

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΗ
ΕΝΩΣΗ**

**ΦΟΙΤΗΤΗΣ: Μέρας Βασίλειος
ΠΑΤΡΩΝΥΜΟ: Μέρας Απόστολος
ΛΑΡΙΣΑ 2020**

**ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΗ
ΕΝΩΣΗ**

**INHIBITION OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE
FROM A NEW POLYPHENOLIC COMPOUND**

ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΜΙΑ ΝΕΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΗ ΕΝΩΣΗ

ΟΝΟΜΑ: ΜΕΡΑΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. 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

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

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
Εισαγωγή.....	9
1.1.1. Σακχαρώδης διαβήτης.....	9
1.1.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I.....	10
1.1.3. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II.....	11
Ομοίωση της γλυκόζης.....	12
1.1.4. Ινσουλίνη – Ρόλος και μεταβολικές αντιδράσεις.....	12
1.1.5. Γλυκαγόνη.....	13
1.1.6. Γλυκογόνο – Μεταβολισμός του Γλυκογόνου.....	14
1.1.6.1. Αποικοδόμηση γλυκογόνου.....	15
Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP).....	17
1.1.7. Μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	19
1.1.8. Ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	20
1.1.9. Μηχανισμός κατάλυσης της GP και ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης.....	20
1.1.10. Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	22
1.1.10.1. Καταλυτικό κέντρο.....	23
1.1.10.2. Κέντρο αναστολής.....	23
1.1.10.3. Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου.....	24
1.1.10.4. Αλλοστερικό κέντρο.....	24
1.1.10.5. Νέο αλλοστερικό κέντρο.....	25
1.1.10.6. Κέντρο πρόσδεσης της κερσεΐνης.....	25
1.1.11. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων.....	26
Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων.....	27
1.1.12. Αλλοστερικά ένζυμα και κινητικές μελέτες.....	29
1.1.13. Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων.....	30
Στόχος της εργασίας.....	35
2. Υλικά και μέθοδοι.....	36
2.1 Αντιδραστήρια.....	36
2.2 Οργανολογία.....	37
2.3 Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (mGPb) από σκελετικούς μύες κόνικλων.....	37
2.4 Φωσφορυλίωση της ηπατικής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου ...	44

2.5 Κινητικές μελέτες έναντι της GP	45
2.5.1 Προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων φασματοφωτομετρικά	45
2.5.2 Παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος	46
2.5.3 Παρασκευή υποστρώματων	47
2.5.4 Ανάλυση κινητικών δεδομένων	53
3. Αποτελέσματα.....	56
3.1 Κινητικές μελέτες.....	56
3.1.1 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα GB-P10-4-28 έναντι της hIGPa.....	56
3.1.2 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα GB-P10-4-28 έναντι της rmGPb.....	56
3.1.3 Προσδιορισμός του κέντρου πρόσδεσης του αναστολέα GB-P10- 4-28 στη GP	57
Συζήτηση.....	59
Βιβλιογραφία.....	60

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το Σεπτέμβριο του 2019 έως το Φεβρουάριο του 2020, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Βιοχημείας του ΤΒΒ Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή, Δρ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα που έκανε δεκτό το αίτημα μου, να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας. Η συνεχής επίβλεψη και καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια της εργασίας ήταν πολύτιμη, δίνοντας λύση σε όλους μου τους προβληματισμούς. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, Δρ. Μπαλατσό Νικόλαο και Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική για τη πολύ καλή συνεργασία και για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Συμεών Κούλα για την βοήθεια και τη στήριξη που παρείχε, αλλά και για την υπομονή και διεύρυνση των επιστημονικών μου γνώσεων, πάντοτε πρόθυμος να με καθοδηγήσει. Δε θα μπορούσα να μην αναφέρω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια και τη δημιουργία ενός ευχάριστου εργασιακού περιβάλλοντος, καθώς και να τους πω ένα μπράβο. Συγκεκριμένα ευχαριστώ τον μεταπτυχιακό φοιτητή Σεραφήμ Αλεξόπουλο, τους υποψήφιους διδάκτορες Αναστασία Τσαγκαράκου, Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο, Θεοδώρα Σολοβού και Όλγα Παπαϊωάννου.

Τέλος θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, για την αδιάκοπη υποστήριξη τους, καθώς χωρίς αυτούς τους ανθρώπους δεν θα είχα καταφέρει να ολοκληρώσω το πρόγραμμα σπουδών μου.

Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), αποτελεί μια ομάδα μεταβολικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από τα υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα για παρατεταμένη χρονική περίοδο. Ο διαβήτης οφείλεται στο ότι το πάγκρεας δεν παράγει την απαραίτητη ποσότητα ινσουλίνης ή/και τα κύτταρα του σώματος δεν ανταποκρίνονται στην έκκριση ινσουλίνης. Η ρύθμιση της παραγωγής ηπατικής γλυκόζης μέσω της γλυκογονόλυσης αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για αντιυπεργλυκαιμικά φάρμακα για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. Ο έλεγχος των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα είναι βασικός στόχος για τη θεραπεία διαβητικών ασθενών, για τους οποίους συνταγογραφούνται ένας ή περισσότεροι υπογλυκαιμικοί παράγοντες, επιπρόσθετα της τροποποίησης της διατροφής, της άσκησης, καθώς και της χορήγησης ινσουλίνης. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου συμμετέχει στην έναρξη της αποικοδόμησης του γλυκογόνου διασπώντας το σε υπομονάδες 1-φωσφορικής γλυκόζης και γι αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στόχος νέων αναστολέων που θα είναι σε θέση να βοηθήσουν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο Διαβήτη τύπου II.

Στην παρούσα διπλωματική μελετήθηκε η σύνδεση της πολυφαινολικής ένωσης (GB-P10-4-28) στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, μέσω κινητικών πειραμάτων. Υπολογίστηκαν οι τιμές των σταθερών αναστολής K_i της GB-P10-4-28. Έναντι της μυικής φωσφορυλάσης b ήταν 27 μM και έναντι της ηπατικής φωσφορυλάσης a ήταν 32 μM . Επίσης έγινε προσπάθεια για την εύρεση του κέντρου πρόσδεσης του αναστολέα στη GP. Πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες παρουσία του αναστολέα και είτε καφεΐνης, είτε γλυκόζης, οι οποίες έδειξαν συναγωνισμό του αναστολέα GB-P10-4-28 με τη γλυκόζη και απουσία συναγωνισμού με την καφεΐνη. Οι μελέτες αυτές υποδηλώνουν πως ο GB-P10-4-28 προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο.

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic disorders characterized by high blood sugar levels for an extended period of time. Diabetes is caused by malfunction of the pancreas which does not produce the required amount of insulin and/or inability of cells to respond to insulin secretion. Regulation of hepatic glucose production through glycogenolysis is considered a promising approach for antihyperglycaemic drugs for the treatment of type II diabetes. Control of the levels of blood glucose is a key target in the treatment of diabetic patients, for whom, one or more hypoglycaemic agents are prescribed, in addition to dietary, exercise and insulin. Glycogen phosphorylase participates in the first step of glycogen degradation by breaking it down to glucose-1-phosphate and therefore is used as a pharmaceutical target for the discovery of new inhibitors that could be used to control blood-glucose levels in type II diabetes.

In the present thesis the binding of the polyphenolic compound (GB-P10-4-28) to glycogen phosphorylase by kinetic experiments was studied. The inhibition constant (K_i) values for GB-P10-4-28 were 27 and against hIGPa was 32 μM for muscle and liver glycogen phosphorylase, respectively. Kinetic studies performed in the presence of the inhibitor and caffeine or glucose showed that GB-P10-4-28 competes with glucose and but not with caffeine, implying that GB-P10-4-28 binds to the catalytic center.

Εισαγωγή

1.1.1. Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), κοινώς γνωστός ως διαβήτης, αποτελεί μια ομάδα μεταβολικών παθήσεων που χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα για παρατεταμένη χρονική περίοδο. Αποτελεί μία από τις πιο συχνές μεταβολικές διαταραχές στον κόσμο και οφείλεται σε δυσλειτουργία του παγκρέατος που παράγει μειωμένα επίπεδα ινσουλίνης καθώς επίσης και σε μειωμένη ανταπόκριση των κυττάρων του σώματος στη παραγόμενη ινσουλίνη [1,3]. Οι ασθενείς που καταγράφηκαν με σακχαρώδη διαβήτη έως το 2014 αποτελούσαν το 8,5% του συνολικού ενήλικου πληθυσμού της Γης, αριθμός που εκτιμάται ότι αυξάνεται σταθερά και μέχρι το 2045 ο παγκόσμιος επιπολασμός του θα είναι 700 εκατομμύρια [3]. Τα συμπτώματα της νόσου περιλαμβάνουν την ακούσια απώλεια βάρους, τη πολυουρία (αυξημένη ούρηση), την πολυδιψία (αυξημένη δίψα) και τη πολυφαγία (αυξημένη πείνα). Τα συμπτώματα μπορεί να αναπτυχθούν γρήγορα (μέσα σε εβδομάδες ή μήνες) στον διαβήτη τύπου I, ενώ συνήθως αναπτύσσονται πολύ πιο αργά και μπορεί να είναι ανεπαίσθητα ή να απουσιάζουν στον διαβήτη τύπου II. Για το λόγο αυτό και προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι πολλαπλές επιπλοκές στην υγεία των ασθενών με διαβήτη χρήζει τεράστιας ζωτικής σημασίας η πρόωρη διάγνωση του [5].

Όλες οι μορφές διαβήτη αυξάνουν τον κίνδυνο μακροχρόνιων επιπλοκών που μπορούν να οδηγήσουν σε καρδιακές νόσους, εγκεφαλικά επεισόδια, χρόνιες νεφρικές νόσους, βλάβες στα νεφρά ακόμη και στο θάνατο. Περίπου το 75% των θανάτων σε ασθενείς με διαβήτη οφείλεται σε στεφανιαίες νόσους. Αναφορικά με τις επιπλοκές, λόγω διαβητικής νεφροπάθειας παρατηρούνται ουλές στους ιστούς και υψηλή απώλεια πρωτεϊνών από τα ούρα που μπορούν να οδηγήσουν σε ορισμένες περιπτώσεις σε υποχρεωτική αιμοκάθαρση ακόμη και σε μεταμόσχευση νεφρού. Η διαβητική νευροπάθεια αποτελεί την πιο κοινή επιπλοκή του διαβήτη με τα κυριότερα συμπτώματα να περιλαμβάνουν μούδιασμα των άκρων, πόνο και αλλοιωμένη αίσθηση πόνου καθώς και διαβητικά έλκη ποδιών. Επιπλέον, η εγγύς διαβητική νευροπάθεια προκαλεί επώδυνη μυϊκή ατροφία και αδυναμία [5].

Το παγκόσμιο οικονομικό κόστος των δαπανών για την υγεία σχετικά με το διαβήτη το 2017 εκτιμήθηκε σε 727 δισεκατομμύρια δολάρια (ΗΠΑ). Ειδικότερα στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο διαβήτης κόστισε σχεδόν 245 δισεκατομμύρια δολάρια (ΗΠΑ) το 2012. Οι μέσες ιατρικές δαπάνες ατόμων με διαβήτη αυξήθηκαν περίπου 15% τη πενταετία 2012-2017. Για το λόγο αυτό η πρόληψη και η σωστή θεραπεία αποτελούν το κλειδί και το πρώτο σημείο αναφοράς των ανθρώπων που αντιμετωπίζουν προβλήματα με σακχαρώδη διαβήτη [4].

Υπάρχουν αρκετοί τύποι διάκρισης του ΣΔ ανάλογα με τη διαταραχή της ινσουλίνης που παρατηρείται, ωστόσο δεν είναι πάντα εύκολο να καταταχθεί ένα

άτομο σε ένα συγκεκριμένο τύπο [4]. Οι τρεις κύριοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη είναι οι εξής:

Ο διαβήτης τύπου I εντοπίζεται σε ένα μικρό ποσοστό, περίπου 5 – 10% των ανθρώπων που πάσχουν από διαβήτη και προκύπτει από την δυσλειτουργία του παγκρέατος που έχει ως συνέπεια την παραγωγή ανεπαρκών επιπέδων ινσουλίνης λόγω αυτοάνοσης καταστροφής των β-κυττάρων [3].

Ο διαβήτης τύπου II απαντάται σε ένα αρκετά υψηλό ποσοστό (περίπου 90 – 95%) των ανθρώπων που πάσχουν από διαβήτη και συχνά οι ασθενείς με αυτή τη μορφή διαβήτη είναι παχύσαρκοι. Σε αυτό το τύπο παρατηρείται αντίσταση του οργανισμού στην ινσουλίνη, μια κατάσταση κατά την οποία τα κύτταρα δεν ανταποκρίνονται στην ινσουλίνη χωρίς όμως να υπάρχει ανεπάρκεια αυτής.

Ο διαβήτης κύησης είναι η τρίτη μορφή η οποία εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης στις γυναίκες όπου μέχρι πρότινος δεν είχαν παρουσιάσει προηγούμενο ιστορικό διαβήτη και ανέπτυξαν υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα [4].

Ο διαβήτης τύπου I αντιμετωπίζεται με ενέσεις ινσουλίνης ενώ ο διαβήτης τύπου II μπορεί να αντιμετωπιστεί με φάρμακα και με ινσουλίνη. Ο διαβήτης της κύησης συνήθως υποχωρεί μετά τη γέννηση [4].

1.1.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I

Ο διαβήτης τύπου I ή αλλιώς ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης, χαρακτηρίζεται από απώλεια των β-κυττάρων, που παράγουν ινσουλίνη από τις παγκρεατικές νησίδες, οδηγώντας σε ανεπάρκεια ινσουλίνης. Αυτός ο τύπος μπορεί να ταξινομηθεί περαιτέρω ως ανοσοδιαμεσολαβούμενος ή ιδιοπαθής. Στις περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με διαβήτη τύπου I η νόσος οφείλεται σε ανοσοδιαμεσολαβούμενης φύσης αίτια, όπου παρατηρείται μια αυτοάνοση προσβολή που προκαλείται από T-κύτταρα και οδηγεί στην απώλεια β-κυττάρων και επομένως σε απώλεια της ινσουλίνης. Η πλειοψηφία των ανθρώπων που έχουν προσβληθεί από αυτό το τύπο διαβήτη είναι κατά τα άλλα υγιή και με φυσιολογικό βάρος πριν την εμφάνιση της νόσου. Η ευαισθησία και η ανταπόκριση στην ινσουλίνη είναι συνήθως φυσιολογική, ειδικά στα αρχικά στάδια. Αν και έχει χαρακτηριστεί «νεανικός διαβήτης» λόγω της συχνής εμφάνισης του στα παιδιά, μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία και ένα σημαντικό ποσοστό διαγιγνώσκεται κατά την ενηλικίωση [5].

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I κληρονομείται, εν μέρει, με πολλαπλά γονίδια, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων γονότυπων HLA, που θεωρούνται υπεύθυνα στην εμφάνιση του. Σε γενετικά ευπαθή άτομα, η έναρξη του διαβήτη μπορεί να προκληθεί από έναν ή περισσότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως μια ιογενής λοίμωξη ή μια δίαιτα. Είναι επίσης γνωστή η εμπλοκή αρκετών ιών, αλλά μέχρι σήμερα δεν

υπάρχουν ενδείξεις που να υποστηρίζουν αυτήν την υπόθεση όσο αναφορά τον άνθρωπο. Αναφορικά με τους διατροφικούς παράγοντες τα στοιχεία δείχνουν ότι η γλιαδίνη (μια πρωτεΐνη που υπάρχει στη γλουτένη) μπορεί να επηρεάζει την ανάπτυξη διαβήτη τύπου I, αλλά ο μηχανισμός δράσης της δεν είναι πλήρως κατανοητός [4].

Οι ασθενείς που νοσούν από διαβήτη τύπου I μπορεί να παρουσιάσουν επεισόδια διαβητικής κετοξέωσης (DKA), μεταβολικές διαταραχές που χαρακτηρίζονται από ναυτία, βαθιά αναπνοή, γνωστή ως αναπνοή Kussmaul, έμετο και κοιλιακό άλγος, μυρωδιά ακετόνης στην αναπνοή και σε σοβαρές περιπτώσεις μειωμένα επίπεδα συνείδησης [5]. Ένα σπάνιο αλλά εξίσου σοβαρό σύμπτωμα αποτελεί η εμφάνιση υπεροσμωτικής υπεργλυκαιμικής κατάστασης (HHS), η οποία είναι πιο συχνή στον διαβήτη τύπου II και είναι κυρίως αποτέλεσμα αφυδάτωσης. Ακόμα, ο διαβήτης τύπου I, μπορεί να συνοδεύεται από απρόβλεπτα υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα και με τη πιθανότητα για διαβητική κετοξέωση ή με τα κατά πολύ μειωμένα επίπεδα σακχάρου στο αίμα. Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν τη μειωμένη αντιρροθμιστική απόκριση σε χαμηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα, λοιμώξεις, γαστροπάρεση (που οδηγεί σε ακανόνιστη απορρόφηση διαιτητικών υδατανθράκων) και ενδοκρिनολογικές (π.χ., νόσος του Addison). Αυτά τα φαινόμενα θεωρείται ότι απαντώνται στο 1% έως 2% των ατόμων με διαβήτη τύπου I [4].

1.1.3. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II

Ο διαβήτης τύπου II είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος σακχαρώδους διαβήτη, και αποτελεί περίπου το 90-95% των περιπτώσεων. Η πιο συνηθισμένη αιτία αυτού του τύπου διαβήτη είναι ο συνδυασμός υπερβολικού σωματικού βάρους και ανεπαρκούς άσκησης. Αρχικά, παρατηρείται μια κατάσταση κατά την οποία τα κύτταρα δεν ανταποκρίνονται σωστά στην ινσουλίνη, η οποία μπορεί να συνδυαστεί με σχετικά μειωμένη έκκριση ινσουλίνης. Η μειωμένη αυτή απόκριση στην ινσουλίνη συχνά αναφέρεται ως αντίσταση στην ινσουλίνη. Καθώς η ασθένεια εξελίσσεται, μπορεί επίσης να παρατηρηθεί έλλειψη ινσουλίνης. Αυτός ο τύπος είναι γνωστός ως "μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης" (NIDDM) ή "διαβήτης ενηλίκων". Η ελαττωματική ανταπόκριση των ιστών του σώματος στην ινσουλίνη πιστεύεται ότι οφείλεται στον υποδοχέα της ινσουλίνης.

Πολλά άτομα με διαβήτη τύπου II έχουν ενδείξεις προδιαβήτη (εξασθενημένη γλυκόζη νηστείας και / ή μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη) πριν αρχίσει να εκδηλώνεται η νόσος. Η εξέλιξη του προδιαβήτη σε εμφανή διαβήτη τύπου II μπορεί να επιβραδυνθεί ή να αντιστραφεί από αλλαγές στον τρόπο ζωής, από φάρμακα που βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη ή μειώνουν την παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ. Ο διαβήτης τύπου II οφείλεται κυρίως σε γενετικούς παράγοντες και στον τρόπο ζωής των ασθενών (παχυσαρκία, έλλειψη σωματικής δραστηριότητας, άγχος και αστικοποίηση). Κάποιοι παράγοντες που φαίνεται να συσχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου είναι ορισμένοι διαιτητικοί παράγοντες όπως τα ζαχαρούχα

ποτά καθώς και ο τύπος των λιπαρών οξέων στην διατροφή. Τα κορεσμένα λιπαρά και τα trans λιπαρά αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου ενώ τα πολυακόρεστα και μονοακόρεστα λιπαρά μειώνουν τον κίνδυνο. Τέλος, ανεπιθύμητες εμπειρίες στην παιδική ηλικία, γνωστές ως ACEs (Adverse childhood experiences), όπως κακοποίηση, παραμέληση και οικιακές δυσκολίες, αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης διαβήτη τύπου II αργότερα στη ζωή τους κατά 32%, με την παραμέληση να επιφέρει τις μεγαλύτερες επιπτώσεις [6].

