $K_{Mapp}$  και στον άξονα των τετημένων (xx' άξονας) οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν. Τέλος, χρησιμοποιώντας γραμμική εξίσωση (linear fit) υπολογίστηκε η  $K_i$  από το σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα xx', το οποίο αντιστοιχεί στο  $-K_i$ , όπως έχει αναλυθεί και σε προηγούμενο εδάφιο. Η γραμμική αυτή εξίσωση ήταν του τύπου:  $y = ax + b$ .

## 2.6 Κρυσταλλογραφία

### 2.6.1 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb

Προκειμένου να αναπτυχθούν οι κρύσταλλοι θα πρέπει να ακολουθηθεί μια διαδικασία ώστε να αφαιρεθεί η AMP από το διάλυμα του ενζύμου. Για τον λόγο αυτόν λαμβάνει χώρα διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM BES (pH 6.7) για περίπου 16 h. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κατεργασία με ενεργό ζωάνθρακα ώστε να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια. Ακολούθως, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων ( $A_{260}/A_{280}$ ) δεν πρέπει να ξεπερνά το 0.53. Η μέθοδος για την κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή και ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης καθότι η πρωτεΐνη δεν πρέπει να μετουσιωθεί και πρέπει να οργανωθεί σε κρυστάλλους. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T state) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο batch. Η μέθοδος batch αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας αιφνίδια κατάσταση υψηλού κορεσμού, στην οποία προοδευτικά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων GPb (T διαμόρφωση), η πρωτεΐνη αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου  $P4_32_12$ ) εντός των γυάλινων σωλήνων [47].

### 2.6.2 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Για την ανάλυση του τρόπου πρόσδεσης του υπό μελέτη αναστολέα στην GP χρησιμοποιήθηκαν οι κρύσταλλοι που αναπτύχτηκαν. Ο κρύσταλλος της gmGPb (T διαμόρφωση) τοποθετήθηκε σε τριχοειδή σωλήνα και εμβαπτίστηκε σε διάλυμα που αποτελούταν από 10 mM BES, pH 6.7, 10 % v/v DMSO και 1 mM αναστολέα για 5 ώρες. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε γωνιόμετρο και ακολούθως όλο αυτό το σύστημα στην κατάλληλη υποδοχή ανάμεσα στον ανιχνευτή και την πηγή της ακτινοβολίας. Στον κρύσταλλο προσέπεσε η δέσμη της ακτινοβολίας με ρυθμίσεις του γωνιόμετρου. Η έκθεση του κρυστάλλου της πρωτεΐνης σε ακτίνες-X, έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων των ατόμων της πρωτεΐνης με την ακτινοβολία X και την απελευθέρωση δευτερογενούς ακτινοβολίας. Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας μετρήθηκε από ειδικούς ανιχνευτές και συλλέχθηκαν τα

περιθλασιγράμματα τα οποία και αποτελούν τα πειραματικά δεδομένα. Ακολούθως από τα περιθλασιγράμματα μετρήθηκε η ένταση των αμαυρώσεων, οι οποίες σταθμίστηκαν και συγχωνεύτηκαν με κατάλληλα λογισμικά, ώστε να υπολογιστεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου. Η συλλογή των δεδομένων έγινε σε συμβατή πηγή ακτίνων-Χ στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών στο εργαστήριο του Δρ Σ. Ζωγράφου.

Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού καταχωρούνται οι συνθήκες του πειράματος : μήκος κύματος ακτινοβολίας ( $\lambda$ ), απόσταση ανιχνευτή-κρυστάλλου ( $d$ ), χρόνος έκθεσης ( $t$ ), γωνία περιστροφής και αριθμός εικόνων. Ο καθορισμός της απόστασης κρυστάλλου-ανιχνευτή ( $d$ ), γίνεται σύμφωνα με το νόμο του Bragg και δεδομένων της διαμέτρου του ανιχνευτή, του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της επιθυμητής μέγιστης ευκρίνειας [48]. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα CrysAlis Pro και η βέλτιστη ευκρίνεια επιλέχθηκε με τη βοήθεια του κριτηρίου  $CC^{1/2}$  μέσω του προγράμματος Aimless που εμπεριέχεται στη σειρά προγραμμάτων του CCP4.

