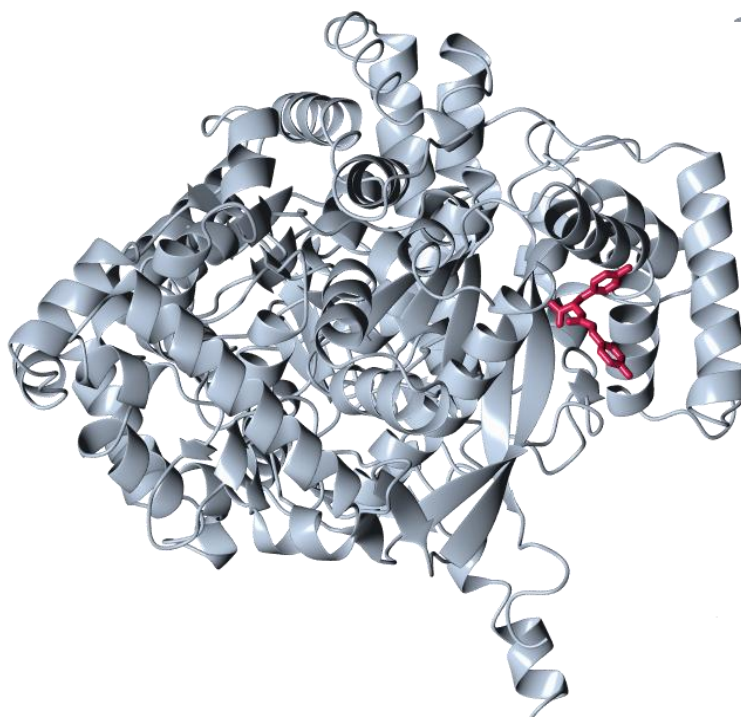


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΤΟ
ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ



Όνομα: Λευθεριώτης Σπυρίδων
Πατρώνυμο: Λευθεριώτης Ευστάθιος
Λάρισα 2021



**ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΤΟ
ΑΛΛΟΣΤΕΡΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

**BIOCHEMICAL STUDIES ON THE BINDING OF SMALL MOLECULES TO
THE ALLOSTERIC SITE OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE**

ΟΝΟΜΑ: ΛΕΥΘΕΡΙΩΤΗΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

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

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

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

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	9
1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1.....	9
1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.....	10
1.2 Ινσουλίνη	11
1.2.1 Δομή-Σύνθεση-Έκκριση ινσουλίνης	11
Εικόνα 1.	11
Εικόνα 2.	11
1.2.2 Σηματοδότηση ινσουλίνης	12
Εικόνα 3.	13
1.3 Γλυκογόνο-Μεταβολισμός του γλυκογόνου	13
Εικόνα 4.	14
1.3.1 Σύνθεση του γλυκογόνου	14
1.3.2 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου	15
Εικόνα 5.	15
1.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	16
Εικόνα 6.	16
1.4.1 Ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	16
1.4.2 Διαφορές στην ρύθμιση ηπατικής και μυϊκής φωσφορυλάσης	17
1.4.3 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	17
Εικόνα 7.	19
1.4.4 Αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου: πιθανοί υπογλυκαιμικοί παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την θεραπεία του διαβήτη	19
1.5 Κρυσταλλογραφία ακτινών Χ	20
1.5.1 Απαραίτητη προϋπόθεση: δημιουργία πρωτεϊνικών κρυστάλλων	21
1.5.2 Παράγοντες που καθορίζουν την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών.....	22
1.5.3 Ακτίνες Χ-Πηγές ακτινών Χ.....	22
1.5.4 Περίθλαση ακτινών Χ	23

Εικόνα 8.....	23
1.5.5 Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας – Βελτιστοποίηση ενός αρχικού μοντέλου ...	24
1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων	25
Εικόνα 9.....	26
1.6.1 Κινητική αλλοστερικών ενζύμων.....	26
Εικόνα 10.....	27
1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων.....	27
1.6.3 Σταθερά αναστολής.- K_i	28
Εικόνα 11.....	28
ΣΚΟΠΟΣ	29
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
2.1 Αντιδραστήρια.....	30
2.2 Οργανολογία	31
2.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών – Πηκτή <i>SDS (SDS-PAGE)</i>	31
2.4 Απομόνωση μυϊκής φωσφορυλάσης από μύες κονίκλων (rmGPb)	33
2.5 Κινητικές μελέτες έναντι της GP.....	37
Εικόνα 12.....	38
2.5.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου	38
2.5.2 Ενζυμικό διάλυμα.....	39
2.5.3 Υποστρώματα – Προσδιορισμός K_m/K_a	39
2.5.4 Προσδιορισμός της K_a^{app}	42
2.5.5 Προσδιορισμός της K_i	43
2.5.6 Ανάλυση των κινητικών δεδομένων	43
2.6 Κρυσταλλογραφικές μελέτες	44
2.6.1 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	44
Εικόνα 13.....	44
Εικόνα 14.....	45
2.6.2 Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου	45
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	47
3.1 Απομόνωση και καθαρισμός της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κονίκλους.....	47
Εικόνα 15.....	47
3.2 Κινητικές μελέτες	48

3.2.1 Προσδιορισμός της K_m της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς την συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης (<i>G1P</i>)	48
3.2.2 Προσδιορισμός της K_a της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς την συγκέντρωση της <i>AMP</i>	49
Εικόνα 17.	49
3.2.3 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα	50
Εικόνα 18.	50
3.3 Δομικά αποτελέσματα	50
Πίνακας 3.1.	51
Εικόνα 19.	52
Εικόνα 20.	53
Εικόνα 21.	53
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	56