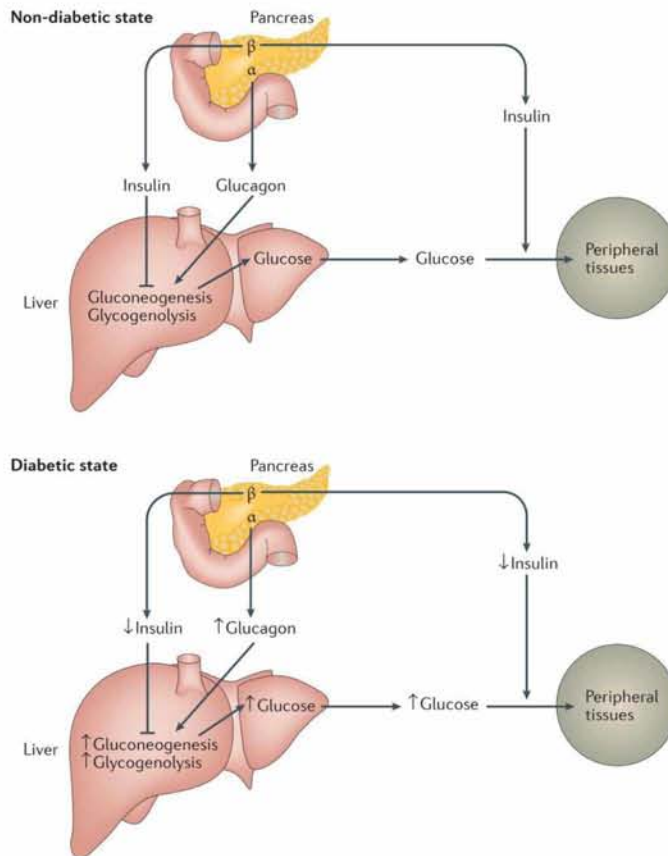
Ομοίσταση της γλυκόζης

1.1.4. Ινσουλίνη – Ρόλος και μεταβολικές αντιδράσεις

Η ινσουλίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που παράγεται από τα βήτα κύτταρα των παγκρεατικών νησίδων και θεωρείται ότι είναι η κύρια αναβολική ορμόνη του σώματος. Παράγεται στο πάγκρεας και απελευθερώνεται όταν ανιχνευτεί κάποιο ερέθισμα, όπως η αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοξέων και της γλυκόζης στο πλάσμα, λόγω της πέψης της τροφής. Χρησιμοποιείται από τα δύο τρίτα περίπου των κυττάρων του σώματος για το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών προωθώντας την απορρόφηση της γλυκόζης από το αίμα στο ήπαρ, το λίπος και τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα. Σε αυτούς τους ιστούς η απορροφούμενη γλυκόζη μετατρέπεται σε γλυκογόνο μέσω γλυκονεογένεσης ή λίπη (τριγλυκερίδια) μέσω λιπογένεσης ή, στην περίπτωση του ήπατος, και στα δύο. Είναι επομένως μια αναβολική ορμόνη, που προάγει τη μετατροπή των μικρών μορίων στο αίμα σε μεγάλα μόρια μέσα στα κύτταρα και συμμετέχει στη σύνθεση των πρωτεϊνών σε μία μεγάλη ομάδα ιστών. Σε περιπτώσεις όπου παρατηρούνται υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης στο αίμα η παραγωγή και η έκκριση γλυκόζης από το ήπαρ αναστέλλεται [6].

Τα βήτα κύτταρα επηρεάζονται από τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα και ανταποκρίνονται εκκρίνοντας ινσουλίνη όταν υπάρχουν υψηλά επίπεδα γλυκόζης, ενώ αναστέλλουν την δράση τους στην αντίθετη περίπτωση. Τα χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα προάγουν τον εκτεταμένο καταβολισμό, κυρίως του αποθεματικού λίπους του σώματος. Η έκκριση ινσουλίνης και γλυκαγόνης ως απόκριση στη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα αποτελούν τον πρωταρχικό μηχανισμό της ομοίστασης της γλυκόζης [6].

Οι υδατάνθρακες, που μπορεί να είναι πολυμερή απλών σακχάρων ή τα ίδια απλά σάκχαρα, εάν περιλαμβάνουν γλυκόζη, τότε αυτή θα απελευθερωθεί στην κυκλοφορία του αίματος και το επίπεδο γλυκόζης θα αρχίσει να αυξάνεται. Στα κύτταρα στόχους, η ινσουλίνη ξεκινά τη μεταγωγή σήματος, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πρόσληψης και αποθήκευσης γλυκόζης. Τέλος, η ινσουλίνη αποικοδομείται, τερματίζοντας την απόκριση [6].



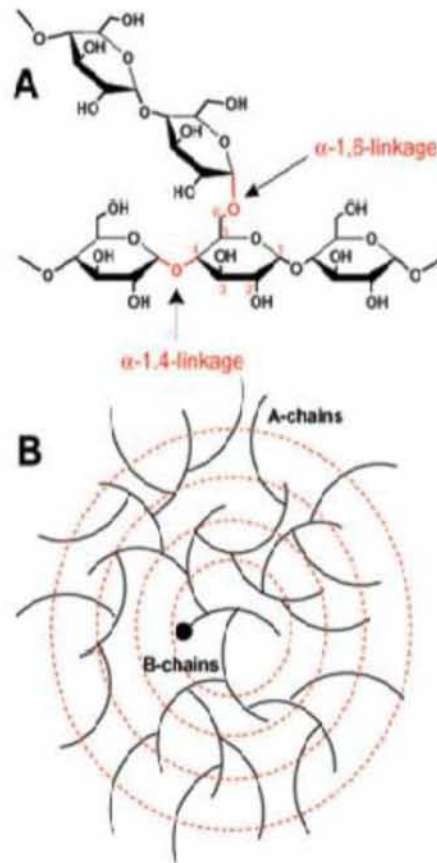
Εικόνα 1: Ομοιόσταση της γλυκόζης σε μη διαβητική και διαβητική κατάσταση. Μετά τη σίτιση, τα παγκρεατικά βήτα κύτταρα απελευθερώνουν ινσουλίνη για την αναστολή της γλυκονεογένεσης και γλυκογονόλυσης στο ήπαρ, μειώνοντας τη γλυκόζη στην κυκλοφορία. Επίσης η ινσουλίνη δρα στους περιφερικούς ιστούς για να αυξήσει την πρόσληψη γλυκόζης, με αποτέλεσμα τη μείωση της γλυκόζης στο αίμα. Κατά τη διάρκεια νηστείας, τα άλφα κύτταρα του παγκρέατος απελευθερώνουν γλυκαγόνη για να αυξήσουν τη γλυκονεογένεση και τη γλυκογονόλυση στο ήπαρ, αυξάνοντας την κυκλοφορία της γλυκόζης στο αίμα. Στη διαβητική κατάσταση, η δράση της ινσουλίνης μειώνεται στο ήπαρ ή / και στους περιφερικούς ιστούς ενώ η δράση της γλυκαγόνης αυξάνεται, οδηγώντας σε αυξημένη ηπατική γλυκονεογένεση και γλυκογονόλυση, αυξημένη απελευθέρωση γλυκόζης στην κυκλοφορία και αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (Amy K. Rines et al., 2016).

1.1.5. Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη, που παράγεται από τα άλφα κύτταρα νησιδίων του παγκρέατος. Λειτουργεί για να αυξήσει τη συγκέντρωση της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία του αίματος, και θεωρείται η κύρια καταβολική ορμόνη του σώματος. Η επίδρασή της είναι αντίθετη με εκείνη της ινσουλίνης, η οποία μειώνει την εξωκυτταρική γλυκόζη. Το πάγκρεας απελευθερώνει γλυκαγόνη όταν η ποσότητα γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος είναι πολύ χαμηλή. Η γλυκαγόνη προκαλεί στο ήπαρ τη μετατροπή του αποθηκευμένου γλυκογόνου σε γλυκόζη, η οποία απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτό γίνεται διότι η γλυκαγόνη ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση στη μεμβράνη των ηπατοκυττάρων και σχηματίζεται κυκλικό AMP. Ενεργοποιείται με αυτό το τρόπο η πρωτεϊνική κινάση A η οποία ενεργοποιεί με τη σειρά της την κινάση της φωσφορυλάσης (PhK) που τελικά ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) η οποία προάγει τη διάσπαση του γλυκογόνου [6].

1.1.6. Γλυκογόνο – Μεταβολισμός του Γλυκογόνου

Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης που χρησιμεύει ως μέσο αποθήκευσης της ενέργειας σε περιόδους ανάγκης στα βακτήρια, τα αρχαία και στον άνθρωπο [27]. Το γλυκογόνο είναι χημικά παρόμοιο του αμύλου, ένα πολυμερές γλυκόζης που λειτουργεί ως μέσο αποθήκευσης ενέργειας στα φυτά. Έχει δομή παρόμοια με την αμυλοπηκτίνη (ένα συστατικό του αμύλου), αλλά είναι ευρύτερα διακλαδισμένο και πιο συμπαγές από το άμυλο. Το γλυκογόνο αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες γλυκόζης με μέσο μήκος αλυσίδας περίπου 8-12 μονάδες γλυκόζης. Οι μονάδες γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους γραμμικά με α -1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Οι κλάδοι σχηματίζονται με α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ της των μονάδων γλυκόζης [7].



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γλυκογόνου. Α) Απεικόνιση των α -1,4 και α -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών. Β) Αναπαράσταση οργάνωσης του γλυκογόνου σε εξωτερικές α -αλυσίδες και εσωτερικές β -αλυσίδες. Με μαύρη κουκίδα απεικονίζεται η θέση της γλυκογονίνης (Roach et al., 2012).

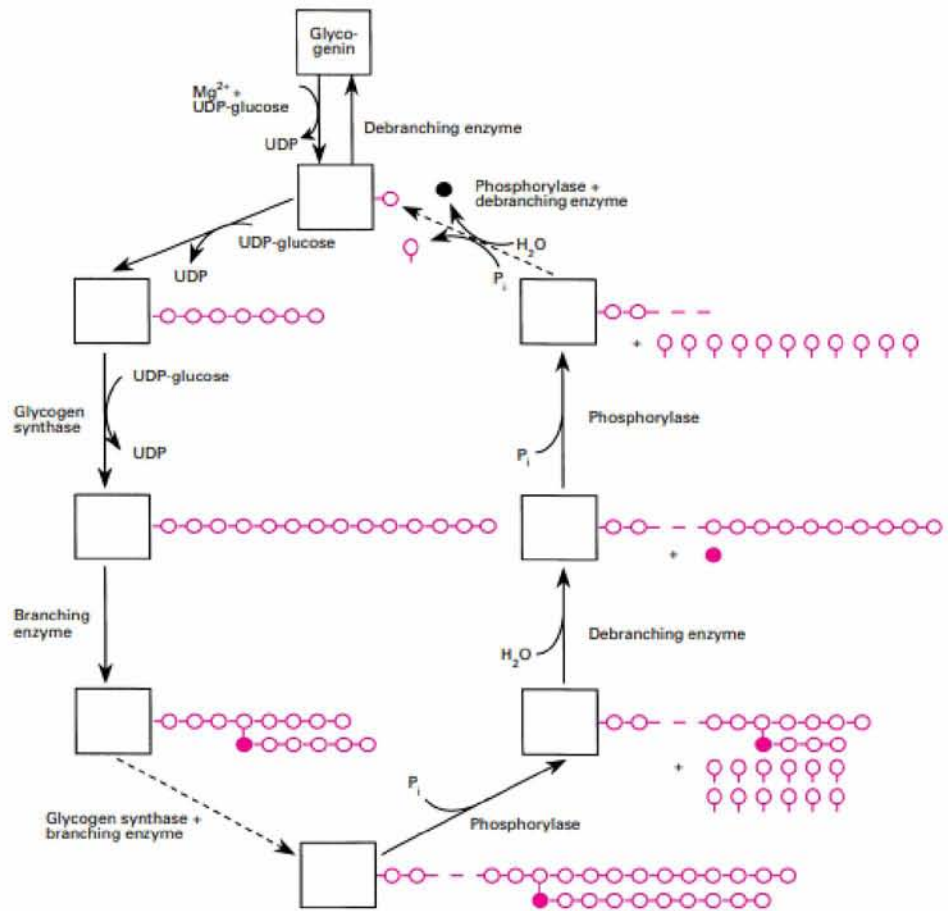
Το γλυκογόνο εντοπίζεται σε δύο μορφές ενεργειακών αποθεμάτων, είτε βραχυπρόθεσμα διαθέσιμο είτε μακροχρόνια διαθέσιμο υπό τη μορφή που αποθηκεύει τριγλυκερίδια στον λιπώδη ιστό (δηλαδή, σωματικό λίπος). Ο καταβολισμός του αυξάνει την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων και ρυθμίζει τα επίπεδα της στο αίμα. Η γλυκόζη από το γλυκογόνο

κινητοποιείται άμεσα αποτελώντας μια ταχεία πηγή ενέργειας στην έντονη και ξαφνική δραστηριότητα. Στους ανθρώπους, το γλυκογόνο παράγεται και αποθηκεύεται κυρίως στα κύτταρα του ήπατος και στους σκελετικούς μύες. Μικρές ποσότητες γλυκογόνου εντοπίζονται επίσης σε άλλους ιστούς και κύτταρα [8].

1.1.6.1. Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Το γλυκογόνο διασπάται σε τρία στάδια στο κυττοσόλιο [8]. Αρχικά η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ξεκινά από τα μη αναγωγικά άκρα της αλυσίδας του γλυκογόνου να διασπά τους α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς παράγοντας 1-φωσφορική γλυκόζη. Η δράση της φωσφορυλάσης σταματά τέσσερα κατάλοιπα γλυκόζης από μία διακλάδωση. Στη συνέχεια το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου μεταφέρει τρία κατάλοιπα γλυκόζης σε ένα άκρο του γλυκογόνου όπου συνδέονται με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς και διασπά τον α -1,6 γλυκοζυτικό δεσμό της διακλάδωσης παράγοντας γλυκόζη. Τέλος, η 1-φωσφορική γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη από τη φωσφογλυκομουτάση.

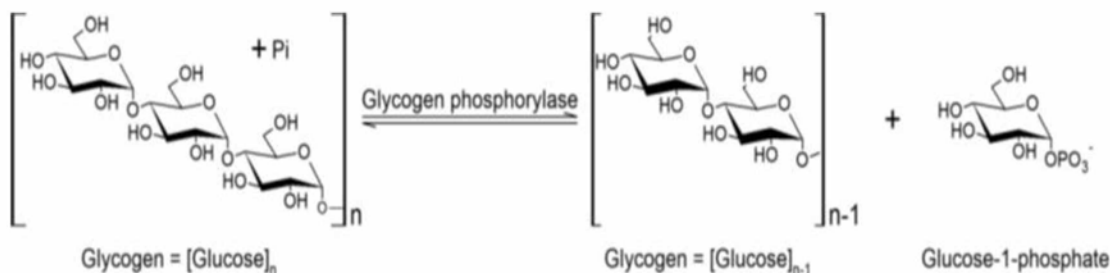
Είναι ένα ένζυμο με βασικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, διασπώντας το γλυκογόνο με την προσθήκη ορθοφωσφορικού (Pi) προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση του δεσμού μέσω της προσθήκης του ορθοφωσφορικού ονομάζεται φωσφορόλυση. Αν και η αντίδραση είναι αναστρέψιμη *in vitro*, εντός του κυττάρου το ένζυμο λειτουργεί μόνο προς την εμπρόσθια κατεύθυνση, επειδή η συγκέντρωση ορθοφωσφορικών ιόντων είναι πολύ υψηλότερη από εκείνη της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου μπορεί να δράσει μόνο σε γραμμικές αλυσίδες γλυκογόνου και σε α -1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς. Για το λόγο αυτό θα σταματήσει αμέσως τέσσερα κατάλοιπα μακριά από τον κλάδο και δεν θα διασπασει τον α -1,6 γλυκοζιτικό δεσμό [8].



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων σύνθεσης και αποδόμησης του γλυκογόνου (Bollen et al., 1998).

Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου συμμετέχει στην αντίδραση κατά την έναρξη της αποικοδόμησης γλυκογόνου και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στόχος νέων αναστολέων που θα να είναι σχετικοί με τον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο διαβήτη τύπου II [16]. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διασπά το γλυκογόνο σε κατάλοιπα 1-φωσφορικής γλυκόζης σύμφωνα με την αντίδραση:



Είναι ένα ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, διασπώντας το γλυκογόνο με την προσθήκη ορθοφωσφορικού (Pi) προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο, ονομάζεται γλυκογονόλυση.

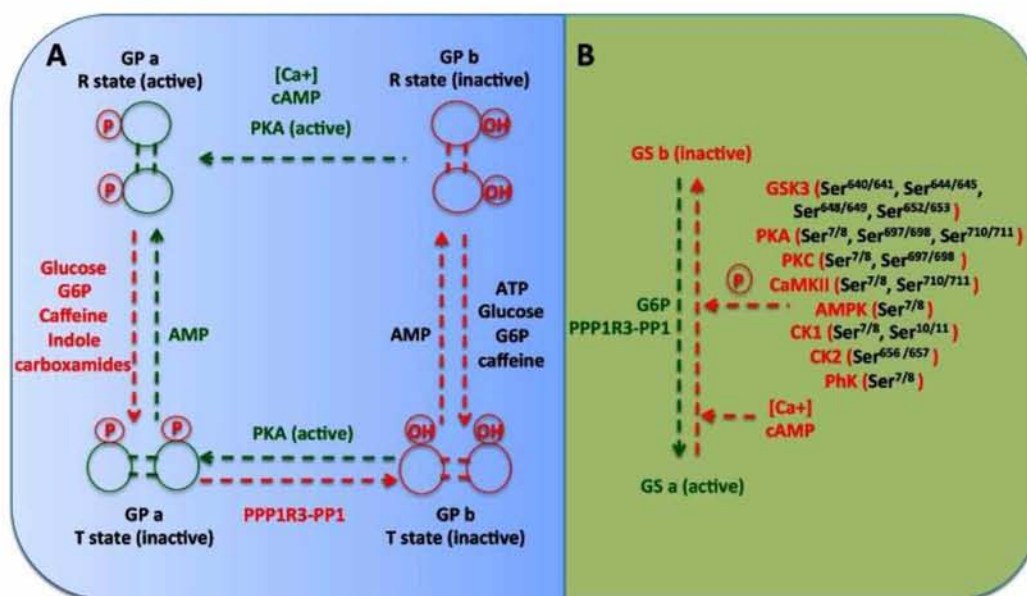
Η φωσφορυλάση εντοπίζεται σε τρεις ισομορφές οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια PYGB, PYGM και PYGL τα οποία εκφράζονται, στον εγκέφαλο, στους μύες και στο ήπαρ αντίστοιχα. Και οι τρεις ισομορφές της φωσφορυλάσης ρυθμίζονται αλλοστερικά με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της σερίνης 14 και με δέσμευση μεταβολιτών. Η ηπατική και η μυϊκή φωσφορυλάση είναι 90% παρόμοιες στην αμινοξική αλληλουχία στον άνθρωπο. Με κριτήριο την αλληλουχία των αμινοξέων, μυϊκή φωσφορυλάση από κονίκλους (rmGb) έχει 97 % ομολογία με την μυϊκή φωσφορυλάση του ανθρώπου (hmGP). Επιπρόθετα, τα τρία ισοένζυμα που εντοπίζονται στον άνθρωπο μοιράζονται μεταξύ τους περίπου 80% με 83% ομολογία στην αλληλουχία της αμινοξικής αλυσίδας, ενώ μεταξύ της μυϊκής και της ηπατικής φωσφορυλάσης δεν υπάρχουν δομικές διαφορές στο καταλυτικό και τα αλλοστερικά κέντρα [18].