### 2.6.3 Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου

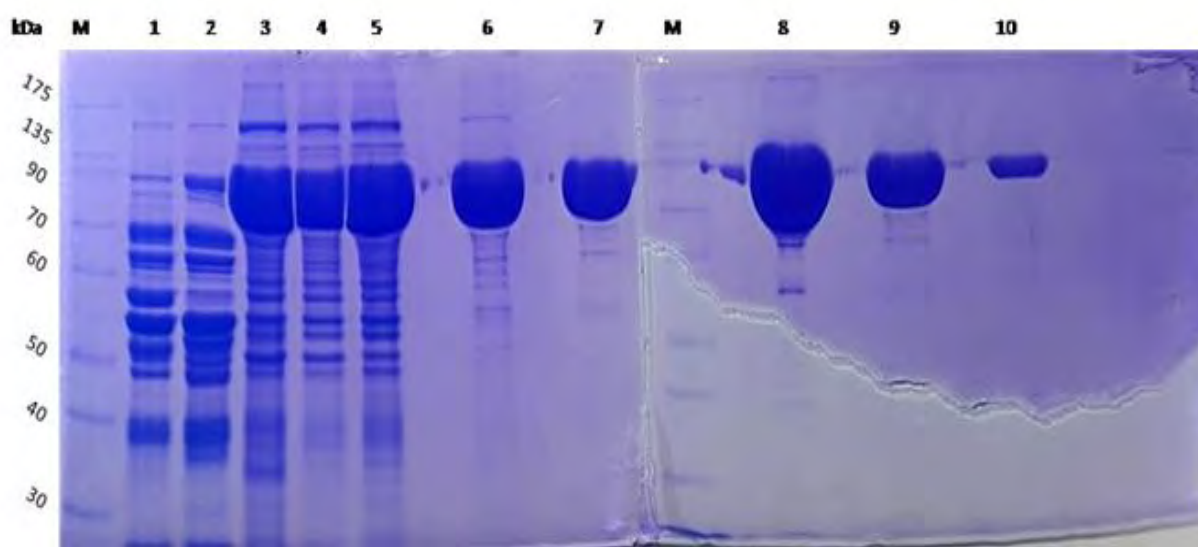
Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου της gmGPb και του αναστολέα προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως μοντέλο τη δομή της T διαμόρφωσης της φωσφορυλάσης b με το πρόγραμμα REFMAC [49,50] η οποία εμπεριέχεται στη συλλογή προγραμμάτων CCP4 [51]. Αρχικά έγινε ενσωμάτωση της δομής μοντέλου στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν και στη συνέχεια ακολουθήσε διόρθωση του μοντέλου κάνοντας χρήση του προγράμματος Coot [52,53] και βελτιστοποίηση με το πρόγραμμα REFMAC [54,55]. Επίσης στο μοντέλο προστέθηκαν μόρια ύδατος, εφόσον εντοπιζόνταν στον ηλεκτρονικό χάρτη 2Fobs-Fcalc, και εμφάνιζαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος. Ο υπολογισμός των διαφορικών χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας Fobs-Fcalc και 2Fobs-Fcalc, στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης αποκάλυψαν επιπρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, πράγμα που δηλώνει ότι κάτι προσδέεται στο ένζυμο που δεν υπάρχει στη δομή μοντέλο. Το μόριο του αναστολέα σχεδιάστηκε με το πρόγραμμα Ligand Builder που εμπεριέχεται στο πρόγραμμα Coot και προστέθηκε σε αυτή την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Ακολούθησε διαδοχική βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στους νέους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πακέτο προγραμμάτων CCP4 [56]. Τέλος, η βελτιστοποίηση των ιστροπικών παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων βελτίωσε αισθητά το τελικό μοντέλο. Η δομή του συμπλόκου GPb-αναστολέων χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των εν δυνάμει δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων van der Waals που μπορεί να σχηματίζει ο αναστολέας με τα κατάλοιπα που απαρτίζουν καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CONTACT του CCP4 με όριο απόστασης 3.35 Å για τους δεσμούς υδρογόνου και 4.0 Å για τις αλληλεπιδράσεις van der Waals. Τέλος

χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα γραφικών CCP4 Molecular Graphics (mg) για την απεικόνιση των τρισδιάστατων μακρομοριακών μορίων [57].

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 Απομόνωση και καθαρισμός της rmGPb

Η απομόνωση της rmGPb έγινε από συνολικά 3 κόνικλους. Στην **Εικόνα 3.24** παρουσιάζεται πηκτή πολυακρυλαμίδιου πυκνότητας 12 % υπό αποδιατακτικές συνθήκες, στην οποία αναλύθηκαν ως προς την καθαρότητα και την ποσότητα, δείγματα από τα διάφορα στάδια της μεθόδου.