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο που δέχθηκε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του, καθώς και για όλη την στήριξη που μου προσέφερε κατά την διάρκεια της. Η καθοδήγηση, η βοήθεια και η ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχε ήταν ανεκτίμητης αξίας. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους καθηγητές της τριμελούς μου επιτροπής, Δρ Σκαμνάκη Βασιλική και Δρ Μπαλατσό Νικόλαο για όλη την στήριξη και βοήθεια που μου παρείχαν. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας που βοήθησαν να προσαρμοστώ ταχύτατα στις απαιτήσεις ενός ερευνητικού εργαστηρίου και με έκαναν να αισθανθώ μέλος της ερευνητικής ομάδας του. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Κούλα Συμεών για την υποστήριξη σε όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Οι συμβουλές, η υπομονή και η διάθεση του ήταν καθοριστικές για να έχω την δυνατότητα να ολοκληρώσω επιτυχώς την διπλωματική μου εργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και την οικογένεια μου για τη στήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης θεωρείται μια από τις πιο σοβαρές ορμονικές διαταραχές και χαρακτηρίζεται από αυξημένη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία). Αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στην μειωμένη έκκριση της ινσουλίνης (σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1) ή στην αδυναμία της ινσουλίνης να ελέγξει μεταβολικές δράσεις παραγωγής γλυκόζης (σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2). Έτσι, όταν διαταράσσεται η φυσιολογική λειτουργία της ορμόνης, το αποτέλεσμα είναι η υπεργλυκαιμία. Οι επιπλοκές που επέρχονται στους ασθενείς από σακχαρώδη διαβήτη είναι ποικίλες και θέτουν την υγεία των ατόμων αυτών σε κίνδυνο. Συνεπώς, η εύρεση αποτελεσματικών θεραπειών για την αντιμετώπιση του σακχαρώδη διαβήτη είναι υψηλής σημασίας. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου που καταλύει τη διάσπαση του γλυκογόνου αποτελεί έναν επικυρωμένο στόχο για τον σχεδιασμό ενώσεων/αναστολέων, με την προοπτική να χρησιμοποιηθούν ως αντι-υπεργλυκαιμικοί παράγοντες. Το ένζυμο εμφανίζεται σε δύο μορφές, την *GPa*, η οποία βρίσκεται σε φωσφορυλιωμένη κατάσταση (βρίσκεται κυρίως στην *R* στερεοδιαμόρφωση με υψηλή δραστικότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα) και την *GPb*, η οποία δεν είναι φωσφορυλιωμένη (βρίσκεται κυρίως στην *T* στερεοδιαμόρφωση με χαμηλή δραστικότητα και συγγένεια με το υπόστρωμα). Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διαθέτει 6 κέντρα πρόσδεσης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι για την πρόσδεση αναστολέων, με απώτερο σκοπό την μείωση της δραστικότητας του ενζύμου αυτού. Ο μεγαλύτερος αριθμός αναστολέων που έχουν δοκιμαστεί μέχρι στιγμής αφορούν παράγωγα της γλυκόζης που συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, αναστέλλοντάς το. Ωστόσο, έχουν μελετηθεί και άλλες ενώσεις/αναστολείς που προσδέονται σε κάποιο άλλο κέντρο πρόσδεσης του ενζύμου, όπως για παράδειγμα στο αλλοστερικό κέντρο και η προοπτική για την χρήση τους ως αντιδιαβητικοί παράγοντες είναι ενθαρρυντική. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αφού πραγματοποιήθηκε η απομόνωση και ο καθαρισμός της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κονίκλους (*rmGP*), μελετήθηκε η πρόσδεση μιας ένωσης που με βάση τη χημική της δομή αναμενόταν να προσδέεται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Μέσω κινητικών πειραμάτων, αποδείχθηκε ότι η ένωση αυτή επάγει την αναστολή του ενζύμου και έγινε προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής K_i σε $43,3 \mu M$ που αντικατοπτρίζει το μέγεθος της αναστολής αυτής, ενώ μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτινών X ταυτοποιήθηκε η πρόσδεση της στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις (δεσμοί υδρογόνου, *Van der Waals*) του αναστολέα με τα κατάλοιπα του αλλοστερικού κέντρου της πρωτεΐνης.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is considered as one of the most serious hormone imbalance diseases and is characterized by increased glucose concentration in blood (hyperglycemia). This might derive from either a deficiency in insulin's secretion (diabetes mellitus type 1) or from insulin's inability to control the metabolic actions that lead to glucose production (diabetes mellitus type 2). Thus, when the physiological effect of insulin on the regulation of blood glucose concentration is impaired, the expected outcome is hyperglycemia. Complications associated with this metabolic disease are various and patients with diabetes mellitus are more likely to face health issues. Thus, the discovery of new and more efficient anti-diabetic therapies is considered crucial. Glycogen degradation is mediated by glycogen phosphorylase and this enzyme is a validated target for the development of new anti-diabetic agents. The prospects of small molecules that successfully inhibit the action of this enzyme may have anti-hyperglycemic effect is encouraging. Glycogen phosphorylase is found in two forms, GP_a, which is in a phosphorylated state (mainly found at the R state conformation displaying high enzymatic activity and affinity for substrates) and GP_b, which in a non phosphorylated form (mainly found at the T state conformation displaying low enzymatic activity and affinity for substrates). Furthermore, 6 binding sites have been indentified in glycogen phosphorylase, which can be used as targets of potential inhibitors. The majority of molecules tested so far are glucose derivatives that have the ability to bind at the catalytic site of the enzyme and suppress its function. However, molecules that bind at other binding sites, such as the allosteric binding site, have been studied as well and the prospect of their use as anti-diabetic agents is encouraging. Here, after the isolation and purification of rabbit muscle glycogen phosphorylase (rmGP), the potential inhibition of rmGP by a molecule predicted to bind at the allosteric site of the enzyme, was tested. Through kinetic experiments, the inhibition constant (K_i) for this molecule was measured to $43,3 \mu M$. Moreover, through X-ray crystallography the binding of the inhibitor at the allosteric site of the enzyme was confirmed and the protein-ligand interactions (hydrogen bonds, Van der Waals) at the allosteric site were analysed.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια πολυπαραγοντική μεταβολική ασθένεια, βασικό χαρακτηριστικό της οποίας είναι η υπεργλυκαιμία, δηλαδή αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος. Αυτή προκαλείται είτε από την ελαττωμένη έκκριση της ινσουλίνης, είτε από την αδυναμία της να ελέγξει τις φυσιολογικές μεταβολικές δράσεις παραγωγής γλυκόζης στους διάφορους ιστούς του οργανισμού είτε και από συνδυασμό αυτών των δύο.

Στα αρχικά στάδια της νόσου ο ασθενής μπορεί να είναι ασυμπτωματικός και συνεπώς να μην έχει αντιληφθεί ότι πάσχει. Ωστόσο, ορισμένα από τα συμπτώματα που μπορεί να εμφανίσει κάποιο άτομο είναι η πολουρία, η πολυδιψία η ξηροστομία, η απώλεια βάρους, η πολυφαγία, η κόπωση και η θάμβος όραση.

Οι επιπλοκές του σακχαρώδη διαβήτη διαχωρίζονται στις άμεσες και στις μακροχρόνιες. Στις άμεσες επιπλοκές ανήκει το διαβητικό κώμα που αποτελεί παράγοντα που θέτει την ζωή του ασθενή άμεσα σε κίνδυνο. Αντιθέτως, οι μακροχρόνιες επιπλοκές παρουσιάζουν μία πιο σταδιακή εξέλιξη. Ωστόσο, μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στην υγεία του ασθενή. Τέτοιες επιπλοκές είναι παθήσεις της καρδιάς και των αγγείων, παθήσεις των νεφρών, παθήσεις των ματιών, αυξημένη προδιάθεση για διάφορες λοιμώξεις και πολλές άλλες. Για τον λόγο αυτό η συχνή παρακολούθηση ατόμων που πάσχουν από διαβήτη κρίνεται απαραίτητη, τόσο για τη γλυκαιμική ρύθμιση, όσο και για να επιτευχθεί η πρόληψη και έγκαιρη αντιμετώπιση των διάφορων επιπλοκών της νόσου.

Λόγω της σοβαρότητας της νόσου απαραίτητη θεωρείται η έγκαιρη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη. Η διάγνωση τίθεται όταν κάποιο άτομο διαθέτει συγκέντρωση γλυκόζης αίματος, έπειτα από 8 ώρες νηστείας, ίση ή μεγαλύτερη από 126 mg/dL ή συγκέντρωση γλυκόζης αίματος, 2 ώρες μετά την λήψη 75 γραμμαρίων γλυκόζης, ίση ή μεγαλύτερη από 200 mg/dL. Επίσης, ένα άτομο θεωρείται ότι πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη σε περίπτωση εμφάνισης υψηλών επιπέδων γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (τιμές πάνω από 6,5).