Το ένζυμο έχει εξελιχθεί ώστε να είναι ευαίσθητο σε έναν αριθμό διαφορετικών τελεστών που αυξάνουν ή μειώνουν τη δραστηριότητα του. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ήταν το πρώτο ένζυμο που αποδείχθηκε ότι αλλάζει δραστηριότητα αφού φωσφορυλιωθεί. Έτσι υπάρχει σε δύο μορφές, τη φωσφορυλάση α (GP_a) που είναι δραστική και τη φωσφορυλάση β (GP_b) που είναι ανενεργή. Η φωσφορυλάση βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργής κατάστασης R και μιας λιγότερο ενεργής κατάστασης T [9].

Η R διαμόρφωση έχει συγγένεια για αλλοστερικούς τελεστές όπως η AMP. Η T διαμόρφωση έχει μικρότερη συγγένεια για το γλυκογόνο και τα ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi). Η φωσφορυλίωση στη σερίνη 14 και η πρόσδεση του AMP στο "αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης" ευνοεί την κατάσταση R. Αυτό το κέντρο αλλοστερικής

ενεργοποίησης της AMP είναι γειτονικό της θέσης φωσφορυλίωσης και μπορεί να προσδέσει πολλούς φωσφορυλιωμένους προσδέτες, όπως η 6-φωσφορική γλυκόζη, ATP, ADP, IMP, οι οποίοι σταθεροποιούν την κατάσταση T. Τα υποστρώματα Pi και G1P προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο, σταθεροποιώντας την κατάσταση R, ενώ η πρόσδεση γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο σταθεροποιεί την κατάσταση T. Το γλυκογόνο προσδέεται στο κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου ή στο αλλοστερικό κέντρο και ευνοεί την R κατάσταση. Στο αλλοστερικό κέντρο αναστολέων πουρίνης προσδέεται, καφεΐνη και άλλα ανάλογα πουρίνης όπως AMP [19].

Κάθε μορφή του ενζύμου είναι ευαίσθητη σε ένα υποσύνολο ρυθμιστικών τελεστών. Μερικές φορές η αλληλομετατροπή μεταξύ των δύο μορφών της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου συνοδεύεται από αλλαγή στην ολιγομερή της κατάσταση. Η φωσφορυλάση b είναι πιο σταθερή ως τετραμερές και η φωσφορυλάση a ως διμερές. Ανάλογα με το pH και τη θερμοκρασία, η φωσφορυλάση a μπορεί επίσης να εμφανίζεται ως τετραμερές. Αν και παρατηρήθηκε αρκετά νωρίς ότι αυτό το ένζυμο έχει τον συμπράγοντα φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), υπήρξε εκτεταμένη συζήτηση σχετικά με το εάν η PLP συμμετέχει στη χημεία της αντίδρασης. Η πλήρης αφαίρεση της PLP συνοδεύεται από απώλεια δραστηριότητας και επίσης το ένζυμο δεν μπορεί να σχηματίσει διμερές και παραμένει μονομερές [9].



Εικόνα 4: Ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ελέγχεται από φωσφορυλίωση και αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις. Μετατρέπεται σε GPa με φωσφορυλίωση μέσω της κινάσης της φωσφορυλάσης (PhK), ενώ η αποφωσφορυλίωση μέσω πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 επιστρέφει τη φωσφορυλάση στη μορφή GPb. Η GPa και GPb υπάρχουν σε ισορροπία μεταξύ μιας πιο ενεργής κατάστασης R και της λιγότερο ενεργής T κατάστασης. Η AMP κάτω από αλλοστερικό έλεγχο μετατρέπει τις ανενεργές καταστάσεις T (GPa και GPb) σε καταστάσεις R. Αλλοστερικοί αναστολείς όπως ATP, 6-φωσφορική γλυκόζη και καφεΐνη μπορούν να μεταβάλουν την ισορροπία πίσω στις ανενεργές καταστάσεις T της GPb. Συνθάση της 3 κινάσης του γλυκογόνου (GSK3), πρωτεϊνική κινάση A (PKA), πρωτεϊνική κινάση C (PKC), εξαρτώμενη από την καλμοδουλίνη πρωτεΐνη κινάση II (CaMKII), ενεργοποιημένη με AMP πρωτεϊνική κινάση (AMPK), καζεϊνική κινάση 1 (CK1), καζεϊνική κινάση 2 (CK2) και κινάση της φωσφορυλάσης (PhK) απενεργοποιούν τη συνθάση του γλυκογόνου μέσω φωσφορυλίωσης σε διαφορετικές θέσεις. Επίσης, η ATP, η γλυκόζη, η 6-φωσφορική γλυκόζη και η καφεΐνη ενεργοποιούν τη συνθάση του γλυκογόνου, ενώ το ασβέστιο και η cAMP απενεργοποιούν τη

συνθάση του γλυκογόνου. Το πράσινο κείμενο και οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την ενεργοποίηση, ενώ το κόκκινο κείμενο και οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την απενεργοποίηση (Christos E Zois et al., 2016).

1.1.7. Μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση των μυών εντοπίζεται σε δύο μορφές: μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση *a* και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση *b*. Κάθε μία από αυτές τις μορφές υπάρχει σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργής χαλαρής (R) κατάστασης και μιας λιγότερο ενεργής (T), αλλά η ισορροπία για τη φωσφορυλάση *a* ευνοεί την κατάσταση R ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση *b* ευνοεί την κατάσταση T. Η φωσφορυλάση *a* και η φωσφορυλάση *b* έχουν διαφορά σε μία μόνο ομάδα φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Τα αυξημένα επίπεδα επινεφρίνης (που προκύπτουν από φόβο ή από τον ενθουσιασμό της άσκησης) και η ηλεκτρική διέγερση των μυών οδηγεί σε φωσφορυλίωση του ενζύμου στη φωσφορυλάση σε μορφή *a* [8].

Η σύγκριση των δομών της *a* και της *b* δείχνει ότι οι δομικές αλλαγές στις επιφάνειες επαφής των υπομονάδων μεταδίδονται στο ενεργό κέντρο. Η αλλαγή από την κατάσταση T (φωσφορυλάση *b*) στην κατάσταση R (φωσφορυλάση *a*) εμπεριέχει περιστροφή 10 μοιρών γύρω από τον άξονα του διμερούς. Το πιο σημαντικό, αυτή η μετάβαση σχετίζεται με δομικές αλλαγές σε α έλικες που μετατοπίζουν ένα βρόχο έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδος. Η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή επειδή η καταλυτική θέση είναι μερικώς αποκλεισμένη. Αντιθέτως η κατάσταση R έχει τη καταλυτική θέση πιο προσβάσιμη και η θέση σύνδεσης του ορθοφωσφορικού ιόντος είναι καλά οργανωμένη [8].

Η ισορροπία μεταξύ της μορφής T και της R, της φωσφορυλάσης *b* επηρεάζεται από την απόκριση στις συνθήκες του κυττάρου. Η φωσφορυλάση *b* είναι ενεργή παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία συνδέεται με μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίων και σταθεροποιεί τη διαμόρφωση της φωσφορυλάσης *b* στην κατάσταση R. Η ATP έχει δράση αρνητικού αλλοστερικού τελεστή που ανταγωνίζεται το AMP και ευνοεί έτσι την κατάσταση T. Η μετάβαση της φωσφορυλάσης *b*, από την T στην R κατάσταση και αντίστροφα, ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Η φωσφορυλάση *b* δεν είναι πάντα ανενεργή στους μύες, καθώς μπορεί να ενεργοποιηθεί αλλοστερικά από την AMP. Η αύξηση της συγκέντρωσης AMP, η οποία συμβαίνει κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης, σηματοδοτεί τη ζήτηση ενέργειας. Η AMP ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση *b* αλλάζοντας τη διαμόρφωσή της από τη T σε R μορφή. Αυτή η διαμόρφωση έχει παρόμοιες ενζυμικές ιδιότητες με το φωσφορυλιωμένο ένζυμο. Η αύξηση της συγκέντρωσης ATP αντιτίθεται σε αυτήν την ενεργοποίηση, μετατοπίζοντας την AMP από τη θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίων, υποδεικνύοντας επαρκή αποθέματα ενέργειας. Αντίθετα, η φωσφορυλάση *A* είναι πλήρως ενεργή, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της ATP, της AMP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης [8].

Στους μύες, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ενεργοποιείται από ορμόνες και νευρικά σήματα όπως η επινεφρίνη, που διεγείρουν την κινάση της φωσφορυλάσης

που φωσφορυλιώνει τη σερίνη 14 της πρωτεΐνης (φωσφορυλάση a). Ένας δεύτερος αγγελιοφόρος κυκλικού AMP (cAMP) αυξάνει τη συγκέντρωση του λόγω επινεφρίνης ή γλυκαγόνης, και αυτή η αύξηση οδηγεί σε ένα ενζυμικό καταρράκτη. Η ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφορυλάσης οφείλεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις Ca^{2+} ή από τη φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση A που εξαρτάται από το cAMP. Η ενεργοποιημένη κινάση με τη σειρά της ενεργοποιεί το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με φωσφορυλίωση της σερίνης 14 [8].

1.1.8. Ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών ως συνέπεια του ρόλου του ήπατος στην ομοίωση της γλυκόζης για τον οργανισμό στο σύνολό του. Στους ανθρώπους, η φωσφορυλάση του ήπατος και η φωσφορυλάση των μυών είναι περίπου 90% ταυτόσημες στην αμινοξική αλληλουχία. Οι διαφορές οδηγούν σε λεπτές αλλά σημαντικές αλλαγές στη σταθερότητα διαφόρων μορφών του ενζύμου. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η φωσφορυλάση a αλλά όχι η b στο ήπαρ, εμφανίζει την πλέον ανταποκρινόμενη μετάβαση από τη T προς την R κατάσταση. Η γλυκόζη αφού δεσμευτεί, μετατοπίζει την αλλοστερική ισορροπία της μορφής a από την R στην T κατάσταση και απενεργοποιεί το ένζυμο. Σκοπός της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι να παράγει γλυκόζη η οποία εξάγεται σε ιστούς όταν το επίπεδο γλυκόζης είναι χαμηλά στο αίμα, άρα η γλυκόζη λειτουργεί ως μόριο αρνητικής ρύθμισης της φωσφορυλάσης a. Ως εκ τούτου, εάν υπάρχει ελεύθερη γλυκόζη από κάποια άλλη πηγή όπως η δίαιτα, δεν χρειάζεται να κινητοποιηθεί το γλυκογόνο. Σε αντίθεση με το ένζυμο στους μύες, η φωσφορυλάση του ήπατος δεν είναι ευαίσθητη στη ρύθμιση από το AMP επειδή το ήπαρ δεν υφίσταται τις δραματικές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο που παρατηρείται σε έναν συστέλλοντα μυ [8].

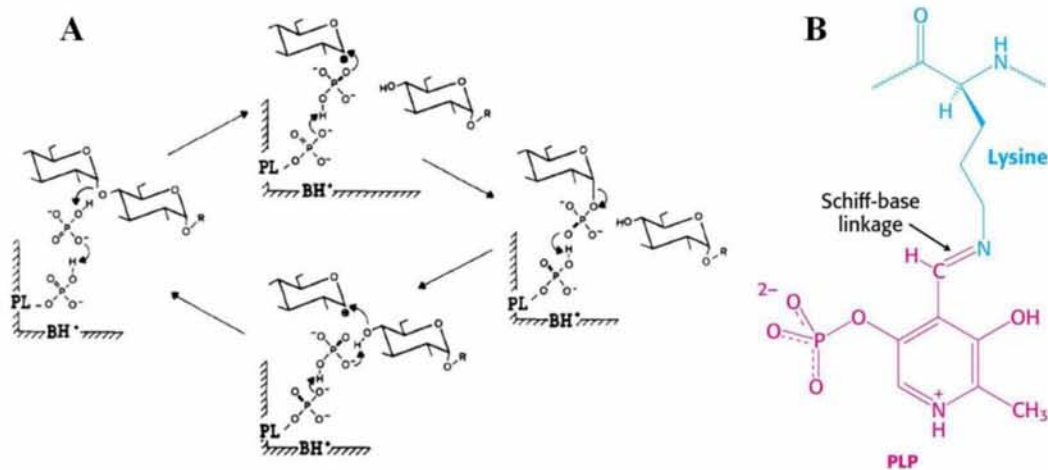
1.1.9. Μηχανισμός κατάλυσης της GP και ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης

Η φωσφορυλάση διάσπά το γλυκογόνο φωσφορολυτικά και όχι υδρολυτικά ώστε να μην χρησιμοποιεί ATP για να φωσφορυλιώσει την ελεύθερη γλυκόζη, με αποτέλεσμα να υπάρχει εξοικονόμηση της ATP. Αυτή η διάσπαση απαιτεί να εξαιρείται από το ενεργό κέντρο το νερό. Αρκετές ενδείξεις δίνουν πληροφορίες όσον αφορά τον μηχανισμό που επιφέρει η φωσφορυλάση αποκλεισμό του νερού. Τόσο το υπόστρωμα γλυκογόνου όσο και το προϊόν, 1-φωσφορικής γλυκόζης, έχουν τη διαμόρφωση α στο C-1 (ο χαρακτηρισμός α σημαίνει ότι το άτομο οξυγόνου που συνδέεται στο C-1 είναι κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Εάν στο C-1 ενός σακχάρου υπάρξει άμεση προσβολή της φωσφορικής ομάδας, θα δημιουργούνταν αναστροφή της διαμόρφωσης σε αυτόν τον άνθρακα διότι η αντίδραση θα συνεχιζόταν μέσω μιας πεντασθενούς μετάβατικής κατάστασης. Επειδή το μόριο της 1-φωσφορικής γλυκόζης έχει διαμόρφωση α και όχι β, είναι απαραίτητα κάποια

βήματα (δύο). Ο σχηματισμός ενός ενδιάμεσου καρβοκατιόντος αποτελεί καλύτερη εξήγηση για αυτά τα αποτελέσματα [8].

Ο καταλυτικός μηχανισμός της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου περιλαμβάνει τη φωσφορική πυριδοξάλη ως μέρος αυτού. Το βασικότερο βήμα σε αυτές τις αντιδράσεις, είναι η δημιουργία της βάσης Schiff, μεταξύ της φωσφορικής πυριδοξάλης και του αμινοξέος. Το ένζυμο της PLP δρα ως συνένζυμο σε αντιδράσεις τρανσαμιδοποίησης, και σε ορισμένες αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης, απαμίνωσης και ρακεμοποίησης αμινοξέων. Η ομάδα αλδεϋδης της PLP σχηματίζει μια βάση Schiff (εσωτερική αλδιμίνη) με την ε-αμινομάδα μιας συγκεκριμένης ομάδας λυσίνης (λυσίνη 680) του ενζύμου. Για την εμφάνιση καταλυτικής δραστηριότητας είναι απαραίτητη η παρουσία αυτού του δεσμού. Η φωσφορική πυριδοξάλη φαίνεται να συμμετέχει στην κατάλυση και να παρέχει υποστήριξη στη φυσική δομή του ενζύμου, κάτι που αποδείχθηκε με διαφορετικά χημικά ανάλογα της, τα οποία είχαν υποστεί τροποποιήσεις για κάθε μία θέση γύρω από τον δακτύλιο πυριδίνης [17].

Παρακάτω παρατίθεται ένας μηχανισμός για την αντίδραση φωσφορυλάσης ο οποίος προσφέρει μια εξήγηση για τον ουσιαστικό ρόλο της φωσφορικής πυριδοξάλης στη φωσφορυλάση γλυκογόνου (Εικόνα 5). Προς την εμπρός κατεύθυνση, η φωσφορυλίωση των α-1,4 γλυκοσιδικών δεσμών σε ολιγοσακχαρίτες ή πολυσακχαρίτες ξεκινά από πρωτονίωση του γλυκοσιδικού οξυγόνου από το ορθοφωσφορικό υπόστρωμα ακολουθούμενη από σταθεροποίηση του αρχικού ιόντος οξοκαρβονίου και επακολουθεί ομοιοπολική σύνδεση για σχηματισμό 1-φωσφορικής-α-γλυκόζης. Στην αντίστροφη κατεύθυνση, η πρωτονίωση του φωσφορικού άλατος της 1-φωσφορικής γλυκόζης αποσταθεροποιεί τον γλυκοσιδικό δεσμό και προάγει τον σχηματισμό ενός οξοκαρβονίου γλυκοσυλίου ιόντο-φωσφορικού άλατος. Στο επόμενο στάδιο, το φωσφορικό ανιόν διευκολύνει την πυρηνόφιλη προσβολή ενός τελικού γλυκοζυλικού καταλοίπου στο ιόν καρβονίου επιφέροντας σχηματισμό α-1,4 γλυκοσιδικού δεσμού και επιμήκυνση των εκκινητών. Τόσο στις εμπρόσθιες όσο και στις αντίστροφες αντιδράσεις, το φωσφορικό άλας του συμπαραγόντα της φωσφορικής πυριδοξάλης δρα ως γενικό οξύ (PL- OPO_3H^- ή PL- OPO_3^{2-}) και πρωτονιώνει το φωσφορικό υπόστρωμα, που λειτουργεί ως μεταφορέας πρωτονίων. Έτσι στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, φωσφορικά άλατα που αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους έχουν αντικαταστήσει ένα ζεύγος αμινοξέων των καρβοξυλικών ομάδων, τα οποία μετέχουν στην κατάλυση υδατανθράκων [10].



Εικόνα 5: Α) Ο τρόπος που η φωσφορική πυριδοξάλη λαμβάνει μέρος στην αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Το σχήμα της αντίδρασης δείχνει την αναστρεψιμότητα της φωσφορόλυσης των ολιγοσακχαριτών (R) παρουσία ορθοφωσφορικού (Pi) (στο επάνω μισό) και την σύνθεση παρουσία 1-φωσφορικής γλυκόζης (στο κάτω μισό), BH⁺ = πρωτονιωμένη βάση που παρέχεται από το πρωτεϊνικό ένζυμο, PL = πυριδοξάλη [29]. Β) Δεσμός μορφής βάσης Schiff που σχηματίζει η φωσφορική πυριδοξάλη. Η PLP (ροζ χρώμα) σχηματίζει μια βάση Schiff με την λυσίνη 680 (γαλάζιο χρώμα) του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου [8].

1.1.10. Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι βιολογικά ενεργή ως διμερές μόριο δύο πανομοιότυπων υπομονάδων, ενώ μπορεί να υπάρχει ως ανενεργό μονομερές ή τετραμερές. Το καθένα μονομερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι μια μεγάλη πρωτεΐνη, αποτελούμενη από 842 αμινοξέα με μάζα 97,434 kDa. Η κάθε υπομονάδα συντίθεται από δύο περιοχές, μία καρβοξυτελική και μία αμινοτελική δομική περιοχή. Η αμινοτελική περιοχή αποτελείται από 480 αμινοξέα ενώ η καρβοξυτελική περιοχή από 360 αμινοξέα. Το διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχει πολλές περιοχές βιολογικής σημασίας στην αμινοτελική περιοχή, συμπεριλαμβανομένων του κέντρου δέσμευσης γλυκογόνου, αλλοστερικών θέσεων ενεργοποίησης AMP και ενός αναστρέψιμου φωσφορυλιωμένου καταλοίπου σερίνης (σερίνη 14). Το συνένζυμο φωσφορική πυριδοξάλη προσδένεται σε μία θέση στη καρβοξυτελική περιοχή και σε συνεργασία με την αμινοτελική περιοχή δημιουργούν το καταλυτικό κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μια σχισμή που καλύπτεται από μια πύλη, η οποία αποτελείται από κατάλοιπα της αμινοτελικής περιοχής [8, 19].