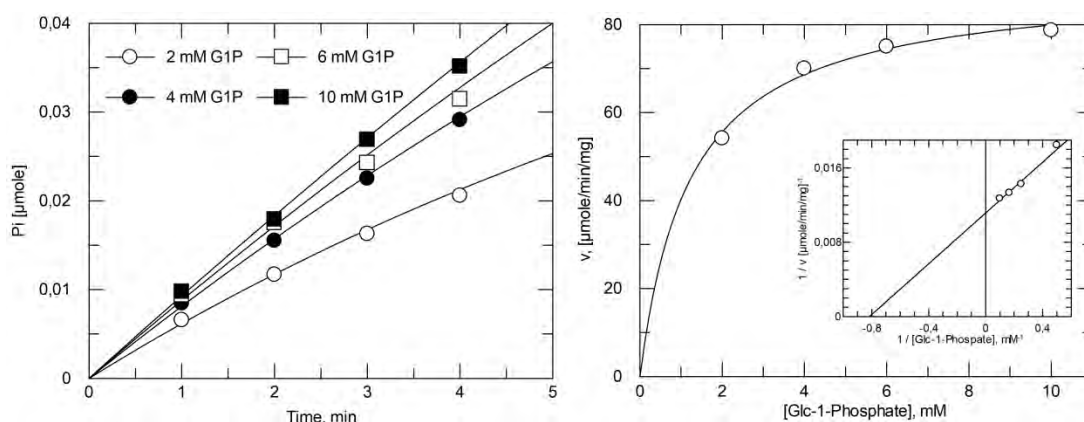


Εικόνα 3.24: 12% SDS-PAGE, από την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κόνικλων (97 kDa). Αρχικά, παρουσιάζεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Έπειτα, διαδρομή 1: στο τέλος της διαδικασίας παραλαβής του μυϊκού εκχυλίσματος, αφού διηθηθεί μέσω υαλοβάμβακα, διαδρομή 2: πριν την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο και συγκεκριμένα στην καταβύθιση των πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον πριν την ρύθμιση του pH, διαδρομή 3 (3H HMEPA) μετά από διαύγηση και ογκομέτρηση για προσθήκη EDTA και β-μερκαπτοαιθανόλης. Διαδρομή 4: στάδιο κρυστάλλωσης και ανακρυστάλλωσης της GPb, ογκομέτρηση πριν την προσθήκη AMP, διαδρομή 5: πρώτη κρυστάλλωση, διαδρομή 6: δεύτερη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 7: τρίτη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 8: τέταρτη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 9: πέμπτη ανακρυστάλλωση, διαδρομή 10: τελικό προϊόν.

Παρατηρούμε πως ο εμπλουτισμός και η καθαρότητα της πρωτεΐνης αυξάνονται σημαντικά κατά τα στάδια των ανακρυσταλλώσεων, κατά τα οποία κρυσταλλώνεται η rmGPb, ενώ πρωτεΐνες που δεν κρυσταλλώνονται, στις συγκεκριμένες συνθήκες, απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. Η συνολική απόδοση της μεθόδου απομόνωσης και καθαρισμού ήταν 1.09 g rmGPb ανά 2.3 kg σκελετικών μυών κόνικλων.

### 3.2 Κινητικές παράμετροι

Αρχικά, έγινε προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων του ενζύμου που απομονώθηκε, ώστε να ελέγξουμε την δραστηρότητα του.



**Διάγραμμα 1:** Αριστερά, παρουσιάζονται οι καμπύλες προϊόντος ως προς χρόνο για τις διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος από τις οποίες υπολογίστηκαν οι ειδικές δραστηρότητες. Δεξιά, παρουσιάζεται το διάγραμμα Michaelis-Menten και στο ένθετο το διάγραμμα Lineweaver-Burk από το οποίο υπολογίστηκε η τιμή της  $K_M$

Οι κινητικές παράμετροι προσδιορίστηκαν ως εξής:

$$K_M: 1.23 \pm 0.18 \text{ mM}$$

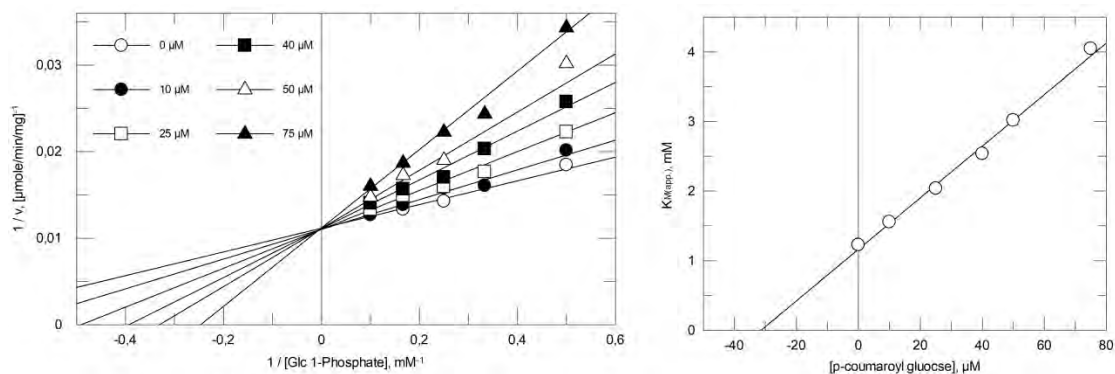
$$V_{\max}: 89.65 \pm 2.90 \text{ } \mu\text{mole}/\text{min}.\text{mg}$$

### 3.3 Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία με προηγουμένως προσθέτοντας κάθε φορά σταθερή συγκέντρωση αναστολέα. Τα διαγράμματα διπλού αντιστρόφου έδειξαν ότι η p-coumaroyl glucose εμφανίζει συναγωνιστική αναστολή ως προς το υπόστρωμα, καθώς οι γραμμές τέμνονται στο άξονα  $yy'$  και άρα η  $V_{\max}$  παραμένει σταθερή (διάγραμμα 2). Οι φαινομενικές τιμές των  $K_M$  αλλά και των μέγιστων ταχυτήτων παρουσιάζονται παρακάτω, στον **Πίνακα 7**.