Ανάλογα την αιτία διατάραξης της δράσης της ινσουλίνης στη ρύθμιση του μεταβολισμού, ο διαβήτης μπορεί να ταξινομηθεί σε διάφορους υπότυπους με πιο βασικούς το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και το διαβήτη της εγκυμοσύνης (1).

1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ή αλλιώς ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης ευθύνεται περίπου για ένα 5-10% όλων των διαβητικών περιπτώσεων. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτού του τύπου διαβήτη αποτελεί η ανεπάρκεια έκκρισης της

ινσουλίνης που οδηγεί σε υπεργλυκαιμία και κετοξέωση. Η ανεπάρκεια αυτή οφείλεται σε αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, δηλαδή ο οργανισμός του ασθενούς παράγει αντισώματα έναντι των β-κυττάρων του παγκρέατος και συνεπώς προάγεται η καταστροφή τους. Η αυτοάνοση αυτή καταστροφή μπορεί να προκληθεί είτε από κάποιον εξωγενή παράγοντα είτε και αυτόματα. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών που πάσχουν από αυτόν τον τύπο διαβήτη, η εκδήλωσή του πραγματοποιείται σε ηλικία μικρότερη των 20 ετών. Ωστόσο, η εμφάνισή του μπορεί να συμβεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Οι παράγοντες που μπορεί να συμβάλουν στην αυξημένη προδιάθεση ενός ατόμου για την εμφάνισή αυτού του τύπου διαβήτη είναι τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί. Ορισμένοι από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι κάποιες τοξίνες και ιοί. Η διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 είναι εφικτή μέσω χρήσης κατάλληλων ανιχνευτών που μπορούν να εξακριβώσουν την παρουσία των αυτοαντισωμάτων. Η θεραπεία αυτού του τύπου διαβήτη περιλαμβάνει την πρόσληψη ινσουλίνης για αντιστάθμιση της έλλειψης, συνήθως μέσω ένεσης (2).

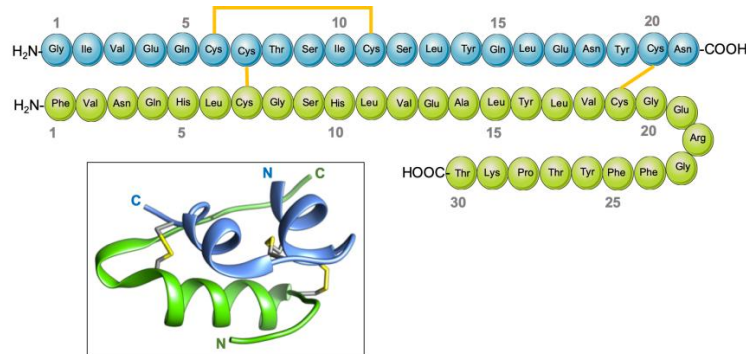
1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 ή αλλιώς ινσουλινοανεξάρτητος διαβήτης ευθύνεται για πάνω από το 90% όλων των διαβητικών περιπτώσεων παγκοσμίως. Χαρακτηρίζεται από σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης και αντίσταση των οργάνων στόχων στη δράση της ινσουλίνης (3). Έτσι, η ινσουλίνη δεν επάγει την είσοδο της γλυκόζης στα κύτταρα, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα να αυξάνονται. Λόγω των αυξημένων αυτών επιπέδων, το πάγκρεας αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης ως μια προσπάθεια μείωσης των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Αυτό μακροχρόνια μπορεί τελικά να οδηγήσει στη εξασθένηση των β-κυττάρων του παγκρέατος και συνεπώς στη μείωση της παραγωγής της ινσουλίνης (4). Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που αυξάνουν το ρίσκο εμφάνισης αυτού του είδους διαβήτη, με τον κυριότερο να αποτελεί το σωματικό βάρος. Άτομα που είναι υπέρβαρα ή παχύσαρκα έχουν αρκετά υψηλότερο ρίσκο εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 σε σχέση με άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους. Η έλλειψη σωματικής άσκησης αποτελεί έναν επιπλέον καθοριστικό παράγοντα, καθώς η σωματική άσκηση βοηθάει στον έλεγχο του σωματικού βάρους και αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Άλλοι παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης αυτού του τύπου διαβήτη είναι το οικογενειακό ιστορικό, η ηλικία, τα επίπεδα λιπιδίων στο αίμα και πολλοί άλλοι. Άτομα που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 μπορεί να εμφανίσουν διάφορες επιπλοκές που θέτουν τη ζωή τους σε κίνδυνο. Το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας που προκαλείται από αυτόν τον τύπο διαβήτη οφείλεται στην προκαλούμενη από τον διαβήτη καρδιαγγειακή νόσο (3).

1.2 Ινσουλίνη

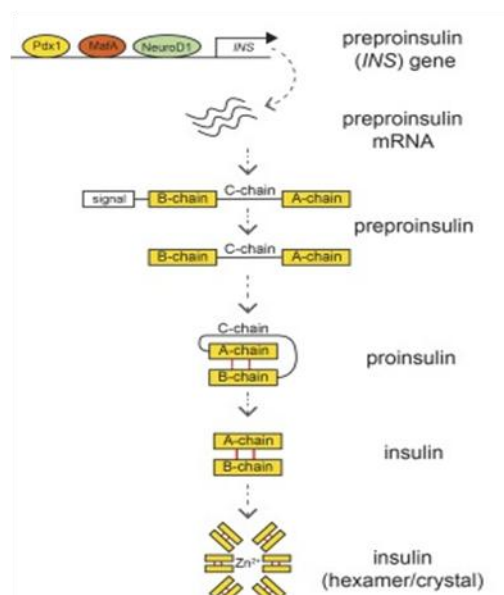
1.2.1 Δομή-Σύνθεση-Έκκριση ινσουλίνης

Η ινσουλίνη αποτελεί μια πολυπεπτιδική ορμόνη 51 αμινοξέων και το μοριακό της βάρος ισούται με 6 *kDA*. Αποτελείται από 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες 21 και 30 αμινοξέων αντίστοιχα (Εικόνα 1) (5).



Εικόνα 1. Η μια πολυπεπτιδική αλυσίδα της ινσουλίνης αποτελείται από 21 αμινοξέα και συνήθως αναφέρεται ως αλυσίδα A, ενώ η δεύτερη πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από 30 αμινοξέα και συνήθως αναφέρεται ως αλυσίδα B. Η διαμόρφωση των αλυσίδων σταθεροποιείται μέσω τριών δισουλφιδικών δεσμών. Οι δύο από αυτούς σχηματίζονται μεταξύ κυστεϊνών μεταξύ των δύο αλυσίδων, ενώ ο τρίτος μεταξύ κυστεϊνών εντός της αλυσίδας A.

Οι άνθρωποι διαθέτουν ένα μόνο γονίδιο ινσουλίνης (*INS*) το οποίο εδράζεται στο ενδέκατο χρωμόσωμα. Η έκφραση του γονιδίου της ινσουλίνης πραγματοποιείται στα κύτταρα β του παγκρέατος (Εικόνα 2) (6).