Εντοπίζονται έξι διαφορεικά κέντρα πρόσδεσης στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, τα οποία είναι τα ακόλουθα: το αλλοστερικό κέντρο, το νέο αλλοστερικό κέντρο, το καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου και το κέντρο πρόσδεσης της κερσεΐνης [1].

1.1.10.1. Καταλυτικό κέντρο

Η καταλυτική θέση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, συμπεριλαμβάνει το συνένζυμο φωσφορική πυριδοξάλη, βρίσκεται στο κέντρο κάθε μίας υπομονάδας του ενζύμου 15 Å από την επιφάνεια της πρωτεΐνης και από τη περιοχή διεπαφής μεταξύ των δύο υπομονάδων ενώ καθίσταται προσβάσιμο στο διαλύτη μέσα από ένα κανάλι με μήκος 15 Å. Αυτή η έλλειψη εύκολης πρόσβασης της καταλυτικής θέσης στην επιφάνεια είναι σημαντική διότι καθιστά την πρωτεϊνική δραστηριότητα πολύ ευαίσθητη στη ρύθμιση, καθώς μικρές αλλοστερικές επιδράσεις θα μπορούσαν να αυξήσουν σημαντικά τη σχετική πρόσβαση του γλυκογόνου στη θέση. Ο καταλυτικός μηχανισμός εξαρτάται από την εγγύτητα του συμπαραγόντα και το φωσφορικό υπόστρωμα που προωθούνται από τις γύρω ομάδες στις πρωτεΐνες που σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση και δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον για τη διάσπαση του γλυκοσιδικού δεσμού. Αν και αυτό μπορεί να επιτευχθεί στην κατάσταση T με μικρό υπόστρωμα επτενιτόλης, μετατόπιση του βρόχου 280s απαιτείται για να επιτρέπεται η πρόσβαση με τα μεγαλύτερα υποστρώματα του ολιγοσακχαρίτης ή γλυκογόνου. Μελέτες πειραμάτων μοντέλων δείχνουν ότι ακόμη και με ανοικτό το καταλυτικό κέντρο υπάρχει ανάγκη για ασυνήθιστη διαμόρφωση του πρώτου και δεύτερα σακχάρου. Η διαμόρφωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης δεσμευμένης στην κατάσταση R της GPb είναι παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε για τη T κατάσταση της GPb. Δεν υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση με το φωσφορικό συμπαραγόντα, αν και η κατάσταση R η Arg569 είναι έτοιμη στο καταλυτικό κέντρο για να σταθεροποιήσει μια τέτοια αλληλεπίδραση. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με πειράματα ανταλλαγής ισοτόπων θέσης, που έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει ανταλλαγή, εκτός εάν υπάρχει επίσης ως συνιστώσα ο ολιγοσακχαρίτης. Μόνο όταν το τριμερές σύμπλοκο σχηματίζεται μεταξύ ενζύμου, 1-φωσφορικής γλυκόζης και ολιγοσακχαρίτη (ή γλυκογόνου) η σωστή παράθεση των φωσφορικών προωθείται και πραγματοποιείται κατάλυση [1,11].

1.1.10.2. Κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου και περίπου 12 Å από αυτό. Το κέντρο δεσμεύει ανάλογα πουρίνης ή άλλες σχετικές ενώσεις ετεροκυκλικού δακτυλίου όπως αδενοσίνη, καφεΐνη, FMN, NADH και AMP σε υψηλές συγκεντρώσεις (> 2 mM). Οι ενώσεις αυτές παρεμβάλλονται μεταξύ δύο αρωματικών δακτυλίων Phe285 και Tyr613 και σταθεροποιούν τη θέση του βρόχου 280s στην T στερεοδιαμόρφωση. Η καφεΐνη ($K_i = 0,1 \text{ mM}$) και η γλυκόζη ($K_i = 1,7 \text{ mM}$) αναστέλλουν τόσο την GPa όσο και GPb συνεργικά, με κάθε ένωση να προωθεί τη δέσμευση του άλλου μορίου (σταθερά αλληλεπίδρασης $\alpha = 0,2$). Η φυσιολογική σημασία αυτού του κέντρου δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί από έναν μη αναγνωρισμένο συνδέτη για την ενίσχυση των αποτελεσμάτων του ελέγχου της φωσφορυλάσης του ήπατος από τη γλυκόζη, πιθανώς ως απόκριση στην ινσουλίνη [11].

Όπως έχει αναφερθεί η φωσφορυλάση εμφανίζει έλεγχο από συνδέτες σε έξι κέντρα δέσμευσης. Αυτά τα κέντρα κατανέμονται στο ένζυμο, με τους προσδεμένους συνδέτες να επιτυγχάνουν διαφορετικά αποτελέσματα μέσω επικοινωνίας μακράς εμβέλειας. Κάθε ένας από αυτούς τους μηχανισμούς μπορεί να γίνει κατανοητός με βάση την υπόθεση των Monod, Wyman και Changeux: Τελεστές που σταθεροποιούν την κατάσταση T, είτε μέσω δράσης στο βρόχο 280s (π.χ. γλυκόζη ή καφεΐνη) είτε περιορίζοντας την αλλαγή στη διεπαφή cap / a2 (π.χ. 6-φωσφορική γλυκόζη) αναστέλλουν το ένζυμο. Αυτοί οι προσδέτες που προωθούν την κατάσταση R είτε μέσω αλλαγών στην τριτογενή και τεταρτοταγή δομή στη διεπαφή cap / a2 (π.χ. Ser-P και AMP) είτε μέσω μετατόπισης του βρόχου 280s (π.χ. φωσφορικό άλας στο καταλυτικό κέντρο) ενεργοποιούν το ένζυμο. Υπάρχουν τέσσερις θέσεις αναγνώρισης φωσφορικών. Εκείνες που εμπλέκονται στη δέσμευση χαρακτηρίζονται από δύο κατάλοιπα αργινίνης (Arg43 και Arg69 για το αλλοστερικό κέντρο Ser-P, Arg309 και Arg310 για τον αλλοστερικό κέντρο AMP) [11].

1.1.10.3. Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου

Οι δομικές μελέτες για την T κατάσταση της GPa και GPb έχουν χαρακτηρίσει ένα κέντρο δέσμευσης γλυκογόνου στην επιφάνεια του ενζύμου, το οποίο επιτρέπει στην πρωτεΐνη να συνδέεται ομοιοπολικά στην αλυσίδα γλυκογόνου, απέχει περίπου 30 Å από τα καταλυτικά και αλλοστερικά κέντρα και σχηματίζεται από ένα υποτομέα αποτελούμενο από τα κατάλοιπα 397 έως 437. Πιο συγκεκριμένα αποτελείται από ένα βρόχο που συνδέει δύο αντιπαράλληλους κλώνους (κατάλοιπα 430-432 και 437-411) και δύο έλικες (κατάλοιπα 396-418 και 420-439). Η σταθερά διαχωρισμού για μαλτοεπταόζη που είναι συνδεόμενη στη θέση αποθήκευσης (περίπου 1 mM) είναι 20 φορές μικρότερη από τη Km για ολιγοσακχαρίτη στην καταλυτική θέση. Οι κρυσταλλικές μορφές R κατάστασης της GPb και GPa περιέχουν το ένζυμο στην τετραμερή κατάσταση και μέρος της επαφής διμερούς-διμερούς περιλαμβάνει τα κατάλοιπα Arg426, Glu433, Gly434 και Ala435 του κέντρου αποθήκευσης γλυκογόνου. Το γλυκογόνο προάγει τη διάσπαση των τετραμερών σε διμερή μέσω ανταγωνισμού για δέσμευση στο κέντρο αποθήκευσης [1,11].

1.1.10.4. Αλλοστερικό κέντρο

Τα δομικά στοιχεία που εμπεριέχονται και στις δύο υπομονάδες του λειτουργικού διμερούς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, συνδέονται σε δύο θέσεις, σε αντίθετες πλευρές του ενζύμου και δημιουργούν το αλλοστερικό κέντρο. Το αλλοστερικό κέντρο απέχει περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο [1].

Προσδέτες του αλλοστερικού κέντρου αποτελούν φωσφορυλιωμένοι μόρια όπως AMP, ATP, IMP, NADH, UDP-γλυκόζη, 6-φωσφορική γλυκόζη, β-γλυκεροφωσφορικό και ορθοφωσφορικά ιόντα. Τα AMP και η IMP δρουν ως ενεργοποιητές την GPb με την AMP να είναι έχει ισχυρότερη δράση ενεργοποίησης από την IMP. Αντίθετα το ATP, η UDP-γλυκόζη και η 6-φωσφορική γλυκόζη

προκαλούν αναστολή του ενζύμου και το σταθεροποιούν στην κατάσταση T. Ο πιο ισχυρός φυσικός αναστολέας της GPb, αποτελεί η 6-φωσφορική γλυκόζη η οποία συνδέεται στο αλλοστερικό κέντρο ($K_d=20-70 \mu\text{M}$ για GPb, $K_d=1.7 \text{ mM}$ την GPa). Οι προσδέτες του αλλοστερικού κέντρου αναστέλλουν τη δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με δύο τρόπους. Είτε μέσω ανταγωνισμού της AMP, που είναι ο φυσιολογικός ενεργοποιητής, είτε μέσω σταθεροποίησης της ανενεργού κατάστασης T του ενζύμου [1].

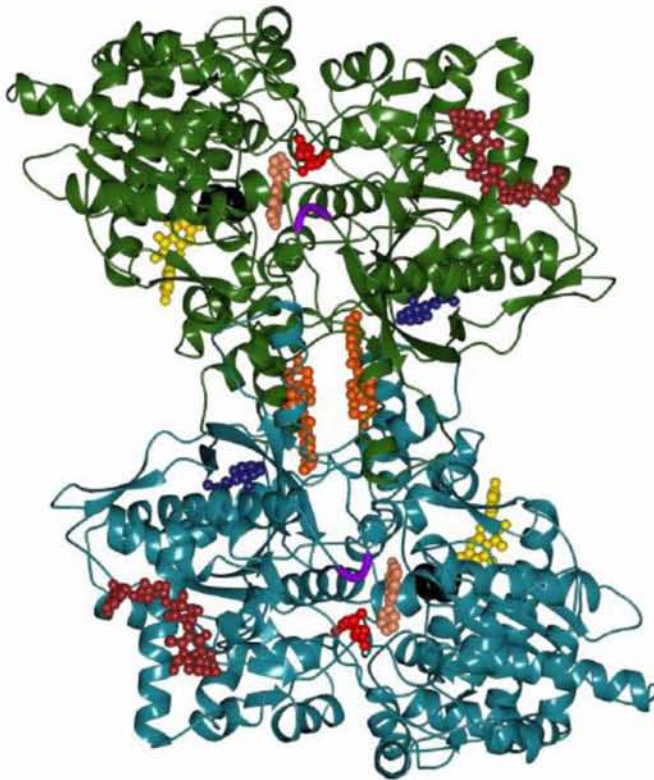
1.1.10.5. Νέο αλλοστερικό κέντρο

Κατά την μελέτη της αναστολής που προκαλεί η χημική ένωση CP320626 στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, από τους Οϊκοπομακος και συνεργάτες [27], ανακαλύφθηκε το νέο αλλοστερικό κέντρο. Η CP320626 δεν έχει εμφανή δομική σχέση με οποιαδήποτε από τις φυσιολογικές ενώσεις που συνδέονται στα ήδη γνωστά κέντρα που έχουν αναφερθεί παραπάνω. Για να διερευνηθεί πώς αυτή και σχετικές ενώσεις δεσμεύονται στη GP, μελέτησαν τη δομή του συν-κρυσταλλωμένου σύμπλοκου GPb – CP320626. Η δομή αυτή αποκάλυψε μια νέα αλλοστερική θέση που δεν είχε προηγουμένως προσδιοριστεί και η οποία εντοπίζεται στο κέντρο της κοιλότητας του διμερούς ενζύμου που σχηματίζεται από δύο υπομονάδες [27]. Στο νέο αλλοστερικό κέντρο η κεντρική κοιλότητα δημιουργείται στο πρώτο άκρο από τον $\alpha 7$ πύργο ελίκων (Asn270, Glu273, Ser276 και τα συμμετρικά τους ισοδύναμα) και στο δεύτερο άκρο από κατάλοιπα της cap περιοχής και $\alpha 2$ έλικες (Arg33, His34, Arg60 και Asp61). Το κέντρο αυτό απέχει 33 Å από το καταλυτικό κέντρο, 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Το ινδόλιο αποτελεί τον πιο ισχυρό φυσικό αναστολέα του νέου κέντρου. Αναστολείς που συνδέονται σε αυτό το κέντρο λειτουργούν σε συνέργεια με άλλους αναστολείς (π.χ. γλυκόζη), σταθεροποιούν την κατάσταση T (ανενεργή), δρώντας ως κλασικοί αλλοστερικοί αναστολείς [28].

1.1.10.6. Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Kantsadi et al., 2014, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, υπέδειξε πως η φλαβοπυριδόλη και η χρυσίνη συνδέονται μόνο στο αλλοστερικό κέντρο, η κερσετίνη δεσμεύεται σε ένα άλλο, νέο κέντρο. Αυτό το κέντρο βρίσκεται 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 32 Å από το κέντρο αναστολής και 15 Å από το ενεργό κέντρο (Kantsadi et. al., 2014). Τα κατάλοιπα της C-περιοχής (Lys544, Tyr548, Arg551, Lys665) και τα κατάλοιπα της N-περιοχής (Glu120, Glu123) σχηματίζουν το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης. Η ανάλυση δομής της διαμόρφωσης T και της διαμόρφωσης R, στο σύμπλοκο κερσετίνης–rmGPb και της μη δεσμευμένης rmGPb υπέδειξαν σημαντικές διαφορές στην ενεργό διαμόρφωση R, ενώ για την ανενεργό διαμόρφωση T οι διαφορές ήταν μικρές. Επιπρόσθετα, παρατηρείται ότι η κερσετίνη, όταν προσδεθεί, έχει θετική δράση στη διαμόρφωση T, καθώς σταθεροποιεί τη διαμόρφωση του βρόχου

(κατάλοιπα 548-556) [1].



Εικόνα 6: Κρυσταλλική δομή της GPb με τα έξι κέντρα πρόσδεσης. Καταλυτικό κέντρο (*), κέντρο αναστολής (*), κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου (*), αλλοστερικό κέντρο (*), νέο αλλοστερικό κέντρο (*), κέντρο πρόσδεσης της κερασεΐνης (*).

1.1.11. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων

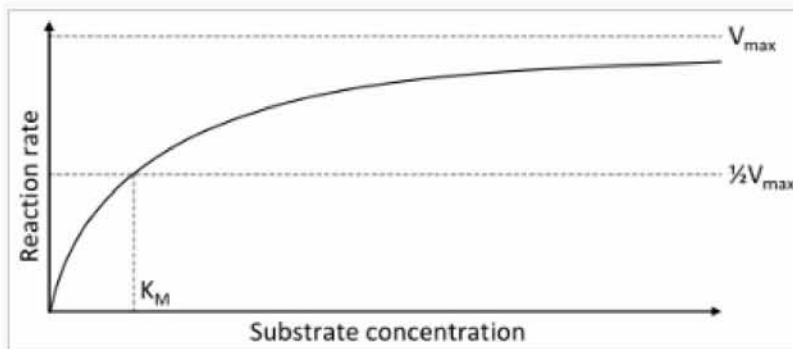
Η ρύθμιση της παραγωγής ηπατικής γλυκόζης μέσω γλυκογονόλυσης είναι ένας σημαντικός στόχος αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II. Η γλυκογονόλυση καταλύεται στο ήπαρ, στους μύες και στον εγκέφαλο από ισόμορφες της φωσφορυλάσης γλυκογόνου (GP) [20]. Η ύπαρξη της φωσφορυλάσης σε αυτές τις τρεις μορφές κάνει επιτακτική την ανάγκη επιλεκτικότητας των φαρμάκων που θα χρησιμοποιηθούν για την αναστολή σε κάθε μία ισομορφή του ενζύμου. Ειδικότερα, όσο αναφορά το σάκχαρο στο αίμα, για να επιτευχθεί μείωση στα επίπεδα του, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν το ισοένζυμο του ήπατος αφήνοντας ανεπηρρέαστες τις ισομορφές στον εγκέφαλο και στους μύες [21]. Λόγω του κεντρικού της ρόλου στον μεταβολισμό του γλυκογόνου, η GP έχει αξιοποιηθεί ως μοντέλο σχεδιασμού ισχυρών αναστολέων οι οποίοι μπορεί να σχετίζονται με τον έλεγχο των συγκεντρώσεων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών με διαβήτη τύπου 2 [20].

Παρά τη μεγάλη διαθεσιμότητα διαφορετικών κατηγοριών αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων, οι θεραπευτικές αγωγές συχνά δεν είναι σε θέση να επιτύχουν σε έναν ικανοποιητικό βαθμό έλεγχο της γλυκόζης, που είναι γνωστό ότι μειώνει

αποτελεσματικά την επίπτωση και τη σοβαρότητα των διαβητικών επιπλοκών. Η παραγωγή ηπατικής γλυκόζης είναι αυξημένη σε διαβητικούς ασθενείς τύπου II. Η φωσφορυλάση καταλύει την απελευθέρωση ηπατικής γλυκόζης και πρόσφατες μελέτες σε νέους αναστολείς αυτού του ενζύμου, επέτρεψαν την έρευνα, που οριοθετεί περαιτέρω τις φαρμακολογικές και φυσιολογικές συνέπειες που αναστέλλουν της παραγωγής γλυκόζης μέσα από αυτήν την οδό. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τη μελέτη των Treadway JL. και συνεργατών αυτοί οι παράγοντες αναστολής μειώνουν τη γλυκόζη σε διαβητικά ζωικά μοντέλα και φαίνεται να επηρεάζουν τόσο τις γλυκογονικές όσο και τις γλυκογονολυτικές οδούς. Σε επαγόμενα μοντέλα διαβήτη σε ποντικούς, η χορήγηση αναστολέων φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GPIs) έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη δραστηριότητα της ηπατικής φωσφορυλάσης και ότι εξασθενεί σε μεγάλο βαθμό την υπεργλυκαιμία χωρίς να προκαλεί υπογλυκαιμία. Επίσης αυτοί οι αναστολείς έχουν αποδειχθεί ότι είναι πιο ισχυροί στη μείωση της παραγωγής ηπατικής γλυκόζης, παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης, προστατεύοντας έτσι από την υπογλυκαιμία ανάκαμψης. Αθροιστικά, αυτές οι πληροφορίες έχουν ενισχύσει το ενδιαφέρον για εύρεση νέων αναστολέων φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GPIs) με δράση ως δυνητικούς νέους υπογλυκαιμικούς παράγοντες για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 [12].