[p-coumaroyl glucose]	$K_{M(\text{app.})}$ , mM	$V_{\max(\text{app.})}$ , $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$
0 $\mu\text{M}$	$1.23 \pm 0.18$	$89.65 \pm 2.90$
10 $\mu\text{M}$	$1.56 \pm 0.26$	$90.74 \pm 4.78$
25 $\mu\text{M}$	$2.03 \pm 0.15$	$90.74 \pm 3.23$
40 $\mu\text{M}$	$2.54 \pm 0.24$	$90.12 \pm 3.01$
50 $\mu\text{M}$	$3.02 \pm 0.66$	$89.85 \pm 7.88$
75 $\mu\text{M}$	$4.05 \pm 0.25$	$89.40 \pm 2.51$

Η σταθερά αναστολής υπολογίστηκε σε  $31.44 \pm 1.9 \text{ } \mu\text{M}$  και τα διαγράμματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 2



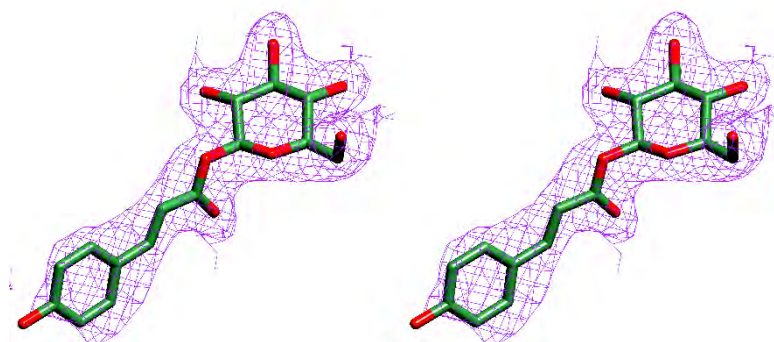
**Διάγραμμα 2:** Αριστερά, τα διαγράμματα Lineweaver-Burk από τα οποία προκύπτει ότι ο αναστολέας παρουσιάζει συναγωνιστική αναστολή ως προς το υπόστρωμα. Δεξιά, το διάγραμμα από το οποίο υπολογίστηκε η σταθερά αναστολής

### 3.4 Μελέτη κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Τα στατιστικά των δεδομένων περίθλασης που προέκυψαν κατά την ανάλυση των δεδομένων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**.

Ευκρίνεια (Å)	13.69-2.36
Υψηλότερη ευκρίνεια (Å)	2.45-2.36
Αριθμός μοναδικών ανακλάσεων	203106
Αριθμός μετρήσεων	37066 (3316)
Πολλαπλότητα	5.5 (3.9)
Rmerge	0.065 (0.425)
CC(1/2)	0.997 (0.898)
Πληρότητα (%)	92.8 (80.6)
Mean(I)/sd(I)	14.6 (2.5)

Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε την ύπαρξη θετική πυκνότητας στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Η προσθήκη της **p-coumaroyl glucose** σε αυτή τη πυκνότητα και η περαιτέρω βελτιστοποίηση της δομής, έδειξε ότι η ένωση αυτή είναι που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο της GP με τα άτομα του αναστολέα να ταιριάζουν καλά στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν (**Εικόνα 2.24**)

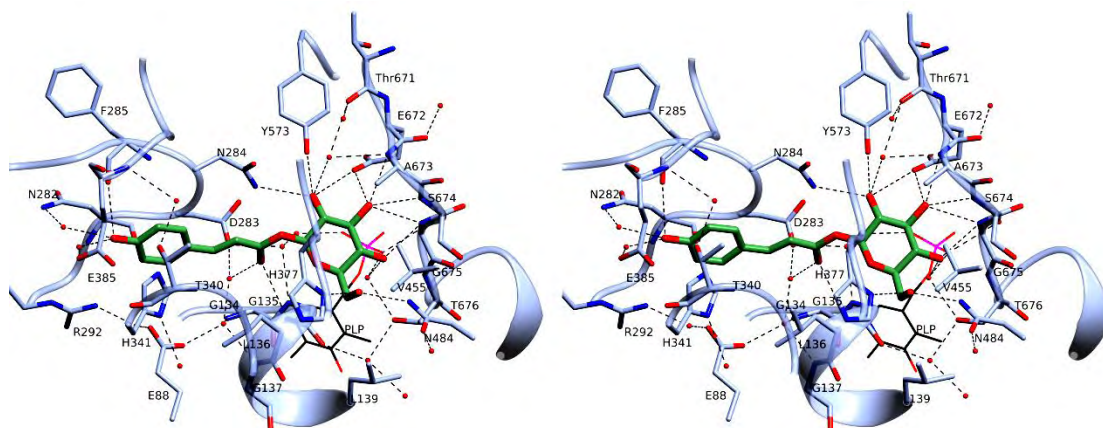


**Εικόνα 3.25:** Στερεο-απεικόνιση του χάρτη 2Fo-Fc που υπολογίστηκε μετά την ενσωμάτωση του αναστολέα.

Στη συνέχεια επικεντρωθήκαμε στις αλληλεπιδράσεις που δημιουργεί ο αναστολέας με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου. Οι δεσμοί υδρογόνου αλλά και οι