Εικόνα 2. Το γονίδιο της ινσουλίνης μεταγράφεται και παράγεται το *mRNA* της προπροινσουλίνης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η μετάφραση του *mRNA* και παραγωγή της προπροινσουλίνης. Μέσω αφαίρεσης του πεπτιδίου οδηγού του αμινοτελικού άκρου και σχηματισμού των

δισουλφιδικών δεσμών, σχηματίζεται η προϊνσουλίνη. Επόμενο βήμα είναι η πρωτεόλυση της αλυσίδας C στη συσκευή *Golgi*, με αποτέλεσμα την παραγωγή της βιολογικά δραστικής ινσουλίνης.

Σε περιπτώσεις αύξησης της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος που επέρχεται αμέσως μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες, διάφορα μεταβολικά και ηλεκτρικά σήματα προκαλούν την απελευθέρωση της ινσουλίνης στο διάμεσο χώρο του παγκρέατος, μέσω εξωκύττωσης των εκκριτικών κόκκων που περιέχουν την ινσουλίνη. Στη συνέχεια, η ινσουλίνη εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και μέσω αυτής μεταφέρεται και δρα σχεδόν σε όλους τους ιστούς ρυθμίζοντας την μεταβολική ομοιόσταση (6).

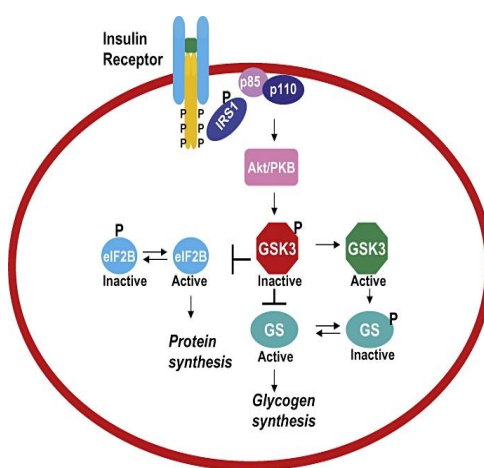
1.2.2 Σηματοδότηση ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι υπεύθυνη για την διεκπεραίωση ποικίλων μεταβολικών δράσεων. Μεταξύ αυτών, είναι η πρόσληψη γλυκόζης από κύτταρα μυϊκού και λιπώδη ιστού, η προαγωγή της σύνθεσης του γλυκογόνου με ταυτόχρονη αναστολή της αποικοδόμησης του, η προαγωγή της γλυκόλυσης με ταυτόχρονη αναστολή της γλυκονεογένεσης, η προαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης, η αναστολή της λιπόλυσης και πολλές άλλες. Ρυθμίζει δηλαδή τον μεταβολισμό υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπιδίων (7).

Αρχικά, αφού η ινσουλίνη προσεγγίσει το κατάλληλο κύτταρο-στόχο, συνδέεται στον κατάλληλο υποδοχέα της που αναφέρεται ως υποδοχέας ινσουλίνης. Ο υποδοχέας αυτός βρίσκεται σε μορφή διμερούς, όπου κάθε μονομερές αποτελείται από 2 υπομονάδες, μια εξωκυτταρική υπομονάδα άλφα και μια υπομονάδα βήτα που διαθέτει ένα τμήμα που διαπερνάει την μεμβράνη, καθώς και ένα ενδοκυτταρικό τμήμα. Η σύνδεση της ινσουλίνης πραγματοποιείται στη μια από τις δυο υπομονάδες άλφα του υποδοχέα. Το αποτέλεσμα της σύνδεσης αυτής είναι μια αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα που οδηγεί σε αυτοφωσφορυλίωση των δύο υπομονάδων βήτα σε κατάλοιπα τυροσίνης (8). Στις φωσφορυλιωμένες αυτές τυροσίνες των υπομονάδων βήτα, συνδέονται τα υποστρώματα του υποδοχέα της τυροσίνης (*IRS*), μέσω της επικράτειας πρόσδεσης σε φωσφορυλιωμένες τυροσίνες (*PTB*) και στην συνέχεια μέσω της δράσης κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα πραγματοποιείται φωσφορυλίωση των *IRS* σε τυροσίνες (7). Στις φωσφορυλιωμένες αυτές τυροσίνες των *IRS*, συνδέεται η κινάση των φωσφοϊνοσιτιδίων 3 (*PI3K*) μέσω της *src homology 2 (SH2)* επικράτειας της που βρίσκεται στην ρυθμιστική υπομονάδα της κινάσης, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της δράσης κινάσης της καταλυτικής της υπομονάδας (9).

Η ενεργοποιημένη *PI3K* προάγει την φωσφορυλίωση της 4,5-διφωσφορικής φωσφατίδουλοϊνοσιτόλης (*PIP2*) της μεμβράνης σε 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατίδουλοϊνοσιτόλη (*PIP3*). Στην *PIP3* προσδένεται η ανενεργή πρωτεϊνική κινάση Β (*PKB*), η οποία αφού πρώτα υποστεί φωσφορυλίωση από την εξαρτώμενη από φωσφοϊνοσιτίδια κινάση 1 (*PDK1*) ενεργοποιείται πλήρως. Η ενεργοποιημένη

PKB έχει πολλούς στόχους, με αποτέλεσμα να ελέγχεται ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων (7). Για παράδειγμα, φωσφορυλιώνει την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (*GSK-3*), προκαλώντας άρση της ανασταλτικής της δράσης στην συνθάση του γλυκογόνου με αποτέλεσμα η τελευταία να καθίσταται ενεργή και να προάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου. (Εικόνα 3) (10). Επίσης, προάγει τη μετατόπιση του μεταφορέα γλυκόζης *GLUT4* στη μεμβράνη, οδηγώντας έτσι στην πρόσληψη γλυκόζης από το κύτταρο (11), αναστέλλει το μεταγραφικό παράγοντα *FOXO* με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης γονιδίων που ελέγχουν τη γλυκονεογένεση και τη λιπόλυση (12), καθώς και άλλες πολλές άλλες δράσεις.

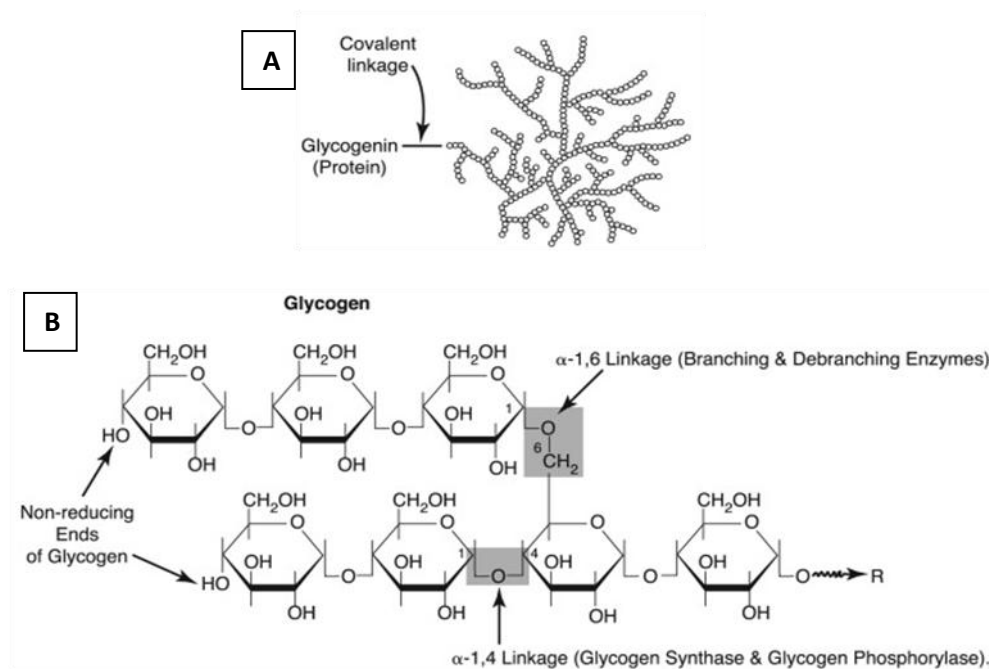


Εικόνα 3. Αναπαράσταση μηχανισμού προαγωγής της σύνθεσης του γλυκογόνου μέσω ενεργοποίησης της PKB από την ινσουλίνη