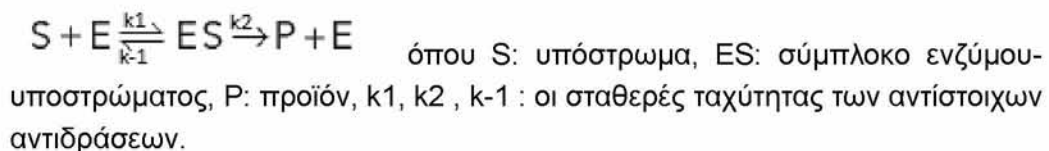
Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Η αντίδραση που καταλύεται από ένα ένζυμο χρησιμοποιεί ακριβώς τα ίδια αντιδραστήρια και παράγει ακριβώς τα ίδια προϊόντα με μία μη καταλυόμενη αντίδραση. Τα ένζυμα όπως και άλλοι καταλύτες, δεν μεταβάλλουν τη θέση ισορροπίας μεταξύ υποστρωμάτων και προϊόντων. Ωστόσο, σε αντίθεση με τις μη καταλυόμενες χημικές αντιδράσεις, οι αντιδράσεις που καταλύονται με ένζυμα εμφανίζουν κινητική κορεσμού. Για μια δεδομένη συγκέντρωση ενζύμου και για σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται γραμμικά με τη συγκέντρωση υποστρώματος. Τα μόρια ενζύμου είναι σε μεγάλο βαθμό ελεύθερα να καταλύσουν την αντίδραση, και η αύξηση της συγκέντρωσης υποστρώματος σημαίνει αύξηση της ταχύτητας με την οποία τα μόρια ενζύμου και υποστρώματος συναντώνται το ένα με το άλλο. Ωστόσο, σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, ο ρυθμός αντίδρασης προσεγγίζει ασυμπτωτικά το θεωρητικό μέγιστο. Καθώς οι αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα είναι κορεσμένες, η ταχύτητα κατάλυσής τους δεν δείχνει γραμμική ως προς την αύξηση του υποστρώματος. Εάν η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης $[V_0]$ μετριέται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων υποστρώματος $[S]$, ο αρχικός ρυθμός αντίδρασης $[V_0]$ αυξάνεται καθώς το $[S]$ αυξάνεται γραμμικά, όπως φαίνεται στην εικόνα 4 . Ωστόσο, καθώς η συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$ αυξάνεται, το ένζυμο είναι κορεσμένο με το υπόστρωμα και η αρχική ταχύτητα φτάνει στο V_{max} , τη μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.



Εικόνα 7: Καμπύλη κορεσμού για μία ενζυμική αντίδραση που δείχνει τη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του υποστρώματος και του ρυθμού αντίδρασης. Παρατηρείται η ταχύτητα V_0 , V_{max} της αντίδρασης και η σταθερά K_M που είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας [$V_{max}/2$].

Το κινητικό μοντέλο των Michaelis – Menten μιας αντίδρασης ενός υποστρώματος εμφανίζεται παρακάτω.



Υπάρχει μια αρχική διμοριακή αντίδραση μεταξύ του ενζύμου [E] και του υποστρώματος [S] για το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος [ES]. Η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, δηλαδή ή ταχύτητα της αντίδρασης V_0 , αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος [S] έως ένα ορισμένο επίπεδο που ονομάζεται V_{max} . Στο V_{max} , η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος δεν προκαλεί αύξηση του ρυθμού αντίδρασης, καθώς δεν υπάρχει πλέον διαθέσιμο ένζυμο [E] για αντίδραση με το υπόστρωμα [S]. Εδώ, η ταχύτητα της αντίδρασης εξαρτάται από το σύμπλοκο ES και η αντίδραση γίνεται μια μονομοριακή αντίδραση με τάξη μηδέν. Αν και ο ενζυμικός μηχανισμός για τη μονομοριακή αντίδραση μπορεί να είναι αρκετά περίπλοκος, υπάρχει συνήθως ένα ενζυμικό στάδιο καθορισμού του ρυθμού που επιτρέπει σε αυτήν την αντίδραση να μοντελοποιηθεί ως ένα μόνο καταλυτικό στάδιο με ένα φαινομενικό μονομοριακό σταθερό k_{cat} . Σε σταθερή κατάσταση, διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση του ενδιάμεσου συμπλόκου [ES] ενώ οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και των προϊόντων αλλάζουν. Εάν η διαδρομή της αντίδρασης προχωρήσει σε ένα ή περισσότερα ενδιάμεσα, το k_{cat} θα είναι συνάρτηση πολλών σταθερών στοιχειωδών ρυθμών, ενώ στην απλούστερη περίπτωση μίας απλής στοιχειώδους αντίδρασης (χωρίς ενδιάμεσα) θα είναι ίδια με τη κινητική σταθερή k_2 . Η k_{cat} ισούται και με τη V_{max} και δηλώνει το μέγιστο αριθμό ενζυμικών αντιδράσεων που καταλύονται ανά δευτερόλεπτο.

Οι Michaelis και Menten (1913) [13] κατέληξαν στη μαθηματική σχέση

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

όπου V_0 : η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης,
 V_{\max} : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Η V_{\max} δείχνει τον ρυθμό μετατροπής ενός ενζύμου, δηλαδή τον αριθμό των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου. Η μέγιστη ταχύτητα [V_{\max}], ισούται με την κινητική σταθερά k_2 , γνωστή και ως k_{cat} .

Η K_m είναι η σταθερά Michaelis Menten που ορίζεται ως $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$

Η σταθερά Michaelis K_m ορίζεται πειραματικά ως η συγκέντρωση στην οποία η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης είναι μισή της V_{\max} , η οποία μπορεί να επαληθευτεί αντικαθιστώντας το υπόστρωμα $[S] = K_m$ στην εξίσωση των Michaelis-Menten, και αυτό διότι η εξίσωση θα πάρει τη μορφή $V_0 = V_{\max}/2$. Η μονάδα μέτρησης της K_m είναι η μονάδα συγκέντρωσης και δεν επηρεάζεται από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος. Εάν το ενζυμικό βήμα προσδιορισμού του ρυθμού είναι αργό σε σύγκριση με το διαχωρισμό του υποστρώματος ($k_2 \ll k_{-1}$) η σταθερά K_m του Michaelis-Menten είναι περίπου η σταθερά διαχωρισμού K_D του συμπλόκου ES.

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

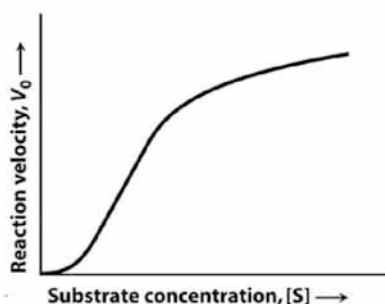
Όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$ είναι πολύ μεγαλύτερη από την K_m , τότε $V_0 = V_{\max}$, επιτυγχάνεται η μέγιστη ταχύτητα, χωρίς να παίζει πόλο η συγκέντρωση του υποστρώματος. Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$ είναι πολύ μικρότερη από την K_m , τότε $V_0 = (V_{\max}/K_m)/[S]$, δηλαδή η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος $[E]$ [13].

1.1.12. Αλλοστερικά ένζυμα και κινητικές μελέτες

Το μοντέλο Michaelis-Menten δεν μπορεί να εξηγήσει τις κινητικές ιδιότητες αρκετών ενζύμων. Ορισμένα ένζυμα παράγουν μια σιγμοειδή γραφική παράσταση της ταχύτητας της αντίδρασης και της V_0 σε συνάρτηση με το υπόστρωμα $[S]$, η οποία συχνά υποδηλώνει συνεργατική σύνδεση του υποστρώματος στην ενεργή θέση. Τα ένζυμα αυτά είναι γνωστά ως αλλοστερικά, διαθέτοντας πολλές υπομονάδες και ενεργά κέντρα. Αυτό σημαίνει ότι η σύνδεση ενός μορίου του υποστρώματος επηρεάζει τη δέσμευση των επόμενων μορίων. Αυτή η συμπεριφορά είναι πιο συχνή σε πολυμερή ένζυμα με αρκετά ενεργά κέντρα που αλληλεπιδρούν. Η θετική συνέργεια εμφανίζεται όταν η σύνδεση του πρώτου μορίου υποστρώματος αυξάνει τη συγγένεια των άλλων ενεργών κέντρων για το υπόστρωμα. Η αρνητική συνέργεια εμφανίζεται όταν η σύνδεση του πρώτου υποστρώματος μειώνει τη συγγένεια του

ενζύμου με άλλα μόρια υποστρώματος. Η συνέργεια είναι συχνή και μπορεί να βοηθά στη ρύθμιση των αποκρίσεων των ενζύμων στις αλλαγές συγκεντρώσεως των υποστρωμάτων τους. Η θετική συνεργασία καθιστά τα ένζυμα πολύ πιο ευαίσθητα στο υπόστρωμα [S] και οι δράσεις τους μπορούν αλλάζουν σε ένα στενό εύρος συγκεντρώσεως υποστρώματος. Αντίθετα, η αρνητική συνεργατικότητα καθιστά τα ένζυμα κατά πολύ λιγότερο ευαίσθητα σε μικρές αλλαγές στο υπόστρωμα [S].

Η αλλοστερική διαμόρφωση συμβαίνει όταν ένας τελεστής συνδέεται με μια αλλοστερική θέση (επίσης γνωστή ως ρυθμιστική θέση) ενός ενζύμου και μεταβάλλει την ενζυμική δραστηριότητα. Οι αλλοστερικοί διαμορφωτές έχουν σχεδιαστεί για να ταιριάζουν στην αλλοστερική θέση ώστε να προκαλούν μια αλλαγή στη διαμόρφωση του ενζύμου, ιδίως μια αλλαγή στο σχήμα του ενεργού κέντρου, η οποία στη συνέχεια προκαλεί μια αλλαγή στη δραστηριότητά του. Μπορούν να δρουν θετικά (ενεργοποίηση) προκαλώντας αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας ή αρνητικά (ανασταλτικά) προκαλώντας μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Η χρήση αλλοστερικής διαμόρφωσης επιτρέπει τον έλεγχο των επιδράσεων συγκεκριμένων ενζυμικών δραστηριοτήτων και είναι ιδιαίτερα σημαντική στην ικανότητα του κυττάρου να ρυθμίζει την ενζυμική δραστηριότητα. Διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε πολλές θεμελιώδεις βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής σηματοδότησης και της ρύθμισης του μεταβολισμού δίνοντας μια γρήγορη απόκριση στις ανάγκες του κυττάρου. Για αυτό το λόγο, τα αλλοστερικά ένζυμα αποτελούν βασικούς ρυθμιστές στις μεταβολικές πορείες του κυττάρου [8].



Εικόνα 8: Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου. Καμπύλη κορεσμού για μία ενζυμική αντίδραση που δείχνει σιγμοειδή σχέση της ταχύτητας $[V_0]$ και της συγκέντρωσης του υποστρώματος $[E]$.

1.1.13. Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

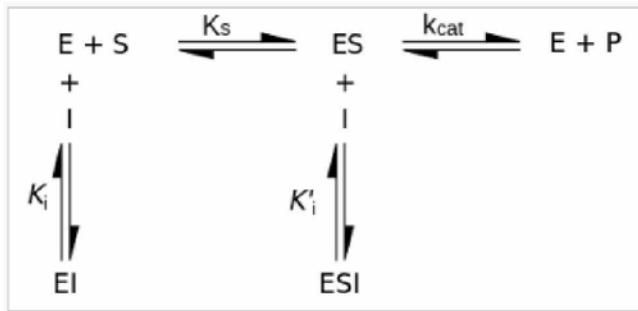
Στην ενζυμολογία, αναστολή, είναι ένα φαινόμενο στο οποίο μια ένωση, που ονομάζεται αναστολέας, στις περισσότερες των περιπτώσεων παρόμοια στη δομή με την ουσία (υπόστρωμα) στην οποία ένα ένζυμο δρα για να σχηματίσει ένα προϊόν, αλληλεπιδρά με το ένζυμο έτσι ώστε το σύμπλεγμα που προκύπτει είτε να μην μπορεί να υποστεί τη συνήθη αντίδραση ή δεν μπορεί να σχηματίσει το συνηθισμένο προϊόν. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Στην αντιστρεπτή αναστολή, ο αναστολέας μπορεί να λειτουργήσει, καθώς

συμπλέκεται με το ένζυμο στη θέση στην οποία συνήθως συνδέεται το υπόστρωμα (συναγωνιστική αναστολή) ή σε κάποια άλλη θέση (μη συναγωνιστική αναστολή). Στο τελευταίο, ο αναστολέας δεν εμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος στο ένζυμο αλλά αλλάζει επαρκώς το σχήμα της θέσης στην οποία λαμβάνει χώρα η καταλυτική δραστηριότητα και την αποτρέπει.

Οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς τροποποιούν συνήθως ομοιοπολικά ένα ένζυμο και συνεπώς η αναστολή αντιστρέφεται δύσκολα με τον αναστολέα να διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο. Οι αναστολείς αυτοί είναι γενικά ειδικοί για μια κατηγορία ενζύμων και δεν απενεργοποιούν όλες τις πρωτεΐνες. Δεν λειτουργούν καταστρέφοντας τη δομή της πρωτεΐνης αλλά αλλάζοντας συγκεκριμένα το ενεργό κέντρο του στόχου τους. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς προσκολλώνται σε ένζυμο με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις όπως δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και ιοντικούς δεσμούς. Πολλοί αδύναμοι δεσμοί μεταξύ του αναστολέα και του ενεργού κέντρου δημιουργούνται για να παράγουν ισχυρή και ειδική δέσμευση. Σε αντίθεση με τα υποστρώματα και τους μη αντιστρεπτούς αναστολείς, οι αντιστρεπτοί αναστολείς γενικά δεν υφίστανται χημικές αντιδράσεις όταν συνδέονται με το ένζυμο και μπορούν εύκολα να αφαιρεθούν με αραίωση ή διάλυση.

Στην συναγωνιστική αναστολή, το υπόστρωμα και ο αναστολέας δεν μπορούν να συνδεθούν ταυτόχρονα με το ένζυμο. Αυτό συνήθως προκύπτει διότι ο αναστολέας έχει συγγένεια με το ενεργό κέντρο του ενζύμου όπου δεσμεύεται επίσης το υπόστρωμα. Το υπόστρωμα και ο αναστολέας ανταγωνίζονται για τη πρόσβαση στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αυτός ο τύπος αναστολής μπορεί να αντιμετωπιστεί με υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος το V_{max} παραμένει σταθερό, βγάζοντας έτσι εκτός ανταγωνισμού τον αναστολέα. Ωστόσο, η φαινομενική K_m θα αυξηθεί καθώς απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση του υποστρώματος για να φτάσει το σημείο K_m , ή αλλιώς στο $V_{max}/2$. Οι ανταγωνιστικοί αναστολείς έχουν συχνά παρόμοια δομή με το πραγματικό υπόστρωμα.

Στην μη συναγωνιστική αναστολή, η δέσμευση του αναστολέα στο ένζυμο μειώνει τη δραστηριότητα του, αλλά δεν επηρεάζει τη δέσμευση του υποστρώματος διότι συνδέεται σε διαφορετική περιοχή από το υπόστρωμα. Ως αποτέλεσμα, η έκταση της αναστολής εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση του αναστολέα. Το V_{max} θα μειωθεί λόγω της αδυναμίας της αντίδρασης να προχωρήσει τόσο αποτελεσματικά, αλλά η K_m θα παραμείνει η ίδια καθώς η δέσμευση του υποστρώματος, θα συνεχίσει να λειτουργεί σωστά.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση για αναστρεπτούς αναστολείς ενζύμων. Τα K_s , K_i , K_i' , αποτελούν σταθερές διάστασης.

Το διάγραμμα Lineweaver – Burk (ή διάγραμμα διπλού αντιστρόφου) είναι μια γραφική αναπαράσταση της εξίσωσης Lineweaver – Burk της κινητικής του ενζύμου, που περιγράφεται από τους Hans Lineweaver και Dean Burk.

Η εξίσωση Michaelis-Menten περιγράφεται από τον τύπο:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Αν γραφτεί με τη μορφή Lineweaver – Burk τότε:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

όπου V είναι η ταχύτητα της αντίδρασης, το K_m είναι η σταθερά Michaelis-Menten, το V_{\max} είναι η μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης και το $[S]$ είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος.

Η μέθοδος Lineweaver – Burk χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό σημαντικών όρων στην κινητική των ενζύμων, όπως η K_m και η V_{\max} . Η μέθοδος αυτή απεικονίζεται σε διάγραμμα ως μια ευθεία με τη κλίση να αντιπροσωπεύει το K_m/V_{\max} . Ο άξονας y ενός τέτοιου γραφήματος είναι ισοδύναμος με το αντίστροφο του V , δηλαδή με το $1/V$. Ο άξονας x του γραφήματος αντιπροσωπεύει το $1/[S]$. Το $1/V_{\max}$ εντοπίζεται στο σημείο στο οποίο η ευθεία εφάπτεται με τον άξονα y και το $-1/K_m$ στο σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα x . Δίνει επίσης μια γρήγορη, οπτική απεικόνιση των διαφορετικών μορφών αναστολής των ενζύμων. [14]

Η K_i ή σταθερά αναστολής, αντιπροσωπεύει τον βαθμό διαχωρισμού του

συμπλόκου ενζύμου και ενός αντιστρεπτού συναγωναστικού αναστολέα και ως εκ τούτου δείχνει την ισχύ του αναστολέα. Μπορεί να υπολογιστεί με βάση την εξίσωση των Michaelis-Menten:

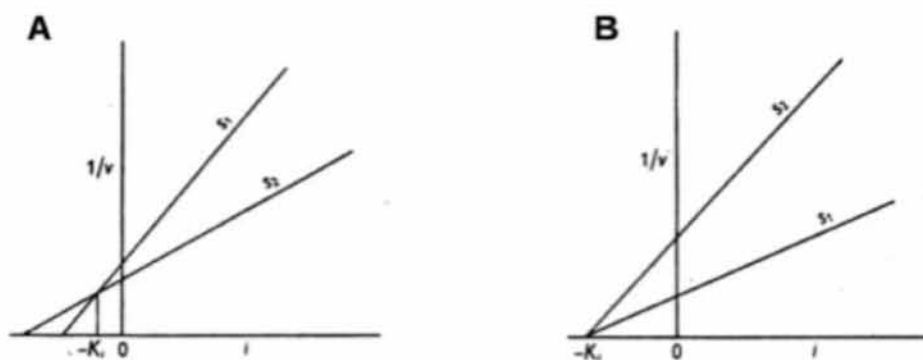
$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (\text{A})$$

όπου $[I]$ η συγκέντρωση του αναστολέα.

Για να υπολογιστεί η K_i χρησιμοποιείται μια μέθοδος με βάση γραφικές παραστάσεις. Σχεδιάζοντας ένα διάγραμμα, τοποθετώντας το $1/v$ στον άξονα y και το $[I]$ στον άξονα x , με σταθερή τη συγκέντρωση του υποστρώματος, το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μιας ευθείας γραμμής. Εάν με τον ίδιο τρόπο αποτυπωθούν σε ένα διάγραμμα δύο συγκεντρώσεις υποστρώματος που θα διαφέρουν, οι ευθείες θα τέμνονται αριστερά του άξονα y σε ένα σημείο όπως φαίνεται παρακάτω στην εικόνα, με το σημείο αυτό να ορίζει στον άξονα x την τιμή $-K_i$.