αλληλεπιδράσεις van der Waals παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, ενώ μια γραφική απεικόνιση του προτύπου πρόσδεσης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.25**.



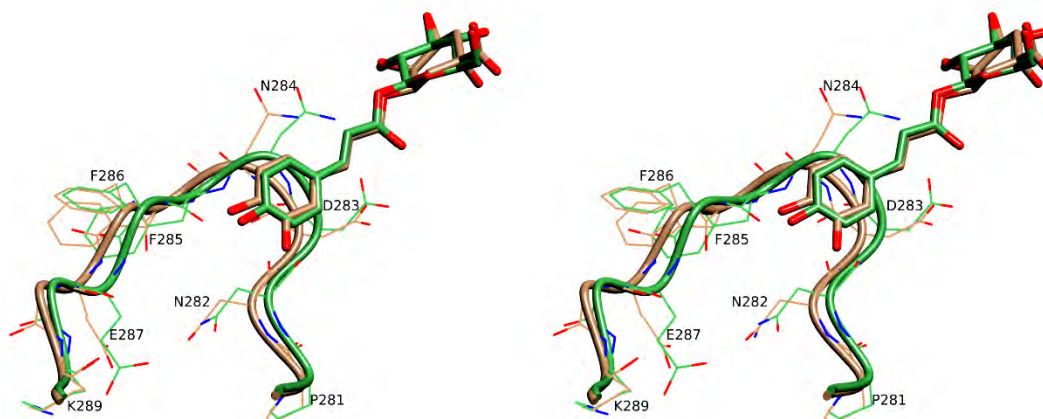
**Εικόνα 3.26:** Στερεο-απεικόνιση του προτύπου πρόσδεσης του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο της GP. Η **p-coumaroyl glucose** παρουσιάζεται με πράσινο, τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης με γαλάζιο και τα μόρια ύδατος με κόκκινες σφαίρες. Οι δεσμοί υδρογόνου αποτυπώνονται με διακεκομμένες γραμμές.

Η σύνδεση στο καταλυτικό κέντρο γίνεται κατά κύριο λόγο με την πρόσδεση της γλυκόζης η οποία παρουσιάζει παρόμοιο τρόπο πρόσδεσης και με τα περισσότερα ανάλογα γλυκόζης που έχουν μελετηθεί. Πιο συγκεκριμένα, η γλυκόζη αλληλεπιδρά με τα κατάλοιπα Asn484, Asn284, Tyr573, Glu672, Ala673, Ser674, Gly675 και His377 αλλά και με άλλα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου μέσω αλληλεπιδράσεων που γεφυρώνονται από μόρια ύδατος. Το O2' δημιουργεί ένα δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο G135 αλλά και με ένα μόριο ύδατος το οποίο γεφυρώνει αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια ύδατος και τα κατάλοιπα Asp283, Glu88 και Leu136. Τέλος, το O11 δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με την κύρια αλυσίδα του καταλοίπου Phe285, με την αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της Asn282 αλλά και με ένα μόριο ύδατος. Τα κατάλοιπα Phe285, Asn282 και Asp283 αποτελούν μέρος του βρόχου 280s ο οποίος στην κλειστή διαμόρφωση εμποδίζει την είσοδο του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο. Τέλος, κατά την πρόσδεση της, η **p-coumaroyl glucose** δημιουργεί 75 αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου, όπως αναγράφονται στον **Πίνακα 9**.

Άτομα αναστολέα	Κατάλοιπα πρωτεΐνης	
	Δεσμοί υδρογόνου (~3.35 Å)	Αλληλεπιδράσεις van der Waals (~4.0 Å)
O2	Glu672(OE1):3.1 Asn284(ND2):3.0 Tyr573(OH):3.0 Water321(O):3.3	Asn284(OD1,CG)
O3	Ser674(N):3.1 Glu672(OE1):2.8 Ala673(N):3.2 Gly675(N):3.1	Gly675(CA), Ala673(C,CA,CB), Glu672(CG,CD,C), Ser674(CA,C)
O4	Gly675(N):2.8 Water133(O):2.6	Gly675(C,O,CA), Ser674(CB,C), Asn484(ND2)
O5	Asn484(ND2):2.7 His377(ND1):2.7	Leu139(CD2), His377(CE1,CG), Val455(CB,CG1,CG2,CG)