1.3 Γλυκογόνο-Μεταβολισμός του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές της γλυκόζης. Αποτελεί πηγή ενέργειας, καθώς σε περιπτώσεις ανάγκης μπορεί να διασπαστεί και να προκύψει γλυκόζη η οποία έπειτα θα χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ενέργειας. Το μεγαλύτερο ποσοστό του γλυκογόνου εντοπίζεται στο ήπαρ. Ο μεταβολισμός του ελέγχεται από διάφορες ορμόνες, μεταξύ άλλων και της ινσουλίνης, η οποία όπως ήδη αναφέρθηκε προάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου (13).

Η διακλάδωση του μορίου του γλυκογόνου λαμβάνει χώρα κατά μέσο όρο ανά 10 κατάλοιπα γλυκόζης. Ο πυρήνας κάθε μορίου γλυκογόνου αποτελείται από την πρωτεΐνη γλυκογενίνη (Εικόνα 4A). Στις γραμμικές αλυσίδες του γλυκογόνου τα μόρια της γλυκόζης είναι συνδεδεμένα με α -1,4 γλυκοσιδικούς δεσμούς, ενώ στα σημεία των διακλαδώσεων τα 2 μόρια γλυκόζης που σχηματίζουν την διακλάδωση βρίσκονται συνδεδεμένα με α -1,6 γλυκοσιδικό δεσμό. Η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου πραγματοποιείται στα μη αναγωγικά άκρα (Εικόνα 4B) (14).



Εικόνα 4. Α) Αναπαράσταση του γλυκογόνου πάνω στο οποίο βρίσκεται συνδεδεμένη με ομοιοπολικό δεσμό η γλυκογενίνη, Β) Αναπαράσταση των α -1,4 και α -1,6 γλυκοσιδικών δεσμών, καθώς και των μη αναγωγικών άκρων

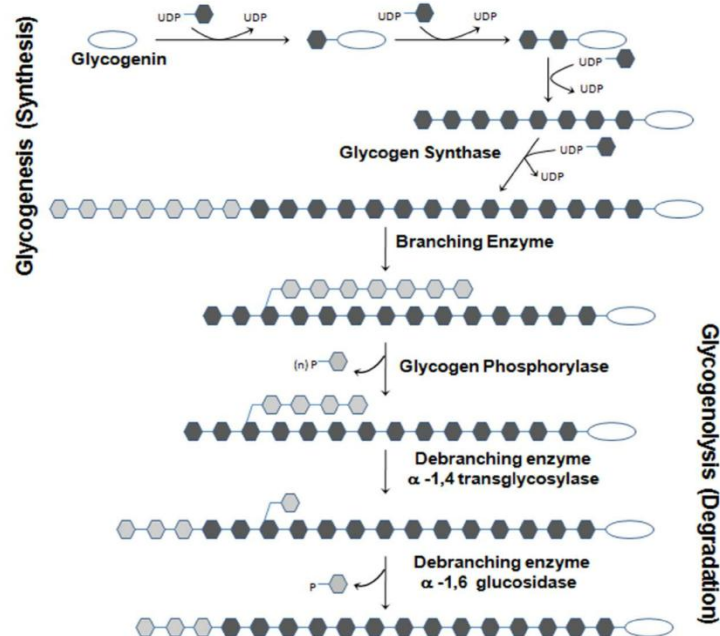
1.3.1 Σύνθεση του γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου λαμβάνει χώρα στο ήπαρ και στους μύες και επάγεται συνήθως έπειτα από ένα γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα προκαλεί την έκκριση της ινσουλίνης από τα β -κύτταρα του παγκρέατος. Η ινσουλίνη στη συνέχεια προάγει την είσοδο της γλυκόζης στα μυϊκά και ηπατικά κύτταρα μέσω του μεταφορέα γλυκόζης *GLUT4*. Αρχικά, μέσω της γλυκογενίνης επάγεται η δημιουργία μιας πρόδρομης αλυσίδας 10-20 καταλοίπων γλυκόζης με δότη σακχάρου την *UDP*-γλυκόζη. Απαραίτητο ένζυμο για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του γλυκογόνου αποτελεί η συνθάση του γλυκογόνου. Μέσω της δράσης αυτού του ενζύμου είναι δυνατή η προσθήκη μορίων γλυκόζης στο γλυκογόνο μέσω σχηματισμού α -1,4-γλυκοζιτικών δεσμών, με αποτέλεσμα την επιμήκυνση της αλυσίδας κατά ένα μόριο γλυκόζης. Δότη του σακχάρου αποτελεί και πάλι η *UDP*-γλυκόζη και η προσθήκη των καταλοίπων της γλυκόζης μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε ένα μη αναγωγικό άκρο. Το ένζυμο αυτό ρυθμίζεται θετικά από την 6-φωσφορική γλυκόζη και αρνητικά από την φωσφορυλίωση της από την *GSK-3*. Τέλος, απαραίτητη είναι και η δράση ενός άλλου ενζύμου, του ενζύμου διακλάδωσης, το οποίο σχηματίζει τις διακλαδώσεις

μέσω δημιουργίας α -1,6 γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ 2 καταλοίπων γλυκόζης (Εικόνα 5) (13,14).