Με βάση την (A), κάθε γραμμή θα έχει τη μορφή:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V S} + \frac{1}{V} + \frac{K_m i}{V S K_i} \quad (\text{B})$$



Εικόνα 10: Α) Προσδιορισμός K_i σε συναγωνιστική αναστολή, Β) Προσδιορισμός K_i σε μη συναγωνιστική αναστολή

Στη συναγωνιστική αναστολή, στο σημείο τομής των δυο ευθειών, οι τιμές των $1/v$, $[I]$ και V_{\max} θα είναι ίδιες και για τις δυο γραμμές. Άρα:

$$\frac{Km}{S1} + 1 + \frac{Km}{S1} \frac{i}{Ki} = \frac{Km}{S2} + 1 + \frac{Km}{S2} \frac{i}{Ki} \quad \eta \quad \frac{1}{S1} (1 + \frac{i}{Ki}) = \frac{1}{S2} (1 + \frac{i}{Ki})$$

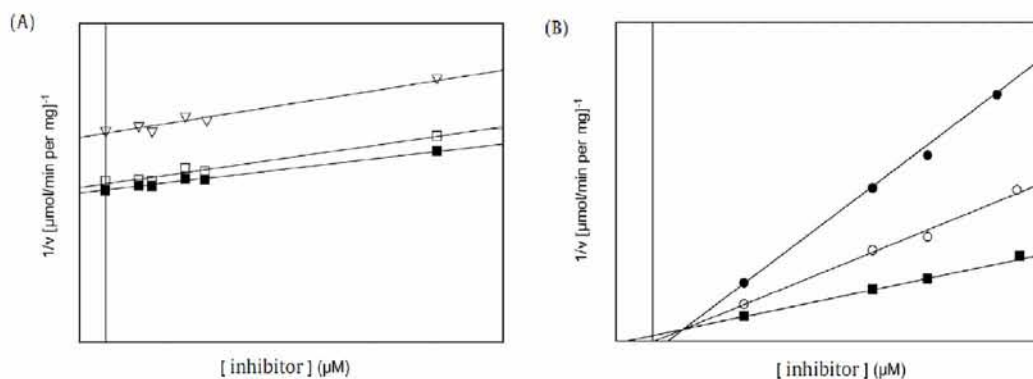
Με τη προϋπόθεση ότι $[S1] = [S2]$ ή ότι $[I] = -Ki$

Στην μη-συναγωνιστική αναστολή, η οποία φαίνεται στο διάγραμμα Β, οι ευθείες δεν τέμνονται, αλλά έχουν κοινή αρχή στον άξονα x η οποία εκφράζει πάλι τη τιμή $-Ki$. Αυτό συμπεραίνεται, εάν στην μη-συναγωνιστική εξίσωση θέσουμε ότι $1/V = 0$ και προκύπτει ότι:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V} (1 + \frac{Km}{S})(1 + \frac{i}{Ki})$$

[22]

Η σταθερά αλληλεπίδρασης (α), μεταξύ πολλαπλών αναστολέων μπορεί να υπολογιστεί από τα διαγράμματα Dixon, μέσω της ανάλυσης κινητικών δεδομένων. Η σταθερά φανερώνει ανταγωνιστική ή μη ανταγωνιστική συμπεριφορά μεταξύ δύο αναστολέων για ένα κέντρο πρόσδεσης, συμπέρασμα το οποίο εξάγεται από τη παρατήρηση των διαγραμμάτων Dixon. Τα γραφήματα αυτά έχουν στον άξονα x'x τη συγκέντρωση του αναστολέα και στον άξονα y'y την ειδική δραστηριότητα (1/v). Η ανταγωνιστική συμπεριφορά των δυο αναστολέων αποτυπώνεται ως μοτίβο παράλληλων ευθειών (με σταθερή αλληλεπίδραση να προσεγγίζει το άπειρο), υποδεικνύοντας ότι ανταγωνίζονται για το ίδιο κέντρο δέσμευσης. Αντίθετα, η απουσία ανταγωνισμού δίνει ευθείες που τέμνονται στις γραφικές παραστάσεις Dixon, που σημαίνει ότι οι δύο αναστολείς δεν αλληλοαποκλείονται, μπορούν και οι δύο να δεσμευτούν στο ένζυμο [15].



Εικόνα 11: Dixon plots για την tmGPb. Α, ανταγωνισμός πρώτου αναστολέα με ένα δεύτερο αναστολέα. Β, απουσία ανταγωνισμού μεταξύ του πρώτου και δεύτερου αναστολέα [15]

Στόχος της εργασίας

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), κοινώς γνωστός ως διαβήτης, αποτελεί μια ομάδα μεταβολικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από τα υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα για παρατεταμένη χρονική περίοδο. Εάν δεν αντιμετωπιστεί, ο διαβήτης μπορεί να προκαλέσει πολλές επιπλοκές, σε ορισμένες περιπτώσεις πολύ σοβαρές [1]. Η ρύθμιση της παραγωγής ηπατικής γλυκόζης μέσω γλυκογονόλυσης αποτελεί ένα σημαντικό στόχο των υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2. Η γλυκογονόλυση καταλύεται στο ήπαρ από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP). [20] Εντοπίζονται έξι διαφορετικά κέντρα που είναι πιθανή η πρόσδεση στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, με βασικό στόχο της έρευνας, να αποτελεί η εύρεση αναστολέων που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο [1]. Ο έλεγχος των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα είναι βασικός στόχος για τη θεραπεία διαβητικών ασθενών, για τους οποίους συνήθως συνταγογραφούνται ένας ή περισσότεροι υπογλυκαιμικοί παράγοντες με χρήση εκ του στόματος. Η παραγωγή ηπατικής γλυκόζης είναι αυξημένη σε διαβητικούς ασθενείς τύπου II. Η παρούσα πτυχιακή εργασία αξιολογεί την αναστολή της ένωσης GB-P-10-4-28 στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου μέσω κινητικών μελετών, εστιάζοντας στη μοριακή βάση αναγνώρισης του αναστολέα από το ενζύμο και το σχεδιασμό πιθανών αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων ως μέρος μιας γενικότερης έρευνας, που διεξάγει το εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρία
Acetic acid (CH ₃ COOH)	Sds
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma
Adenosine Triphosphate (ATP)	Sigma
Ammonium Molybdate	Sigma
Ammonium sulfate	ChemLab
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	Applichem
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Imidazole 99%	Sigma
Imidazole BioUltra	Sigma
KHCO ₃	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
Magnesium acetate tetrahydrate (CH ₃ COOH) ₂ Mg	Applichem
Potassium chloride (KCl)	Merck
SDS	Serva
Sodium carbonate anhydrous	Sds
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Tris Ultra Pure	Applichem
Zinc acetate	Sigma
α-D-glucose-1-Phosphate	Sigma
β-GP	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma

2.2 Οργανολογία

Όργανο	Εταιρεία
Συσκευή ανάδευσης Vortex	Biosan
Πεχάμετρο	Metrohm
Υδατόλουτρο, WiseBath	Wisd
Φωτόμετρο	VWR
Ζυγός ακριβείας	KERN
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma

2.3 Απομόνωση φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (rmGPb) από σκελετικούς μύες κονίκλων

Η απομόνωση της φωσφορυλάσης από σκελετικούς μύες κονίκλων έγινε μετά απο τροποποίηση της μεθόδου Fisher & Krebs (Methods in Enzymology Vol V, p. 369-373, 1962). Έγινε χρήση της 2-μερκαπτο-αιθανόλης αντί της L-κυστεΐνης για όλα τα στάδια του καθαρισμού. Αρσενικοί κόνικλοι, της ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus*, χρησιμοποιήθηκαν στην απομόνωση.

ΥΛΙΚΑ:

3 αρσενικοί κόνικλοι ποικιλίας <i>oryctolagnus cuniculus</i>
Διάλυμα οξικού οξέος (CH ₃ COOH 1N)
Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης).
Κεκορεσμένο διάλυμα KHCO ₃ , Διάλυμα 90 % w/v (NH ₄) ₂ SO ₄
Μεμβράνες διαπίδυσης (αφού έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO ₃ και 10mM EDTA στους 100°C, συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους και αποθήκευση σε 20% αιθανόλη στους 4°C)
Διάλυμα 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M pH 7.0
Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1 M, pH 7.0
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris [τρिस-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου]/HCl 0.001M] (pH 7.5)
Διάλυμα Tris 2 M
Διάλυμα οξικού οξέος CH ₃ COOH 1 N
Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
Διάλυμα (CH ₃ COO) ₂ Mg, 1.0 M pH 7.0
Γλυκερόλη

ΟΡΓΑΝΑ:

Φυγόκεντρος
Πεχάμετρο
Φασματοφωτόμετρο
Χρονόμετρο
Αναλυτικός ζυγός

Πειραματικό Μέρος

Ημέρα 1^η

Α. Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος.

Η λήψη του μυϊκού ιστού πραγματοποιήθηκε από τα πίσω πόδια όπως επίσης και από τους ραχιαίους μύες κοντά στη σπονδυλική στήλη από 3 αρσενικούς κόνικλους και στη συνέχεια ακολούθησε η τοποθέτησή του σε πάγο.

Με τη χρήση κρεατομηχανής επιτεύχθηκε η ομογενοποίηση του μυϊκού ιστού. Ακολούθησε η διαδικασία του ζυγίσματος και έπειτα τοποθετήθηκε πάλι σε πάγο έως ότου τελέστηκε η άλεση ολόκληρου του ιστού.

Με απιονισμένο ύδωρ, 3 φορές σε θερμοκρασία δωματίου, συντελέστηκε η εκχύλιση του κιμά, όπως παρουσιάζεται στην διαδικασία που αναφέρεται πιο κάτω. Ο χρόνος που απαιτήθηκε για την εκχύλιση του ομογενοποιημένου δεν ξεπέρασε τα 30 λεπτά. Προκειμένου να βγει η GPb από τα ζωικά κύτταρα, πραγματοποιήθηκε η ζύμωση του κιμά για 10 λεπτά.

1η εκχύλιση (10 λεπτά) 2300 mL

- α. Ομογενοποίημα + ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί 8 min
- β. Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- γ. Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

2η εκχύλιση (10 λεπτά) 2300 mL

α. Ομογενοποίημα από την 1η εκχύλιση + ίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί 8 min

- β. Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- γ. Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

3η εκχύλιση (10 λεπτά) 1150 mL

- α. Ομογενοποίηση από την 2η εκχύλιση + μίσος όγκος απιονισμένου ύδατος επί 8 min
- β. Διήθηση μέσω διπλής γάζας
- γ. Συλλογή του εκχυλίσματος εν ψυχρώ

Με σκοπό να απομακρυνθούν αιωρούμενα σωματιδία και λίπη το εκχύλισμα διηθήθηκε με τη χρήση υαλοβάμβακα.

B. Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον

Προστέθηκε CH_3COOH 1 N υπό ελαφρά ανάδευση, για να πραγματοποιηθεί η ρύθμιση του pH του ψυχρού εκχυλίσματος σε 5.1 – 5.2 (το εκχύλισμα δεν ήταν αναγκαίο να βρίσκεται σε πάγο κατά τη ρύθμιση του pH). Λόγω της κατακρήμνισης ορισμένων πρωτεϊνών αυξήθηκε η θολερότητα του εκχυλίσματος κατά τη ρύθμιση του pH.

Το εκχύλισμα αφέθηκε σε πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρησης, ισοζυγίστηκε και τοποθετήθηκε στη φυγόκεντρο.

Έπειτα, απομακρύνθηκαν οι πρωτεΐνες που είχαν καταβυθιστεί με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 4.225 rcf επί 30 λεπτά.

Σημειώθηκε διήθηση του υπερκείμενου υγρού με τη χρήση αντλίας κενού σε χωνί Buchner εν ψυχρώ προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα 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 τοποθετώντας τα δύο χάρτινα φίλτρα 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. Μετά την απόχυση του περιεχομένου δύο δοχείων της φυγοκέντρου στο χωνί Buchner τα χάρτινα φίλτρα αλλάζουν. Όταν μέσα στην φιάλη ο όγκος του διαλύματος γίνει περίπου 1.5 L αφαιρείται πρώτα το λάστιχο που συνδέει την αντλία κενού με την κωνική φιάλη ώστε να αποφευχθεί αναρρόφηση και ο όγκος του υγρού μετράται με ογκομετρικό κύλινδρο και φυλάσσεται εν ψυχρώ σε δοχείο των 20 L. Η διήθηση, με χρήση της συσκευής Buchner, συνεχίζεται για το σύνολο του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος.

Χρησιμοποιώντας το κεκορεσμένο διάλυμα KHCO_3 πραγματοποιήθηκε η ρύθμιση του pH του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος σε 6.8 (ισοηλεκτρικό σημείο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου).

Γ. Καταβύθιση του ενζύμου με θειικό αμμώνιο (90 % w/v).

Όγκος διαλύματος θειικού αμμωνίου που απαιτήθηκε = $0.837 \times$ όγκος εκχυλίσματος

Με την προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνής αμμωνίας (NH_4OH) επιτεύχθηκε η ρύθμιση του pH του διαλύματος του θειικού αμμωνίου σε 6.8. Το pH ελέγχθηκε με τη χρήση πεχαμετρικού χαρτιού και ρυθμίστηκε στον απαγωγό.

Προσθήκη του διαλύματος του θειικού αμμωνίου στο πρωτεϊνικό διάλυμα με αργό ρυθμο και με συνεχή ανάδευση. 4220 mL

Για 24 ώρες* το μίγμα παρέμεινε στον ψυκτικό θάλαμο.

Προκειμένου να παρασκευαστεί το διάλυμα διαπίδυσης την επόμενη ημέρα, 20 λίτρα απιονισμένου ύδατος ψύχτηκαν στο ψυκτικό θάλαμο.

* Για να υπάρξει καλύτερος διαχωρισμός, αντί για over-night μπορούμε να αφήσουμε το δείγμα στον ψυκτικό θάλαμο για 2 μέρες.

Ημέρα 2^η

Κοπή μεμβράνης στο επιθυμητό μήκος.

Για την προετοιμασία 650 ml διαλύματος ζυγίστηκαν 6.5 g Na_2CO_3 και 2.44 g

EDTA.

Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετήθηκαν στο παραπάνω διάλυμα και έβρασαν για 30 λεπτά.

Στην συνέχεια χρησιμοποιώντας απιονισμένο H₂O τα σακουλάκια ξεπλύθηκαν πολύ καλά.

Τα σακουλάκια διαπίδυσης τοποθετήθηκαν σε απιονισμένο H₂O και αφέθηκαν εκεί με σκοπό να βράσουν για 30λεπτά.

Έπειτα φυλάχτηκαν σε διάλυμα (20 % v/v) αιθανόλης στους 4°C, αφού πρώτα ξεπλύθηκαν πολύ καλά.

Μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο σημειώθηκε σχηματισμός 2 φάσεων: υπερκείμενο-ίζημα.

Με τη βοήθεια αντλίας απομακρύνθηκε ο περισσότερος όγκος του υπερκείμενου διαλύματος.

Το ίζημα συγκεντρώθηκε με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 5.110 rcf επί 40 λεπτά με τη χρήση της μεγάλης κεφαλής.

Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο διάλυμα χύθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια ακολούθησε η προετοιμασία ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001 M pH 7.5 όγκου 2 λίτρων.

10 ml διαλύματος Tris 2 M αραιώθηκαν με απιονισμένο ύδωρ σε όγκο 400 ml (συγκέντρωση περίπου 50 mM). Χρησιμοποιώντας διάλυμα HCl 1 N το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στη τιμή 7.5. Με τη βοήθεια του απιονισμένου ύδατος που είχε ψυχθεί, το διάλυμα που προέκυψε αραιώθηκε σε τελικό όγκο 20 Lt.

Έπειτα τα σακουλάκια διαπίδυσης πλύθηκαν με απιονισμένο ύδωρ για να απομακρυνθεί το διάλυμα αιθανόλης στο οποίο φυλάσσονταν.

Το διαλυτοποιημένο ένζυμο τοποθετήθηκε σε σακουλάκια διαπίδυσης, τα οποία εμβαπτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001 M με pH 7.5 στον ψυκτικό θάλαμο για ένα βράδυ.

Ημέρα 3^η

A. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Μετά τη διαπίδυση σε ογκομετρικό κύλινδρο, πραγματοποιήθηκε η συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος

Ακολούθησε η διαύγαση του πρωτεϊνικού διαλύματος με φυγοκέντρηση στις 34.540 rcf για 15 λεπτά (0 – 4 °C).

Έπειτα ογκομετρήθηκε το υπερκείμενο υγρό.

Προσθήκη καινούριου διαλύματος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης με pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης = πρωτεϊνικός όγκος \times 3/27 = 13.1 ml

118mL + 13.1 mL = 131.1 mL

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

Όγκος EDTA 0.1 M = πρωτεϊνικός όγκος μετά την προσθήκη του διαλύματος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης \times 5/1000 = 131.1 mL \times 5/1000 = 0,656 mL ή 656 μ L

Με σκοπό το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος να γίνει 8.8, προστέθηκε διαλύμα Tris 2 M. Η προσθήκη πραγματοποιήθηκε με αργούς ρυθμούς και υπό ανάδευση και το pH μετρήθηκε με τη βοήθεια πεχαμέτρου.

Επώαση του μίγματος στους 37 °C επί 1 ώρα με παράλληλη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα. (ήπια ανάδευση, όχι με ράβδο)

Το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το pH (περίπου 10-15 λεπτά) ρυθμίστηκε σε τιμή 7.0 με τη χρήση διαλύματος 1 N CH₃COOH.

Διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 34.540 rcf επί 10 λεπτά (25-30 °C).

B. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης b.

Μετά τη φυγοκέντρηση ακολούθησε η ογκομέτρηση του υπερκείμενου ενζυμικού διαλύματος .

Στη συνέχεια προστέθηκε διαλύμα AMP 0.1 M, pH 7.0 στο υπερκείμενο σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος AMP 0.1 M, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος x 1/100= 1.3 mL

Ακολούθησε η προσθήκη διαλύματος $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100= 1.3 mL

Αφού ολοκληρώθηκαν τα παραπάνω, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε μικρά tubes φυγοκέντρησης, ισοζυγίστηκε και αφέθηκε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για ένα βράδυ προκειμένου να κρυσταλλωθεί. (οι κρύσταλλοι αρχίζουν να φαίνονται σε 1-2 ώρες)

Ημέρα 4^η

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf σε θερμοκρασία 0 – 4 °C επί 10 λεπτά με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

Επαναφορά της θερμοκρασίας της φυγοκέντρου στους 25-30 °C.

Το κρυσταλλικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 pH 6.8 εντός του υδατόλουτρου σε θερμοκρασία 30 °C.

Ακολούθησε η διαύγαση του διαλύματος με φυγοκέντρηση σε 28.710 rcf επί 10 λεπτά (25-30 °C) με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

Πραγματοποιήθηκε η ογκομέτρηση του υπερκείμενου ενζυμικού υγρού.

Έπειτα στο υπερκείμενο υγρό προστέθηκε διάλυμα AMP 0.1 M, pH 7.0 σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος AMP 0.1 M, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100= 1.3mL

Ακολούθως σημειώθηκε προσθήκη διαλύματος $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0 στο υπερκείμενο υγρό σύμφωνα με τον τύπο:

Όγκος $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100= 1.3mL

Το διάλυμα που προέκυψε τοποθετήθηκε σε μικρά tubes φυγοκέντρησης, ισοζυγίστηκε και στη συνέχεια αφέθηκε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 ώρες.

Η παραπάνω διαδικασία (1η ανακρυστάλλωση) επαναλήφθηκε με τον ίδιο τρόπο μετά από 3-4 ώρες. Έτσι ακολούθησε η 2η ανακρυστάλλωση και το μίγμα αφέθηκε για ένα βράδυ στον ψυκτικό θάλαμο.

Ημέρα 5^η

Επανάληψη της διαδικασίας της ανακρυστάλλωσης που περιγράφηκε την 4η ημέρα (1η ανακρυστάλλωση) και έτσι ακολούθησε η 3η ανακρυστάλλωση.

Επαναλήφθηκε η προηγούμενη διαδικασία (1η ανακρυστάλλωση) για δύο ακόμα φορές χωρίς ωστόσο να γίνει προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

Στο τελικό ενζυμικό διάλυμα προσδιορίστηκε φωτομετρικά η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης b ως ακολούθως: 10 μL ενζυμικού δείγματος 2500 μL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 και φωτομέτρηση στα 280nm και 260 nm. Η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίστηκε από τη σχέση:

$$(\text{OD } 280/1.32) \times (2510/10) = [\text{GPb}], \text{ mg/ML}$$

Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης (ϵ) για την mGPb ισούται με 1.32.

$$\text{CGPb} = 144 \text{ mg/ml ή } 1,04\text{g.}$$

Τέλος πραγματοποιήθηκε η ογκομέτρηση του ενζυμικού διαλύματος. Προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης (100%) και φυλάχθηκε στους -20°C .

2.4 Φωσφορυλίωση της ηπατικής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Η κινάση της φωσφορυλάσης (PhK) φωσφορυλιώνει τη φωσφορυλάση b του γλυκογόνου στη Ser14.