O7	Leu136(N):3.3 Water311(O):2.5	Leu136(CA,CB), Asn284(ND2), Asp283(OD1)
O8	Phe285(O):3.3 Water107(O):2.8 Water202(O):3.2 Water343(O):2.5	His341(NE2), Arg292(NH2)
O1		His377(ND1,CB), Leu136(N,CB)
C2		Gly135(C), Leu136(N)
C3		Gly675(N)
C4		Glu672(OE1), Gly675(N)
C5		Glu672(OE1), His377(O)
C6		Gly135(O,C), His377(ND1), Asn484(ND2), Leu136(CA,N)
O6		Asn284(ND2,OD1), His377(CB,O)
C7		Asn284(ND2), Leu136(CB)
C8		Asn284(ND2,CG)
C9		Asn284(N)
C10		Asn284(N), His341(CE1)
C11		Glu88(OE2), Asn282(O), His341(CE1)
C12		Glu88(OE2), Asn282(O), His341(CE1,NE2)
C13		His341(CE1,NE2), Phe285(O)
C14		His341(CE1,NE2), Phe285(O)
C15		Asn284(N,CA), His341(CE1,NE2)
<b>Σύνολο</b>	<b>18</b>	<b>75</b>

Η **p-coumaroyl glucose** εμφανίζεται να είναι σημαντικά ισχυρότερη από μια παρόμοια φυσική ένωση, το **χλωρογενικό οξύ**, το οποίο αναστέλλει την GP με σταθερά αναστολής 2.5 mM, μία τιμή σχεδόν ισοδύναμη με την σταθερά αναστολής της γλυκόζης (3.2 mM). Για να μπορέσουμε να εντοπίσουμε την αιτία της διαφοράς της ισχύος μεταξύ στο **χλωρογενικό οξύ** και την ένωση που μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία ( $K_i$ : 31.44  $\mu$ M), συνεχίσαμε με υπέρθεση των δύο συμπλόκων. Γενικά, δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αλλαγή στο σύνολο της δομής, ούτε στον τρόπο πρόσδεσης των ενώσεων, εάν εξαιρέσουμε την διαφορετική χημική δομή στο δακτύλιο της γλυκόζης. Ωστόσο, παρουσιάζεται μια μεγάλη μετατόπιση στο βρόχο 280s όπως αποτυπώνεται στην **Εικόνα 2.26**. Η μετατόπιση του βρόχου ισοδυναμεί με ένα ενεργειακό κόστος που πρέπει να καταβάλει το ένζυμο προκειμένου το χλωρογενικό οξύ να μπορέσει να προσδεθεί στον κρύσταλλο κάτι το οποίο οδηγεί σε ασθενέστερη αναστολή. Επιπλέον, το χλωρογενικό οξύ δεν δημιουργεί τους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργεί το άτομο O4' της γλυκοκυρανόζης ούτε και τους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργεί το άτομο O11 της p-coumaroyl glucose. Συμπερασματικά, η απώλεια των δεσμών υδρογόνου και η μετατόπιση του βρόχου 280s μπορούν να αιτιολογήσουν τη σημαντική διαφορά μεταξύ των σταθερών αναστολής.



**Εικόνα 3.27:** Στερεο-απεικόνιση του βρόχου 280s κατά την πρόσδεση της **p-coumaroyl glucose** (πράσινο) και του **γλωρογενικού οξέος** (καφέ)

Η μελέτη της πρόσδεσης της **p-coumaroyl glucose** στο καταλυτικό κέντρο της GP αλλά και οι βιοχημικές μελέτες που διεξήχθησαν για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής, αναδεικνύει τη συμβολή των φυσικών ενώσεων στην εύρεση νέων αντι-υπερλυκαιμικών ενώσεων για τη διαχείρισης του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Επιπλέον η **p-coumaroyl glucose** μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένωση οδηγός έτσι ώστε μέσω του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων να σχεδιαστούν νέες ενώσεις που θα αναστέλλουν ισχυρότερα το ένζυμο.

#### 4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Jean Claude Mbanya, Juergen Sandow, Wolfgang Landgraf, and David R Owens. Recombinant Human Insulin in Global Diabetes Management – Focus on Clinical Efficacy. *Eur Endocrinol* 2017; 13(1): 21–25.
- [2] Alvarez CA, Lingvay I, Vuylsteke V, Koffarnus RL, McGuire DK. Cardiovascular Risk in Diabetes Mellitus: Complication of the Disease or of Antihyperglycemic Medications. *Clin Pharmacol Ther.* 2015 ;98(2):145-61.
- [3] Mark A Atkinson, George S Eisenbarth, and Aaron W Michels. Type 1 diabetes. *Lancet* 2014; 383(9911): 69–82.
- [4] Bhattacharya S, Dey D, Roy SS. Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci.* 2007;32(2):405-13.
- [5] Pandey A, Chawla S, Guchhait P. Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives. *IUBMB Life.* 2015;67(7):506-13.