1.3.2 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

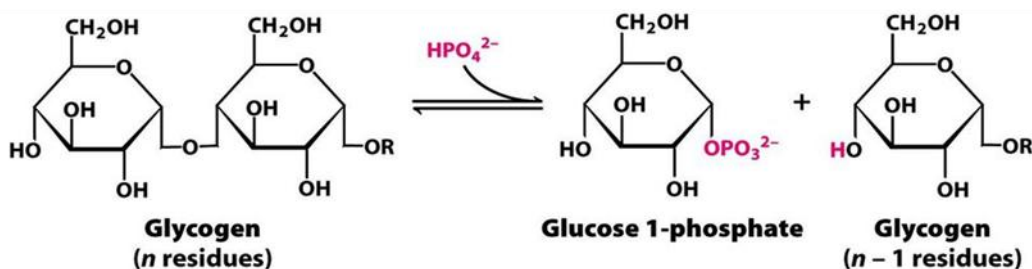
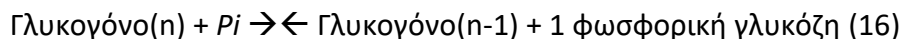
Η διάσπαση του γλυκογόνου στο κυτταρόπλασμα επιτυγχάνεται με την μεσολάβηση ενζύμων. Αρχικά, μέσω της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου απελευθερώνεται 1-φωσφορική γλυκόζη από το γλυκογόνο μέσω διάσπασης του α -1,4 γλυκοζιτικού δεσμού. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται φωσφορόλυση και είναι ενεργειακά προτιμώμενη από μια απλή υδρόλυση καθώς το σάκχαρο που απελευθερώνεται είναι ήδη φωσφορυλιωμένο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ενέργειας μέσω της γλυκόλυσης. Ωστόσο, η φωσφορυλάση δεν μπορεί να ολοκληρώσει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου μόνη της, διότι αδυνατεί να διασπάσει τους α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων γλυκόζης στα σημεία των διακλαδώσεων. Η δράση της φωσφορυλάσης σταματά 4 κατάλοιπα γλυκόζης πριν το σημείο της διακλάδωσης. Έπειτα, απαραίτητη θεωρείται η συμμετοχή ενός άλλου ενζύμου με διπλή δράση για την ολοκλήρωση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου, του ενζύμου αποδιακλάδωσης. Μέσω της δράσης μεταφοράς του ενζύμου αυτού προωθείται η μετατόπιση 3 καταλοίπων γλυκόζης σε μία άλλη εσωτερική διακλάδωση. Τέλος, μέσω της δράσης α -1,6 γλυκοζιτάσης επάγεται η αποσύνδεση των σημείων διακλάδωσης, μέσω υδρόλυσης των α -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών, απελευθερώνοντας ελεύθερη γλυκόζη (Εικόνα 5) (15,16,17)



Εικόνα 5. Συνοπτική αναπαράσταση των βημάτων που εμπλέκονται στην σύνθεση και στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου (17)

1.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Στον άνθρωπο υπάρχουν 3 μορφές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η μυϊκή, η ηπατική και η εγκεφαλική. Η μυϊκή και η ηπατική φωσφορυλάση εμφανίζουν περίπου 90% ομοιότητα στην αμινοξική τους αλληλουχία. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Οδηγεί στην διάσπαση ενός α-1,4 γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ 2 καταλοίπων γλυκόζης στα μη αναγωγικά άκρα, μέσω της προσθήκης ορθοφωσφορικού αποδίδοντας 1-φωσφορική γλυκόζη και ένα μόριο γλυκογόνου που διαθέτει πλέον ένα κατάλοιπο γλυκόζης λιγότερο στον σκελετό του (Εικόνα 6). Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής :



Εικόνα 6. Αναπαράσταση της αντίδρασης που καταλύεται από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

Συνένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί η φωσφορική πυριδοξάλη, η οποία σχηματίζει βάση *Schiff* με την λυσίνη 680 του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Εκεί παίζει το ρόλο οξεοβασικού καταλύτη αποκλείοντας την επαφή με νερό στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και εξασφαλίζεται η φωσφορολυτική δράση του ενζύμου (18).

1.4.1 Ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διαθέτει 2 μορφές, την *a* και την *b*, οι οποίες αναφέρονται ως *GPa* και *GPb* αντίστοιχα. Η *GPa* αποτελεί τη φωσφορυλιωμένη μορφή του ενζύμου, ενώ η *GPb* αντιστοιχεί στην μη φωσφορυλιωμένη μορφή. Η μετατροπή της *GPb* σε *GPa* μέσω φωσφορυλίωσης επάγεται από την ορμόνη επινεφρίνη, η οποία μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης A (*PKA*) επάγει τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η ενεργοποιημένη κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου καταλύει τη φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στη σερίνη 14.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ 2 καταστάσεων, τις *T* και *R*. Η *R* κατάσταση αποτελεί μια χαλαρή και ενεργή κατάσταση του ενζύμου, ενώ η *T* μια ελάχιστα ενεργή και τεταμένη κατάσταση του ενζύμου. Στην κατάσταση *R* το ενεργό κέντρο του ενζύμου δεν φράζεται και συνεπώς οι θέσεις σύνδεσης του φωσφορικού ιόντος και του γλυκογόνου είναι ευκολότερα προσβάσιμες. Η

φωσφορυλίωση του ενζύμου (μετατροπή σε *GP_a*), καθώς και η αλλοστερική πρόσδεση της *AMP* οδηγούν στη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατάσταση *R* με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου. Αντίθετα, η αποφωσφορυλίωση του ενζύμου (μετατροπή σε *GP_b*), καθώς και η αλλοστερική ρύθμιση μέσω σύνδεσης γλυκόζης, *ATP* και 6-φωσφορικής γλυκόζης προκαλούν τη σταθεροποίηση της κατάστασης *T*, με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση του ενζύμου. (16,19,20)

1.4.2 Διαφορές στην ρύθμιση ηπατικής και μυϊκής φωσφορυλάσης

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου διαφέρει μεταξύ των 2 ισομορφών (μυός και ήπατος). Η ηπατική φωσφορυλάση βρίσκεται συνήθως στην *GP_a* μορφή και στην *R* κατάσταση για την παραγωγή γλυκόζης και την επιτυχή παροχή της στους υπόλοιπους ιστούς. Ωστόσο, σε περίπτωση ύπαρξης επαρκών επιπέδων γλυκόζης, η σύνδεση της γλυκόζης στο ενεργό κέντρο επιφέρει την μετάπτωση του ενζύμου στην *T* ανενεργή κατάσταση. Η εξάρτηση της ηπατικής φωσφορυλάσης από την *AMP* είναι ελάχιστη, καθώς στο ήπαρ δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές του ενεργειακού φορτίου. Αντίθετα, στους μύες η φωσφορυλάση βρίσκεται συνήθως στην *GP_b* μορφή. Κατά την σύσπαση των μυών, η μετατροπή της *ATP* σε *AMP* οδηγεί σε υψηλά επίπεδα του τελευταίου που μπορούν να προκαλέσουν την μετάπτωση του ενζύμου στην κατάσταση *R* και συνεπώς και την ενεργοποίησή του. Η σύνδεση της *AMP* λαμβάνει χώρα σε μια ειδική θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου που διαθέτει το ένζυμο. Σε κατάσταση ηρεμίας των μυών τα υψηλά επίπεδα *ATP* και φωσφορικών διατηρούν την φωσφορυλάση του γλυκογόνου στην ανενεργή *T* κατάσταση. (16,20)

1.4.3 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου βρίσκεται σε μορφή ομοδιμερούς, αποτελούμενη από 2 πανομοιότυπες υπομονάδες με μοριακό βάρος 97 *kDa*. Η αμινοτελική περιοχή του ενζύμου, που διαθέτει και τη θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου, αποτελείται από 480 κατάλοιπα, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή, που διαθέτει και την θέση πρόσδεσης της *PLP*, αποτελείται από 360 κατάλοιπα και η δομή της περιλαμβάνει έναν πυρήνα β-φύλλων που περιβάλλεται από α-έλικες. Οι 2 αυτές δομικές περιοχές σχηματίζουν μια σχισμή στην οποία εντοπίζεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου. (16,21,) Γενικά το ένζυμο διαθέτει 6 κέντρα δέσμευσης (Εικόνα 7) μορίων και είναι τα εξής:

1. Καταλυτικό κέντρο : Ξεκινά από ένα κανάλι μήκους 15 Å το οποίο παρέχει προσβασιμότητα. Αναστολείς που έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε αυτό το κέντρο προκαλούν την υιοθέτηση της κλειστής διαμόρφωσης του βρόχου 280s με αποτέλεσμα να προάγεται η μετάπτωση στην κατάσταση *T* του ενζύμου κατά την οποία όπως ήδη αναφέρθηκε, εμποδίζεται η πρόσδεση του υποστρώματος. Η πλειονότητα τέτοιων αναστολέων που έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο

καταλυτικό κέντρο αποτελούν ανάλογα της γλυκόζης και έχει ήδη αποδειχθεί η ικανότητα δράσης τους ως υπογλυκαιμικοί παράγοντες (22).

2. Κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου: Το κέντρο αυτό εντοπίζεται στην επιφάνεια του μορίου σε απόσταση περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και αποτελεί τη θέση δέσμευσης του γλυκογόνου. Αποτελείται από 2 έλικες και έναν βρόχο που συνδέει 2 αντιπαράλληλους κλώνους. Δεν έχει μελετηθεί εκτενώς η πρόσδεση αναστολέων σε αυτό το κέντρο του ενζύμου. Ωστόσο, ορισμένοι αναστολείς που έχουν βρεθεί ότι προσδένονται σε αυτό το κέντρο είναι οι κυκλοδεξτρίνες, η ακαρβόζη, η μαλτοπεντόζη και η μαλτοεπταόζη. Ο μηχανισμός πρόσδεσης των μορίων αυτών περιλαμβάνει την δημιουργία δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα *Asn407*, *Ser429* και *Lys473*, καθώς και μεσολαβούντες από το νερό αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα *Gln401*, *Arg426*, *Val431* και *Gln433* (22).

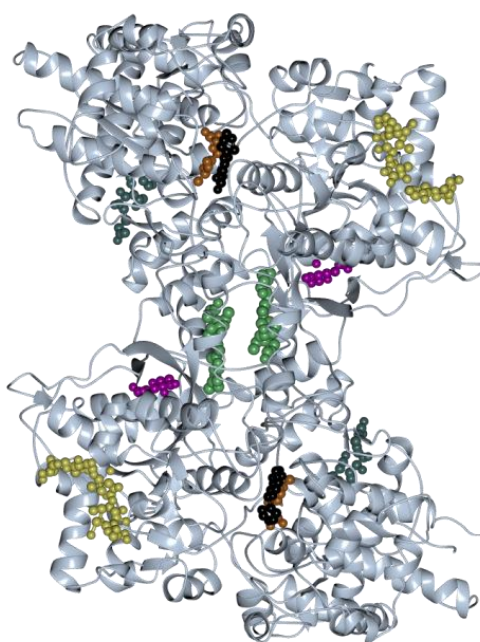
3. Κέντρο αναστολής: Το κέντρο αυτό εντοπίζεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Προσδέτες που δεσμεύονται σε αυτό το κέντρο αλληλεπιδρούν με τις αρωματικές πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων *Phe285* και *Tyr613* μέσω σχηματισμού αλληλεπιδράσεων π-π. Η ανασταλτική δράση μορίων που δεσμεύονται στο κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου καθορίζεται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης. Αυτό το γεγονός προσφέρει το πλεονέκτημα ότι σε περίπτωση επιστροφής των επιπέδων γλυκόζης στα φυσιολογικά περιορίζεται η ανασταλτική τους δράση και αποφεύγεται ο κίνδυνος εμφάνισης υπογλυκαιμίας. Το πρώτο μόριο που βρέθηκε να προσδέεται σε αυτό και να αναστέλλει το ένζυμο ήταν η καφεΐνη και για τον λόγο αυτό είναι γνωστό και ως κέντρο πρόσδεσης της καφεΐνης (22).

4. Αλλοστερικό κέντρο: Στοιχεία και των 2 υπομονάδων του ενζύμου συμβάλλουν στο σχηματισμό του αλλοστερικού κέντρου. Τέσσερις β-κλώνοι μαζί με δύο α-έλικες δημιουργούν μια κοιλότητα (χαρακτηριστικού σχήματος V) που κλείνει από μια άλλη περιοχή (κατάλοιπα 36-47) και έτσι σχηματίζεται το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο αυτό έχει την ικανότητα να προσδέει φωσφορυλιωμένες ενώσεις όπως *AMP*, *IMP*, *ATP*, 6-φωσφορική γλυκόζη και άλλες. Έτσι οι ενώσεις αυτές μέσω της πρόσδεσης τους στο κέντρο αυτό δρουν ως αναστολείς (π.χ. 6-φωσφορική γλυκόζη) ή ως ενεργοποιητές (π.χ. *AMP*) του ενζύμου. Η πρόσδεση μορίων-αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε αυτό το κέντρο πρόσδεσης οδηγεί σε αναστολή του ενζύμου μέσω ανταγωνισμού με την *AMP* ή μέσω μετατόπισης της ισορροπίας του ενζύμου προς την κατάσταση T (22).

5. Νέο αλλοστερικό κέντρο: Μία σειρά ίνδολο-2-καρβοξυαμιδίων που αποτελούσαν εξαιρετικά ισχυρούς αναστολείς του ενζύμου, βρέθηκε πως δεσμεύονται σε μια νέα (για εκείνη την εποχή) περιοχή, ξεχωριστή από τα άλλα καλά χαρακτηρισμένα κέντρα. Το νέο αυτό κέντρο που απέχει 15 Å από το αλλοστερικό, 33 Å από το καταλυτικό και 37 Å από το κέντρο αναστολής, ονομάστηκε νέο αλλοστερικό κέντρο

και εντοπίζεται μέσα στην κεντρική κοιλότητα του ενζύμου. Το ένα άκρο αυτής της κεντρικής κοιλότητας σχηματίζεται από την περιοχή *car'* και από την έλικα α_2 , ενώ το άλλο άκρο από τον πύργο των ελίκων α_7 . Αναστολείς που δεσμεύονται στο κέντρο αυτό μετατοπίζουν την ισορροπία του ενζύμου προς την κατάσταση *T* (22).

6. Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης: Ένας μεγάλος αριθμός φλαβονοειδών προσδένονται στο κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, όπως η χρυσίνη και η φλαβοπυριδόλη. Ωστόσο, μέσω μίας μελέτης που διεξάχθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, βρέθηκε ότι το φλαβονοειδές κερσετίνη προσδέεται σε ένα νέο κέντρο. Το κέντρο αυτό βρίσκεται σε απόσταση 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό, και 32 Å από το κέντρο αναστολής ονομάστηκε κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης. Η κερσετίνη, κατά την δέσμευσή της στο ένζυμο, σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου με την *Lys544* και την *Arg551* και ευνοεί τη σταθεροποίηση της κατάστασης *T* (22).



Εικόνα 7. Αναπαράσταση της δομής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, στην οποία επισημαίνονται τα 6 κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου. Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στο νέο αλλοστερικό κέντρο, το μαύρο στο κέντρο αναστολής, το χρυσό στο κέντρο πρόσδεσης του γλυκογόνου, το καφέ στο καταλυτικό κέντρο, το σκούρο γκρι στο κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης και το μωβ στο αλλοστερικό κέντρο.