Για τη φωσφορυλίωση της ηπατικής φωσφορυλάσης (hGPb) χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 16 ng/ml PhK, 1 mM ATP, 1X Hepes. Υπολογίστηκε, πως για να είναι επιτυχημένη η φωσφορυλίωση, ο όγκος της αντίδρασης θα έπρεπε να είναι τουλάχιστον είναι 120 μL , ώστε οι συγκεντρώσεις να είναι 16 ng/ml PhK, 1 mM ATP και 1x Hepes στο διάλυμα της φωσφορυλίωσης. Η κινάση της φωσφορυλάσης ήταν αποθηκευμένη σε stock 0,9 mg/ml, και έπειτα από αραίωση η συγκέντρωση της είναι 16 ng/mL, στο διάλυμα φωσφορυλίωσης. Η σύσταση του διαλύματος αραίωσης της κινάσης περιέχει 1x Hepes και 5 mg/mL BSA. Τελευταία προστέθηκε η ATP για να εκκινήσει η αντίδραση, η οποία διήρκησε 1 ώρα και 30 λεπτά σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασίας 30°C μέσα σε υδατόλουτρο. Η αντίδραση τερματίστηκε τοποθετώντας το πρωτεϊνικό μίγμα στο πάγο για 10min.

Ο όγκος της φωσφορυλίωσης είναι 120 μL και εμπεριέχει:

16 ng/mL Phk

1 mM ATP

1X Hepes

0,2 mg/mL hIGPb

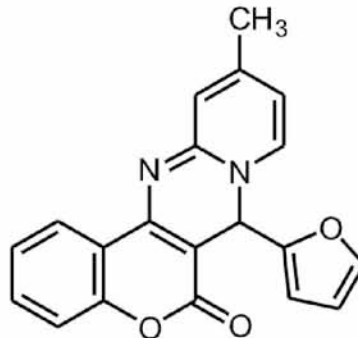
2.5 Κινητικές μελέτες έναντι της GP

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διασπά το γλυκογόνο σε κατάλοιπα γλυκόζης σύμφωνα με την αμφίδρομη αντίδραση:

$(\alpha\text{-}1,4 \text{ αλυσίδα γλυκογόνου})_n + \text{P}_i \rightleftharpoons (\alpha\text{-}1,4 \text{ αλυσίδα γλυκογόνου})_{n-1} + \alpha\text{-D-}1\text{-φωσφορική γλυκόζη.}$

Για τις, *in vitro*, κινητικές μελέτες που έγιναν, πραγματοποιήθηκε η αντίστροφη πορεία αντίδρασης της φωσφορυλάσης, δηλαδή προς τη κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου. Πιο αναλυτικά, η σύνδεση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο ώστε να παραχθεί γλυκογόνο με ένα κατάλοιπο γλυκόζης περισσότερο και παράλληλα να απελευθερωθούν από την G1P ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi). Αυτά τα ιόντα μετρώνται φασματοφωτομετρικά ώστε να είναι εφικτή η ποσοτικοποίηση τους.

Ο σχεδιασμός του αναστολέα που μελετήθηκε έγινε με βάση την τρισδιάστατη ενζυμική δομή. Οι κινητικές μελέτες αφορούν τόσο την mGPb όσο και την hGPb, οπότε έγινε φωσφορυλίωση της hGPb όπως περιγράφηκε παραπάνω, ώστε να γίνει μετάβαση του ενζύμου από την ανενεργή κατάσταση GPb στην ενεργή κατάσταση GPb. Η ένωση που μελετήθηκε είναι η GB-P10-4-28 και παρουσιάζεται στην εικόνα 11.



Εικόνα 11: η χημική δομή του αναστολέα GB-P10-4-28

2.5.1 Προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων φασματοφωτομετρικά

Με βάση τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων και ειδικότερα μέσω της δημιουργίας ένωσης χρωμοφόρου σύμπλοκου, υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι του πειράματος. Το μολυβδαινικό αμμώνιο με τα

ορθοφωσφορικά ιόντα, δημιουργούν σύμπλοκο, σε pH 5,0 παρουσία Zn^{2+} το οποίο απορροφά ισχυρά υπεριώδη ακτινοβολία. Αφού γίνει αναγωγή με το ασκορβικό οξύ, δημιουργείται το χρωμοφόρο σύμπλοκο το οποίο έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. Τα ορθοφωσφορικά ιόντα παίζουν σημαντικό ρόλο, διότι αν απουσιάζουν, δεν παράγεται το χρωμοφόρο σύμπλοκο. Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ορθοφωσφορικών ιόντων απο αντιδράσεις.

Προετοιμασία των διαλυμάτων:

Δημιουργία ενός μίγματος pH 5.0, αποτελούμενο απο διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου συγκέντρωσης 15 mM και οξικού ψευδαργύρου συγκέντρωσης 100 mM το οποίο φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, υπο συνθήκες σκότους.

Διάλυμα ασκορβικού οξέος με 10% (w/v) και pH 5.0 σε θερμοκρασία δωματίου, μέσα σε αδιαφανές μπουκάλι. Το διάλυμα του ασκορβικού οξέος έχει μικρή διάρκεια ζωής, οπότε έπρεπε να προετοιμάζεται κάθε φορά.

Αφού ετοιμάστηκαν τα δύο διαλύματα, ακολούθησε ανάμιξη σε ένα αδιαφανές σκούρο δοχείο, του διαλύματος του οξικού ψευδαργύρου/μολυβδαινικού αμμωνίου με το διάλυμα του ασκορβικού οξέος με την αναλογία να ήταν 4:1. Μετά το πέρασ 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου σχηματίστηκε μία έγχρωμη ένωση. Κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος προστέθηκε στα δείγματα και έγινε επώαση 15 λεπτών σε θερμοκρασία 30°C μέσα σε υδατόλουτρο. Το μολυβδαινικό αμμώνιο και ο ανόργανος φώσφορος σχηματίζουν σύμπλοκο, παρουσία ιόντων ψευδαργύρου (Zn^{2+}). Το ασκορβικό οξύ ανάγει το σύμπλοκο και παράγεται η έγχρωμη ένωση που αναφέρθηκε παραπάνω και η οποία έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. Για να γίνει εφικτός ο ποσοτικός προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ανιόντων στο δείγμα, πρέπει να παρασκευαστεί ένα δείγμα αναφοράς ορθοφωσφορικών ανιόντων, στο οποίο γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης, και χρησιμοποιείται ως πρότυπο. [23]

2.5.2 Παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος

Παρασκευάστηκε ενζυμικό διάλυμα με συγκέντρωση 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για την hIGPa και 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για την rmGPb σε όγκο 240 μL ώστε στον τελικό όγκο της αντίδρασης, που ήταν 180 μL , να υπάρξουν 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hIGPa και 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rmGPb αντίστοιχα. Στο ενζυμικό διάλυμα προσθέσαμε φωσφορυλάση του γλυκογόνου, γλυκογόνο και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 στις εξής αναλογίες:

rmGPb

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Glycogen 10% (w/v), 24 μ L	Glycogen 1% (w/v)
Ρυθμιστικό διάλυμα 50/50/1 12 μ L	2.5/2.5/0.05
rmGPb 5 μ g/ml, 8.6 μ L	rmGPb 3 μ g/mL,
ddH ₂ O 195.4 μ L	
V _{τελ} = 240 μ L	

hIGPa	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Glycogen 10% (w/v), 24 μ L	Glycogen 1% (w/v)
hIGPa 5 μ g/mL	hIGPa 1 μ g/mL
TEA buffer	
ddH ₂ O	
V _{τελ} = 240 μ L	

Το ενζυμικό διάλυμα επώαστηκε για 15 λεπτά στους 30oC σε υδατόλουτρο, ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του ενζύμου με το γλυκογόνο.

2.5.3 Παρασκευή υποστρώματων

Η α -D-1-φωσφορική γλυκόζη αποτέλεσε το υπόστρωμα για τις κινητικές μελέτες, διότι μελετήθηκε η αντίστροφη πορεία της αντίδρασης που καταλύεται από τη φωσφορυλάση, δηλαδή η προσθήκη της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο μακρομόριο του γλυκογόνου.

Αρχικά παρασκευάσαμε το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης 1 (Assay Buffer 1) που είχε σύσταση 200 mM imidazole, 400 mM KCl, 4 mM EDTA και 4 mM DTT. Με αραιώση από το Assay Buffer 1, προέκυψε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 2 (Assay Buffer 2) με σύσταση 135 mM imidazole, 270 mM KCl, 2.7 mM EDTA και 2.7 mM

DTT. Σε αυτό υπήρξαν οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος που μελετήθηκαν. Αρχικά, έγινε παρασκευή ενός πυκνού υδατικού διαλύματος G1P, συγκέντρωσης 400 mM και το pH του ρυθμίστηκε στο 6.8. Έπειτα το διάλυμα διαχωρίστηκε σε κλάσματα των 500 μ L και έγινε αποθήκευση στους -20°C . Από τα 400 mM παρασκευάστηκε G1P με συγκέντρωση 90 mM ως εξής:

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
G1P 400 mM 788 μ L	G1P 90 mM
ddH ₂ O 350 μ L	Assay Buffer 2
Assay Buffer 1 2362 μ L	
V _{τελ} = 3500 μ L	

Οι υπόλοιπες αραιώσεις G1P προέκυψαν με αραιώση από το διάλυμα 90 mM της G1P χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης Assay Buffer 2.

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	[G1P] mM στα 180 μ L της αντίδρασης
G1P 90 mM 250 μ L Assay buffer 250 μ L	G1P 45 mM V _{τελ} = 500 μ L	10
G1P 90 mM 150 μ L Assay buffer 350 μ L	G1P 27 mM V _{τελ} = 500 μ L	6
G1P 90 mM 100 μ L Assay buffer 400 μ L	G1P 18 mM V _{τελ} = 500 μ L	4
G1P 90 mM 75 μ L Assay buffer 425 μ L	G1P 13.5 mM V _{τελ} = 500 μ L	3
G1P 90 mM 50 μ L Assay buffer 450 μ L	G1P 9 mM V _{τελ} = 500 μ L	2

G1P 90 mM 25 μ L	G1P 4.5 mM	1
Assay buffer 475 μ L	Vτελ= 500 μ L	

Μετά το πέρας 12 λεπτών από την στιγμή που τοποθετήθηκε το ενζυμικό διάλυμα στους 30°C, τα υποστρώματα τοποθετήθηκαν στους 30°C σε υδατόλουτρο, για 30 λεπτά.

Προσδιορισμός της K_m

Για να προσδιοριστεί η K_m , από το ενζυμικό διάλυμα έγινε λήψη 36 μ L και προστέθηκαν στα 144 μ L από το πρώτο διάλυμα υποστρώματος. Τη στιγμή εκείνη και για χρόνο $t=0$, η ενζυμική αντίδραση ξεκίνησε και έγινε σε όγκο 180 μ L. Η G1P είχε συγκεντρώσεις 2, 3, 4, 6, 10 mM για την rmGPb, ενώ για την hGPa 1, 2, 3, 4, 6 mM. Για την rmGPb, ελήφθησαν 40 μ L από το διάλυμα της αντίδρασης ανά 1, 2, 3, 4 λεπτά και αποτέθηκαν σε 10 μ L SDS 1 % (w/v). Ακολούθησε έντονη ανάδευση ώστε να διακοπεί η αντίδραση. Για την hGPa ελήφθησαν 40 μ L από το διάλυμα της αντίδρασης ανά 5, 10, 15, 20 λεπτά και αποτέθηκαν σε 10 μ L SDS 1 % (w/v). Ακολούθησε επίσης έντονη ανάδευση ώστε να διακοπεί η αντίδραση. Μετά το τέλος των υποστρωμάτων της G1P, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C.

Προσδιορισμός της K_{mapp}

Για να προσδιοριστούν οι τιμές των K_{mapp} το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε κάθε φορά παρουσία μιας σταθερής συγκέντρωσης του αναστολέα GB-P10-4-28.

Προσδιορισμός της K_i

Χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα GB-P10-4-28 για την εύρεση της K_i .

Έναντι της hGPa μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 60 μ M του αναστολέα GB-P10-4-28.

Έναντι της rmGPb μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 10 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 70 μ M, 90 μ M, 110 μ M GB-P10-4-28.

Η rmGPb χρειάζεται το AMP ως αλλοστερικό ενεργοποιητή για να επιτευχθεί αλλαγή από την T διαμόρφωση στην R. Αντίθετα η hGPa είναι ενεργή και βρίσκεται στην διαμόρφωση R, με αποτέλεσμα να μη χρειάζεται να ενεργοποιηθεί από έναν αλλοστερικό ενεργοποιητή. Συγκεντρωτικά, τα υποστρώματα για την rmGPb και hGPa περιγράφονται παρακάτω:

Υποστρώματα rmGPb

Για την K_m :

G1P (από stock 90 mM)	40 μ L (9mM)	40 μ L (13.5mM)	40 μ L (18mM)	40 μ L (27 mM)	40 μ L (45mM)
ddH ₂ O μ L	93.2 μ L	93.2 μ L	93.2 μ L	93.2 μ L	93.2 μ L
DMSO	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L
AMP	7.2 μ L	7.2 μ L	7.2 μ L	7.2 μ L	7.2 μ L
Ντελ	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L

Για την K_{mapr} :

G1P (από stock 90 mM)	40 μ L (9mM)	40 μ L (13.5mM)	40 μ L (18mM)	40 μ L (27 mM)	40 μ L (45mM)
ddH ₂ O μ L	93.2 μ L	93.2 μ L	93.2 μ L	93.2 μ L	93.2 μ L
Αναστολέας (σε DMSO)	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L
AMP	7.2 μ L	7.2 μ L	7.2 μ L	7.2 μ L	7.2 μ L
Ντελ	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L

Υποστρώματα hIGPa

Για την K_m :

G1P (από stock mM)	40 μ L (4.5mM)	40 μ L (9mM)	40 μ L (13.5mM)	40 μ L (18mM)	40 μ L (27mM)
ddH ₂ O	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L
DMSO	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L
Vτελ	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L

Για την K_{mapp} :

G1P (από stock mM)	40 μ L (4.5mM)	40 μ L (9mM)	40 μ L (13.5mM)	40 μ L (18mM)	40 μ L (27 mM)
ddH ₂ O	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L
Αναστολέας (σε DMSO)	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L
Vτελ	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L

Προσδιορισμός του κέντρου πρόσδεσης της GB-P10-4-28

Για να ταυτοποιήσουμε το κέντρο πρόσδεσης της ένωσης, μελετήσαμε την κινητική συμπεριφορά του αναστολέα παρουσία καφεΐνης ή οποία προσδένεται στο κέντρο αναστολής και παρουσία γλυκόζης, η οποία προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες ταχύτητας για το προσδιορισμό της σταθεράς αλληλεπίδρασης (α). Αρχικά μελετώντας τη δράση της γλυκόζης, με μεταβολή στις συγκεντρώσεις του αναστολέα GB-P10-4-28 και γλυκόζης, σε σταθερές συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων G-1-P (10 mM) και γλυκογόνου (1 % w/v). Χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης έναντι του αναστολέα GB-P10-4-28 για την εύρεση της σταθεράς αλληλεπίδρασης οι οποίες ήταν: 0 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM και 12 mM. Στη συνέχεια μελετώντας τη δράση της καφεΐνης, με μεταβαλλόμενες τις συγκεντρώσεις του αναστολέα GB-P10-4-28 και καφεΐνης, σε σταθερές συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων G-1-P (10 mM) και

γλυκογόνου (1 % w/v). Χρησιμοποιήθηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις καφεΐνης έναντι του αναστολέα GB-P10-4-28 για την εύρεση της σταθεράς αλληλεπίδρασης οι οποίες ήταν: 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM και 0.8 mM. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα ήταν 25 μM, 50 μM, 70 μM, 90 μM και στις δυο περιπτώσεις.

Υποστρώματα rmGPb (Caffeine)

Για την Kmapp:

G1P (από stock 90 mM)	40 μL (45 mM)	40 μL (45 mM)	40 μL (45 mM)	40 μL (45 mM)	40 μL (45 mM)
Καφεΐνη	0 μL	3.6 μL (5 mM)	3.6 μL (10 mM)	3.6 μL (20 mM)	3.6 μL (40 mM)
Αναστολέας (σε DMSO)	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL
AMP	7.2 μL	7.2 μL	7.2 μL	7.2 μL	7.2 μL
ddH ₂ O	93.2 μL	89.6 μL	89.6 μL	89.6 μL	89.6 μL
Ντελ	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL

Υποστρώματα rmGPb (Glucose)

Για την Kmapp:

G1P (από stock 90 mM)	40 μL (45 mM)	40 μL (45 mM)	40 μL (45 mM)	40 μL (45 mM)	40 μL (45 mM)
Γλυκόζη	0 μL	3.6 μL (100 mM)	3.6 μL (200 mM)	3.6 μL (400mM)	3.6 μL (600mM)
Αναστολέας (σε DMSO)	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL	3.6 μL
AMP	7.2 μL	7.2 μL	7.2 μL	7.2 μL	7.2 μL
ddH ₂ O μL	93.2 μL	89.6 μL	89.6 μL	89.6 μL	89.6 μL
Ντελ	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL

Εν συνεχεία, δημιουργήθηκαν διαλύματα που έπαιξαν το ρόλο <τυφλού μάρτυρα>. Η σύσταση τους αποτελούνταν απο την ένωση ή το μίγμα για το οποίο έπρεπε οπτική απορρόφηση να μετρηθεί καθώς και 10 μL 1 % (w/v) SDS έκαστο. Κάθε διάλυμα παρασκευάστηκε δύο φορές και παρουσιάζονται παρακάτω.

Τυφλό H_2O	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 40 μL dH_2O
Τυφλό ενζυμικού διαλύματος	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 32 μL dH_2O + 8 μL ενζυμικού διαλύματος
Τυφλό G1P	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 31.1 μL dH_2O + 8.9 μL από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση G1P
Τυφλό φωσφορικών	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 30 μL dH_2O + 10 μL Pi 1 mM

Συμπερασματικά στα 40 μL των τυφλών περιέχονταν 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hGPa ή 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mGPa, 6 mM G1P για την hGPa και 10 mM G1P για την mGPb και 0.25 mM φωσφορικών. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις προέκυψαν απο αναγωγή απορρόφησης της G1P 10 mM.

Στο τέλος της άνωθεν διαδικασίας, έγινε παρασκευή του διαλύματος φωτομέτρησης, όπως περιγράφεται παραπάνω. Το μίγμα του διαλύματος φωτομέτρησης επωάστηκε για 15 λεπτά και προστέθηκε απο 700 μL για τη mGPb και απο 500 μL για τη hGPa, σε κάθε δείγμα και τυφλό. Αφού έγινε ανάδευση, τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 30°C στο υδατόλουτρο. Αυτό αποσκοπούσε στη δημιουργία του χρωμοφόρου συμπλόκου. Ακολούθησε μηδενισμός του φωτόμετρου με το μάρτυρα του ddH_2O και καταμέτρηση των απορροφήσεων στα 850 nm. Όταν το pH είναι όξινο, η 1-φωσφορική γλυκόζη είναι ασταθής, αλλά σε pH 5.0 διατηρείται σταθερή. Άρα, η μέθοδος φασματοφωτομετρίας που εφαρμόστηκε είναι κατάλληλη για τη καταμέτρηση του παραγόμενου φωσφόρου απο την αντίδραση της φωσφορυλάσης. [23]

2.5.4 Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Το GraFit, είναι ένα υπολογιστικό πρόγραμμα, που χρησιμοποιήθηκε για να αναλυθούν τα κινητικά δεδομένα και να δημιουργηθούν τα απαραίτητα διαγράμματα.[24] Αρχικά έπρεπε να υπολογιστεί η ειδική δραστικότητα του ενζύμου ως προς τη κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε, για να γίνει στη συνέχεια ο υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων K_m , V_{max} , K_i . Η ειδική δραστικότητα περιγράφεται ως τα μmol προϊόντος που παράγονται ή υποστρώματος που καταναλώνονται στη μονάδα του χρόνου ανα mg πρωτεΐνης, δηλαδή

μmol/min/mg.