- [6] Rémy Boussageon, Irène Supper, Theodora Bejan-Angoulvant, Nadir Kellou, Michel Cucherat, Jean-Pierre Boissel, Behrouz Kassai, Alain Moreau, François Gueyffier, and Catherine Cornu. Reappraisal of Metformin Efficacy in the Treatment of Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. *PLoS Med* 2012; 9(4): e1001204.
- [7] Rojas JM, Schwartz MW. Control of hepatic glucose metabolism by islet and brain. *Diabetes Obes Metab* 2014;16 Suppl 1:33-40.
- [8] Correia M, Neves-Petersen MT, Jeppesen PB, Gregersen S, Petersen SB. UV-light exposure of insulin: pharmaceutical implications upon covalent insulin dityrosine dimerization and disulphide bond photolysis. *PLoS One* 2012;7(12):e50733.
- [9] Melmed S, Conn PM. *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*. Humana Press. 2005.
- [10] LeRoithn D, Olefsky JM, Taylor SI. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. Lippincott Williams & Wilkins. 2003
- [11] Koulmanda M, Budo E, Bonner-Weir S, Qipo A, Putheti P, Degauque N, Shi H, Fan Z, Flier JS, Auchincloss H Jr, Zheng XX, Strom TB. Modification of adverse inflammation is required to cure new-onset type 1 diabetic hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(32):13074-9.
- [12] Unger RH, Orci L. Glucagon and the A cell: physiology and pathophysiology (first two parts). *N Engl J Med* 1981;304(25):1518-24.
- [13] Hædersdal S, Lund A, Knop FK, Vilsbøll T. The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes. *Mayo Clin Proc* 2018;93(2):217-239.
- [14] Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
- [15] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J* 2012;441(3):763-87.
- [16] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.
- [17] Lucchiari S, Santoro D, Pagliarani S, Comi GP. Clinical, biochemical and genetic features of glycogen debranching enzyme deficiency. *Acta Myol* 2007;26(1):72-4.
- [18] Zhai L, Feng L, Xia L, Yin H, Xiang S. Crystal structure of glycogen debranching enzyme and insights into its catalysis and disease-causing mutations. *Nat Commun* 2016;7:11229.

- [19] Adeva-Andany MM, González-Lucán M, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C, Ameneiros-Rodríguez E. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin* 2016;5:85-100.
- [20] Christos E. Zois and Adrian L. Harris. Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *J Mol Med (Berl)* 2016; 94: 137–154.
- [21] Catherine Vénien-Bryan, Slavica Jonic, Vasiliki Skamnaki, Nick Brown, Nicolas Bischler, Nikos G. Oikonomakos, Nicolas Boisset, and Louise N. Johnson. The Structure of Phosphorylase Kinase Holoenzyme at 9.9 Å Resolution and Location of the Catalytic Subunit and the Substrate Glycogen Phosphorylase. *Structure* 2009;17(1): 117–127.
- [22] Abaira C, Colwell JA, Nuttall FQ, Sawin CT, Nagel NJ, Comstock JP, Emanuele NV, Levin SR, Henderson W, Lee HS. Veterans Affairs Cooperative Study on glycemic control and complications in type II diabetes (VA CSDM). Results of the feasibility trial. *Veterans Affairs Cooperative Study in Type II Diabetes. Diabetes Care.* 1995;18(8):1113-23.
- [23] Rath VL, Ammirati M, LeMotte PK, Fennell KF, Mansour MN, Danley DE, Hynes TR, Schulte GK, Wasilko DJ, Pandit J. Activation of human liver glycogen phosphorylase by alteration of the secondary structure and packing of the catalytic core. *Mol Cell* 2000;6(1):139-48.
- [24] Mathieu C, Dupret JM, Rodrigues Lima F. The structure of brain glycogen phosphorylase—from allosteric regulation mechanisms to clinical perspectives. *FEBS J* 2017;284(4):546-554.
- [25] M A Vázquez, F Muñoz, J Donoso, and F García Blanco. Spectroscopic study of the Schiff bases of dodecylamine with pyridoxal 5'-phosphate and 5'-deoxy pyridoxal. A model for the Schiff bases of pyridoxal 5'-phosphate in biological systems. *Biochem J* 1991;279(Pt 3): 759–767.
- [26] Brás NF, Fernandes PA, Ramos MJ. Understanding the Rate-Limiting Step of Glycogenolysis by Using QM/MM Calculations on Human Glycogen Phosphorylase. *ChemMedChem* 2018 ;13(15):1608-1616.
- [27] Lin K, Hwang PK, Fletterick RJ. Distinct phosphorylation signals converge at the catalytic center in glycogen phosphorylases. *Structure* 1997;5(11):1511-23.
- [28] Oikonomakos NG1, Tsitsanou KE, Zographos SE, Skamnaki VT, Goldmann S, Bischoff H. Allosteric inhibition of glycogen phosphorylase a by the potential antidiabetic drug 3-isopropyl 4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methylpyridine-3,5,6-tricarboxylate. *Protein Sci.* 1999;8(10):1930-45.

- [29] Rath VL, Ammirati M, LeMotte PK, Fennell KF, Mansour MN, Danley DE, Hynes TR, Schulte GK, Wasilko DJ, Pandit J. Activation of human liver glycogen phosphorylase by alteration of the secondary structure and packing of the catalytic core. *Mol Cell* 2000;6(1):139-48.
- [30] Pinotsis N, Leonidas DD, Chrysina ED, Oikonomakos NG, Mavridis IM. The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Protein Sci* 2003;12(9):1914-24.
- [31] Ekstrom JL, Pauly TA, Carty MD, Soeller WC, Culp J, Danley DE, Hoover DJ, Treadway JL, Gibbs EM, Fletterick RJ, Day YS, Myszka DG, Rath VL. Structure-activity analysis of the purine binding site of human liver glycogen phosphorylase. *Chem Biol* 2002;9(8):915-24
- [32] Oikonomakos NG, Kosmopoulou MN, Chrysina ED, Leonidas DD, Kostas ID, Wendt KU, Klabunde T, Defossa E. Crystallographic studies on acyl ureas, a new class of glycogen phosphorylase inhibitors, as potential antidiabetic drugs. *Protein Sci* 2005;14(7):1760-71.
- [33] Oikonomakos NG, Skamnaki VT, Tsitsanou KE, Gavalas NG, Johnson LN. A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* 2000;8(6):575-84
- [34] Rath VL, Ammirati M, Danley DE, Ekstrom JL, Gibbs EM, Hynes TR, Mathiowetz AM, McPherson RK, Olson TV, Treadway JL, Hoover DJ. Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. *Chem Biol* 2000;7(9):677-82.
- [35] Duan W., Yu Y., Zhang L. Anti-atherogenic effects of *Phyllanthus emblica* associated with corilagin and its analogue. *Yakugaku Zasshi*. 2005;125:587–591.
- [36] Prabhu Srinivasan, S. Vijayakumar, Swaminathan Kothandaraman, and Manogar Palania. Anti-diabetic activity of quercetin extracted from *Phyllanthus emblica* L. fruit: In silico and in vivo approaches. *J Pharm Anal* 2018;8(2): 109–118.
- [37] Kantsadi AL, Apostolou A, Theofanous S, Stravodimos GA, Kyriakis E, Gorgogietas VA, Chatzileontiadou DS, Pegiou K, Skamnaki VT, Stagos D, Kouretas D, Psarra AM1, Haroutounian SA, Leonidas DD. Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food Chem Toxicol*. 2014;67:35-43.
- [38] Antonio del Sol, Hiroto Fujihashi, Dolors Amorós, and Ruth Nussinov. Residues crucial for maintaining short paths in network communication mediate signaling in proteins. *Mol Syst Biol* 2006; 2: 2006.0019.

- [39] Somsák L, Nagya V, Hadady Z, Docsa T, Gergely P. Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments. *Curr Pharm Des.* 2003; 9(15):1177-89.
- [40] Fischer T, Koulas SM, Tsagkarakou AS, Kyriakis E, Stravodimos GA, Skamnaki VT, Liggri PGV, Zographos SE, Riedl R, Leonidas DD. High Consistency of Structure-Based Design and X-Ray Crystallography: Design, Synthesis, Kinetic Evaluation and Crystallographic Binding Mode Determination of Biphenyl-N-acyl-β-d-Glucopyranosylamines as Glycogen Phosphorylase Inhibitors. *Molecules.* 2019 ;24(7).
- [41] Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. Principles of physical biochemistry. 2nd ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall; 2006.
- [42] Κλώνης Ι. Ενζυμολογία: Έμβρυο; 2007.
- [43] Διαμαντίδης, Γρηγόρης Χ. Εισαγωγή στη βιοχημεία. Έκδοση 3<sup>η</sup> . University Studio Press. Θεσσαλονίκη
- [44] Γεωργάτσος Ι.Γ. (2005). Εισαγωγή στη βιοχημεία. Έκδοση 6η.Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη.
- [45] Price NC, Stevens L. Fundamentals of enzymology : the cell and molecular biology of catalytic proteins. 3rd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press; 1999.
- [46] Dixon M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 1953;55:170-1.
- [47] Oikonomakos N. G., Melpidou A.E & Johnson L. N., (1985), Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalic characterization, *Biochem. Biophys. Acta*, 832, 248-256.
- [48] Rhodes G. Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2006
- [49] Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998
- [50] Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997;53:240-55.
- [51] Marshall William, Bangert K. Stephen, Κλινική χημεία, 3η Ελληνική έκδοση, Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, 2011
- [52] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:2126-32.
- [53] Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:486-501

[54] Murshudov GN, Skubak P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011;67:355-67

[55] Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997;53:240-55.

[56] COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50:760-3.

[57] McNicholas S, Potterton E, Wilson KS, Noble ME. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011;67:386-94