Για την εύρεση της ειδικής δραστηριότητας από τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης, αρχικά έπρεπε να υπολογιστούν τα μmol των φωσφορικών ιόντων της αντίδρασης. Με βάση αυτό, ένα πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων είχε παρασκευαστεί, με συγκέντρωση 0,25 mM. Γνωρίζοντας ότι:

0,25 mM = 0,25 mmol/L = 0,25 μmol/mL. Στα 1000 μL περιέχονταν 0,25 μmol φωσφορικών. Άρα, στα 40 μL του τυφλού των φωσφορικών, εμπεριέχονταν 0,01 μmol φωσφορικών. Αν θέσουμε ως A την απορρόφηση των φωσφορικών του τυφλού, τότε αυτή η απορρόφηση δίνει τη συγκέντρωση των φωσφορικών ως 0,01 μmol. Σε αυτό τον τρόπο βασίστηκε ο υπολογισμός των φωσφορικών σε μmol καθενός δείγματος. Αν θέσουμε ως B την απορρόφηση μίας άλλης μέτρησης ενός άλλου δείγματος, για τον υπολογισμό μόνο των μmol φωσφορικών του δείγματος B, θα έπρεπε να αφαιρεθούν οι απορροφήσεις του ενζυμικού διαλύματος και της G1P. Η απορρόφηση των φωσφορικών θα υπολογίζονταν ως εξής:

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

Εφόσον η απορρόφηση A προήλθε από τα 0,01 μmol, τότε τα μmol των φωσφορικών στο δείγμα θα ισούταν με:

$$\frac{c \times 0.01}{A} \dot{\eta} \frac{B}{A * 100} = \text{μmol φωσφορικών στο άγνωστο δείγμα}$$

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τη μη γραμμική εξίσωση έγινε υπολογισμός της ειδικής δραστηριότητας συνυπολογίζοντας το ανώτατο όριο υδρόλυσης και ένα συντελεστή f.

$$f = \frac{\text{limit}}{\text{assay volume} \times C}$$

Όπου,

C = η συγκέντρωση του ενζύμου για τον όγκο αντίδρασης που ήταν ίσος με 1×10^{-3} mg/ml για τη hIGPa και με 3×10^{-3} mg/ml για τη rmGPb.

$$\text{limit} = 0,78 \cdot [\text{G1P}] \cdot \text{assay volume}.$$

Το 0,78 είναι το επί της εκατό ποσοστό (78%) της G1P που καταναλώθηκε για να παραχθούν τα ορθοφωσφορικά ιόντα όταν η αντίδραση βρεθεί σε ισορροπία.

[G1P]: η συγκέντρωση της G1P στην αντίδραση

Assay volume: ο όγκος (40 μL) που λήφθηκε για να σταματήσει η αντίδραση

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mM) και των φαινομενικών σταθερών Michaelis-Menten παρουσία αναστολέων (K_{mapp} , mM), χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Όπου,

V_0 : η ταχύτητα της αντίδρασης

V_{\max} : η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης

$[S]$: η συγκέντρωση του υποστρώματος

K_m : η κινητική σταθερά Michaelis-Menten.

Τέλος, έγινε η καμπύλη ,non linear fit ($V=f([S])$), η οποία είχε τη μορφή κινητικής κορεσμού. Για τον υπολογισμό των K_m και K_{mapp} χρησιμοποιήθηκε το διάγραμμα, Lineweaver - Burk, διπλού αντιστρόφου. Για να υπολογιστεί η K_i , πρώτα υπολογίστηκαν οι K_{mapp} παρουσία του αναστολέα και στη συνέχεια κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα που είχε στον άξονα x τις συγκεντρώσεις του αναστολέα και στον άξονα y τις τιμές των K_{mapp} . Τέλος, χρησιμοποιώντας τη γραμμική εξίσωση, υπολογίστηκε η K_i στο σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα x'x. Αυτό το σημείο εξέφραζε το $-K_i$.

Η γραμμική αυτή εξίσωση ήταν της μορφής:

$$y = ax + \beta$$

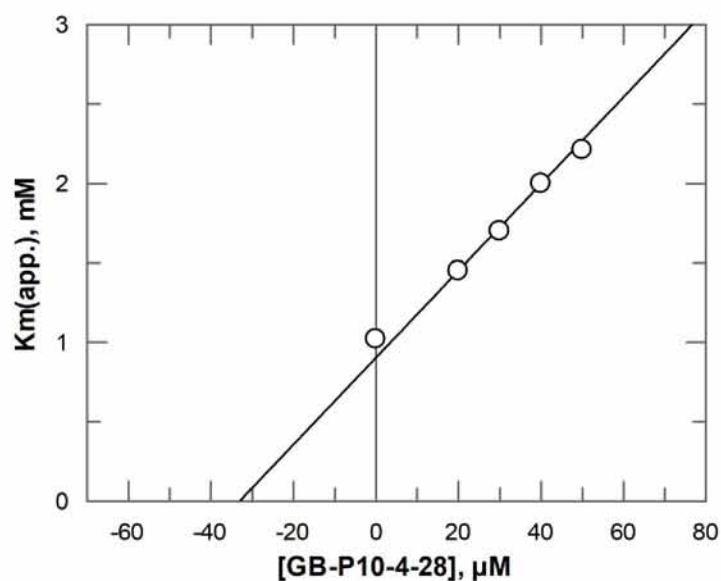
Όπου: α, η κλίσης της ευθείας (gradient ή slope) και β, η τεταγμένη επί της αρχής (intercept)

3. Αποτελέσματα

3.1 Κινητικές μελέτες

3.1.1 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα GB-P10-4-28 έναντι της hIGPa

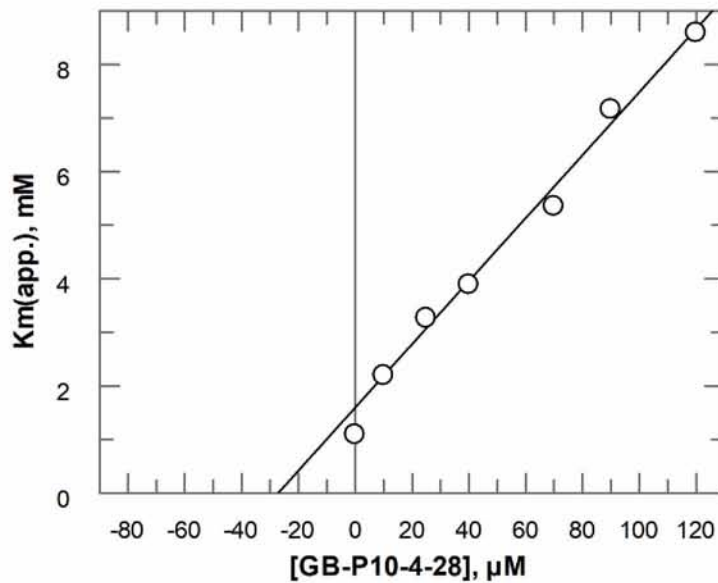
Η K_i για τον αναστολέα GB-P10-4-28 έναντι της hIGPa υπολογίστηκε σε $32.9 \pm 0.69 \mu\text{M}$ και παρουσιάζεται στην εικόνα 12 .



Εικόνα 12: Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της K_i για τον αναστολέα GB-P10-4-28 ως προς την hIGPa.

3.1.2 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα GB-P10-4-28 έναντι της rmGPb

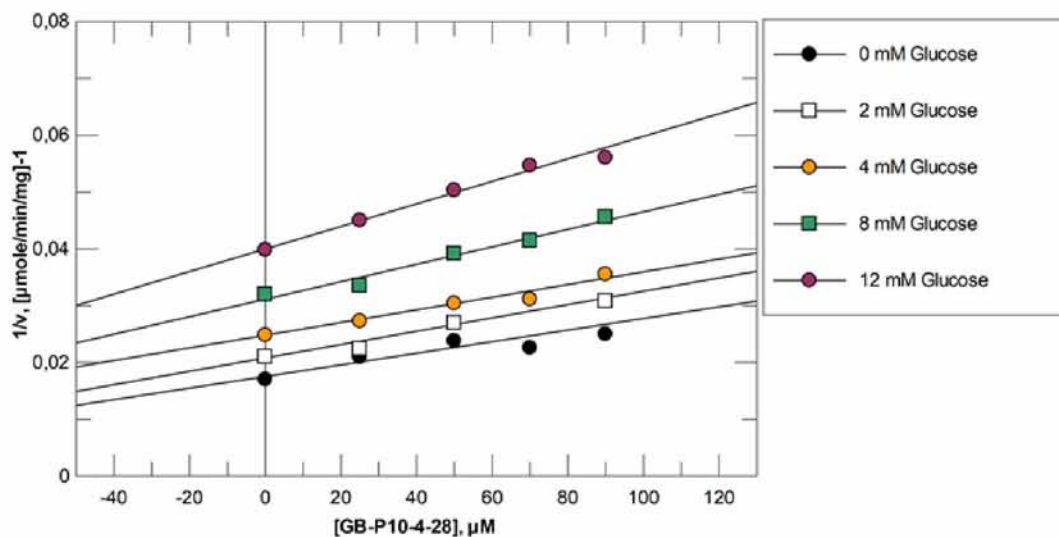
Η K_i για τον αναστολέα GB-P10-4-28 έναντι της rmGPb υπολογίστηκε σε $27.11 \pm 1.92 \mu\text{M}$ και παρουσιάζεται στην εικόνα 13.



Εικόνα 13: Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της K_i για τον αναστολέα GB-P10-4-28 ως προς την *tmGPb*.

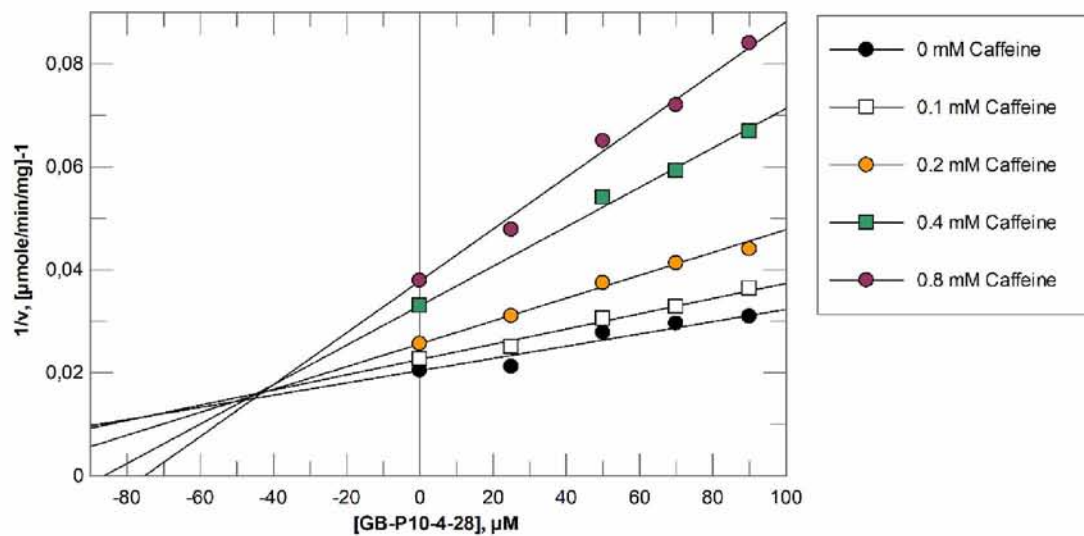
3.1.3 Προσδιορισμός του κέντρου πρόσδεσης του αναστολέα GB-P10-4-28 στη GP

Στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν ως προς την γλυκόζη, το διάγραμμα Dixon έδειξε ένα πρότυπο παράλληλων γραμμών (Εικόνα 14), υποδηλώνοντας ότι ο αναστολέας και η γλυκόζη ανταγωνίζονται για το ίδιο κέντρο πρόσδεσης, δηλαδή το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.



Εικόνα 14: Dixon plots για την *tmGPb*. Ανταγωνισμός του αναστολέα GB-P10-4-28 με τη γλυκόζη. [20]

Στις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν ως προ την καφεΐνη, το διάγραμμα Dixon (Εικόνα 15) έδωσε ευθείες οι οποίες τέμνονται μεταξύ τους, το οποίο σημαίνει ότι οι ενώσεις αυτές μπορούν να συνδεθούν ταυτόχρονα στο ένζυμο.



Εικόνα 15: Dixon plots για την *mGPb*. Απουσία ανταγωνισμού μεταξύ του αναστολέα GB-P10-4-28 και της καφεΐνης. [20]

Συζήτηση

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), κοινώς γνωστός ως διαβήτης, αποτελεί μια ομάδα μεταβολικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από τα υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα για παρατεταμένη χρονική περίοδο. Ο διαβήτης τύπου II, ξεκινά με αντίσταση του οργανισμού στην ινσουλίνη, μια κατάσταση κατά την οποία τα κύτταρα δεν ανταποκρίνονται σωστά στην ινσουλίνη η οποία μπορεί να συνδυαστεί με σχετικά μειωμένη έκκριση ινσουλίνης, είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος σακχαρώδους διαβήτη, κατά πολύ συχνότερος από τον τύπο I αποτελώντας περίπου το 90-95% των περιπτώσεων του σακχαρώδους διαβήτη.[6].

Τα ένζυμα αποικοδόμησης του γλυκογόνου αποτελούν φαρμακευτικό στόχο. Η αξιολόγηση μικρών μορίων ως εν δυνάμει αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ενός ενζύμου πρωταρχικής σημασίας για την γλυκογονόλυση, αποτελεί μια προσέγγιση για την θεραπευτική διαχείριση της υπεργλυκαιμίας που εμφανίζεται στον ΣΔ2 και γι αυτό, η φωσφορυλάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στόχος νέων αναστολέων [16].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι βιολογικά ενεργή ως διμερές μόριο δύο πανομοιότυπων υπομονάδων, ενώ μπορεί να υπάρχει ως ανενεργό μονομερές ή τετραμερές. Εντοπίζεται σε τρεις ισομορφές οι οποίες εμφανίζουν περίπου 80% με 83% ομολογία και κωδικοποιούνται από τα γονίδια PYGB, PYGM και PYGL τα οποία εκφράζονται, στον εγκέφαλο, στους μύες και στο ήπαρ αντίστοιχα.[8] Η ηπατική και η μυϊκή φωσφορυλάση είναι 90% παρόμοιες στην αμινοξική αλληλουχία όσο αναφορά τον άνθρωπο. Με κριτήριο την αλληλουχία των αμινοξέων, η μυϊκή φωσφορυλάση από κονίκλους (rmGb) έχει 97 % ομολογία με την μυϊκή φωσφορυλάση του ανθρώπου (hmGP), ενώ μεταξύ της μυϊκής και της ηπατικής φωσφορυλάσης δεν υπάρχουν δομικές διαφορές στο καταλυτικό και τα αλλοστερικά κέντρα. [18]

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες του αναστολέα GB-P10-4-28 έναντι της rmGPb και της hGPa. Οι τιμές των σταθερών αναστολής που υπολογίστηκαν για τον GB-P10-4-28 έναντι της rmGPb ήταν $K_i = 27.11 \pm 1.92$ και έναντι της hGPa ήταν $K_i = 32.9 \pm 0.69 \mu\text{M}$. Ο αναστολέας GB-P10-4-28 εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για την hGPa σε σχέση με την rmGPb. Επίσης, έγινε προσδιορισμός του κέντρου πρόσδεσης του αναστολέα παρουσία είτε γλυκόζης, είτε καφεΐνης. Τα διαγράμματα Dixon που προέκυψαν από τις κινητικές μελέτες έδειξαν ανταγωνισμό του αναστολέα GB-P10-4-28 με τη γλυκόζη και απουσία ανταγωνισμού μεταξύ του αναστολέα GB-P10-4-28 και της καφεΐνης κατι το οποίο υπέδειξε πως ο αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο.

Συγκεντρωτικά, βασικός στόχος της έρευνας που διεξάγεται στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας αποτελεί η εύρεση χημικών ενώσεων που θα μπορούν να αναστείλλουν σε σημαντικό βαθμό και τα υπόλοιπα ένζυμα του μεταβολισμού του γλυκογόνου, όπως η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου.

Βιβλιογραφία

- [1] Hayes JM, Kantsadi AL, Leonidas DD. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochemistry Reviews* 2014;13:471-98
- [2] Uazman Alam, Omar Asghar, Shazil A. Malik Chapter 15-General aspects of diabetes melitus
- [3] Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014 Feb;103(2):137-49.
- [4] American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2017;33 Suppl 1:S62-9
- [5] DYANNE P. WESTERBERG, DO Diabetic Ketoacidosis: Evaluation and Treatment. , Cooper Medical School of Rowan University, Camden, New Jersey
- [6] Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology.* 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006
- [7] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis
- [8] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry.* 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.
- [9] Thomas Traut, University of North Carolina, USA. Glycogen Phosphorylase. In: *Allosteric Regulatory Enzymes.* Springer, Boston, MA (2008)
- [10] Helmreich EJ. .How pyridoxal 5'-phosphate could function in glycogen phosphorylase catalysis. Department of Physiological Chemistry, University of Würzburg School of Medicine, FRG.
- [11] L. N. JOHNSON. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. Laboratory of Molecular Biophysics, University of Oxford, Oxford, OX1 3QU, England 1992
- [12] Treadway JL, Mendys P, Hoover DJ. Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Investig Drugs.* March 2001
- [13] Athel Cornish-Bowden. M.A., D.Phil. (Oxon)Principles of Enzyme Kinetic. May 2014

- [14] Trevor Palmer and Philip L. Bonner. Enzymes. Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry. Book, 2nd Edition, 2007
- [15] Kyriakis E, Stravodimos GA, Kantsadi AL, Chatzileontiadou DS, Skamnaki VT, Leonidas DD. Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b. FEBS Lett 2015;589:1787-94.
- [16] 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
- [17] Livanova NB, Chebotareva NA, Eronina TB, Kurganov BI. Pyridoxal 5'-phosphate as a catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase B. Biochemistry (Mosc) 2002 94
- [18] Kantsadi AL, Bokor E, Kun S, Stravodimos GA, Chatzileontiadou DS, Leonidas DD, et al. Synthetic, enzyme kinetic, and protein crystallographic studies of C-beta-d-glucopyranosyl pyrroles and imidazoles reveal and explain low nanomolar inhibition of human liver glycogen phosphorylase. Eur J Med Chem 2016
- [19] Loranne Agiu. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. Institutes of Cellular Medicine and Ageing and Health, Medical School, Newcastle University.
- [20] Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, Χημικά Χρονικά, 63, 258-261
- [21] Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.;
- [22] Lineweaver H. B, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants, J.Amer.Chem.1934
- [23] Saheki S, Takeda A, Shimazu T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. Analytic Biochem 1985
- [24] Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998
- [25] Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 1997;53:240-55.
- [26] Bollen M, Keppens S, Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. Biochem J 1998

- [27] Oikonomakos NG, Zographos SE, Skamnaki VT, Archontis G. The 1.76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase B complexed with glucose, and CP320626, a potential antidiabetic drug. *Bioorg Med Chem* 2002;10:1313-9.
- [28] 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;8:575-84.
- [29] Palm D, Klein HW, Schinzel R, Buehner M, Helmreich EJ. The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis. *Biochemistry* 1990;29:1099-107.
- [30] Amy K Rines, Kfir Sharabi, Clint D J Tavares, Pere Puigserver. Targeting Hepatic Glucose Metabolism in the Treatment of Type 2 Diabetes.
- [31] Christos E Zois, Adrian L Harris. Glycogen Metabolism Has a Key Role in the Cancer Microenvironment and Provides New Targets for Cancer Therapy.