1.4.4 Αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου: πιθανοί υπογλυκαιμικοί παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την θεραπεία του διαβήτη

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί στόχο για την ανάπτυξη αντιδιαβητικών θεραπειών. Η χρήση αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μπορεί να

έχει επιρροή στα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος, καθώς αναστολή του ενζύμου αυτού οδηγεί σε αναστολή της απελευθέρωσης της γλυκόζης από το γλυκογόνο. Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός φυσικών και συνθετικών ενώσεων που ασκούν ανασταλτική δράση στο ένζυμο αυτό, μέσω δέσμευσης τους σε κάποιο κέντρο πρόσδεσης του ενζύμου. Τέτοιοι αναστολείς έχουν παρουσιάσει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου είναι αυτό που έχει μελετηθεί εκτενέστερα για το σχεδιασμό τέτοιων αναστολέων (23). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί η ανασταλτική δράση αναλόγων της γλυκόζης που είναι υποκατεστημένα στον άνθρακα C-1 στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι όντως τέτοια ανάλογα συνδέονται ειδικά στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης και επάγουν τη σταθεροποίηση της ελάχιστη ενεργής T κατάστασης (24,25). Ωστόσο, η ύπαρξη 3 ισομορφών του ενζύμου καθιστά δύσκολο το σχεδιασμό κάποιου αναστολέα που στοχεύει ειδικά την επιθυμητή ισομορφή. Γενικά, για τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, θεωρείται επιθυμητή η αναστολή της ηπατικής ισομορφής, κάτι το οποίο θεωρείται εξαιρετικά δύσκολο λόγω της υψηλής ομολογίας των 3 ισομορφών. Βέβαια, το γεγονός ότι το ήπαρ αποτελεί το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα, καθιστά δυνατή την εύρεση της κατάλληλης δόσης για να επιτευχθεί η στόχευση της ηπατικής ισομορφής (26). Μέσω άλλων μελετών που αφορούν την σύνδεση μορίων στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου, έχει αποδειχθεί ότι η δέσμευση μορίων στην θέση πρόσδεσης της *AMP*, οδηγεί αλλοστερικά στην αναστολή της πρόσδεσης της 1-φωσφορικής γλυκόζης με αποτέλεσμα την αναστολή του ενζύμου (27).

Γενικά, για τις μελέτες μορίων που αποτελούν υποψήφιους αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου χρησιμοποιείται συχνά η μυϊκή φωσφορυλάση από κονίκλους. Η αμινοξική αλληλουχία αυτού του ενζύμου έχει 80% ομολογία με την ανθρώπινη ηπατική ισομορφή, ενώ έχει επιτευχθεί και ο προσδιορισμός της δομής του μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών X (28). Στόχος όλων των προσπαθειών που καταβάλλονται από διάφορες επιστημονικές ομάδες είναι η εύρεση κάποιου αναστολέα που να δρα σε όσο το δυνατό χαμηλότερες συγκεντρώσεις και να προκαλεί μερική αναστολή της δράσης του ενζύμου ώστε να μειωθεί η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα χωρίς να προκληθούν άλλα προβλήματα. Σε περίπτωση που πληρούνται αυτά τα κριτήρια υπάρχει το ενδεχόμενο δημιουργίας ενός φαρμακευτικού σκευάσματος που θα συμβάλει στη θεραπεία των διαβητικών ασθενών.

1.5 Κρυσταλλογραφία ακτινών X

Η κρυσταλλογραφία ακτινών X αποτελεί μια μέθοδο προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών σε ατομικό επίπεδο. Το 1971 ιδρύθηκε η

protein data bank (PDB), η οποία αποτελεί μια βάση δεδομένων που περιλαμβάνει όλες τις γνωστές δομές πρωτεϊνικών μορίων. Στο έτος δημιουργίας της υπήρχαν μόνο 7 καταχωρήσεις ενώ το 2020 αυτές οι καταχωρήσεις έφτασαν τις 172.956, από τις οποίες ένα εντυπωσιακό ποσοστό, πάνω από 80%, είχε προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτινών Χ! Συνεπώς είναι ολοφάνερο πως αυτή η μέθοδος αποτελεί την κυρίαρχη μέθοδο προσδιορισμού της δομής πρωτεϊνών και μέσω των πληροφοριών που προσφέρει καθιστά δυνατό τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων (*structure based drug design*) (29).

1.5.1 Απαραίτητη προϋπόθεση: δημιουργία πρωτεϊνικών κρυστάλλων

Για τη συλλογή δεδομένων που θα επιτρέψουν τον προσδιορισμό της δομής μιας πρωτεΐνης, απαραίτητη καθίσταται η περίθλαση των ακτινών Χ από μόρια της πρωτεΐνης. Ωστόσο, ένα μεμονωμένο μόριο της πρωτεΐνης περιθλά ασθενώς τις ακτίνες Χ. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται ανάπτυξη κρυστάλλων της πρωτεΐνης. Οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι αποτελούνται από πολλά μόρια της πρωτεΐνης διατεταγμένα σε μια σταθερή και επαναλαμβανόμενη διάταξη, η οποία διατηρείται μέσω σχηματισμού μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων, που ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές. Έτσι, πραγματοποιείται ενίσχυση της περίθλασης των ακτινών Χ, σε σχέση με αυτή του μεμονωμένου μορίου, σε μετρήσιμο επίπεδο. Η επαναλαμβανόμενη μονάδα του κρυσταλλικού πλέγματος που με απλή μετάθεση στις τρεις διαστάσεις μπορεί να αποδώσει το κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα. Συνεπώς η μορφολογία ενός κρυστάλλου εξαρτάται άμεσα από τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας (a,b,c) (30).

Κατά το σχηματισμό ενός κρυστάλλου, τα μόρια της πρωτεΐνης μεταπίπτουν από την υγρή φάση στη στερεή. Κατά τη μετάβαση αυτή πραγματοποιείται μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης και σχηματισμός των κρυσταλλικών επαφών. Για να επιτευχθεί αυτό, το διάλυμα της πρωτεΐνης πρέπει να βρίσκεται σε κατάσταση υπερκορεσμού. Δηλαδή, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτή που μπορεί να διαλυθεί στην συγκεκριμένη ποσότητα διαλύτη υπό συγκεκριμένες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Το πρώτο βήμα για τον σχηματισμό του κρυστάλλου είναι ο σχηματισμός πυρήνων κρυστάλλου, ενώ το δεύτερο βήμα είναι η ανάπτυξη των κρυστάλλων από τους ήδη προσχηματισμένους πυρήνες. Κατά το πρώτο βήμα, πρέπει να υπάρχει μεγάλη προσοχή για την εφαρμογή των κατάλληλων συνθηκών ώστε από τη μία να βρεθεί το διάλυμα στην κατάσταση υπερκορεσμού για να μπορούν να σχηματιστούν οι πυρήνες, αλλά από την άλλη να μην σχηματιστούν ταχύτατα πολλαπλοί πυρήνες που θα εξαντλήσουν το διάλυμα της κρυστάλλωσης οδηγώντας στον σχηματισμό μικροσκοπικών κρυστάλλων. Πρέπει δηλαδή να υπάρχει μια ισορροπία ώστε να αναπτυχθούν οι κατάλληλοι μεγάλοι μονοκρύσταλλοι που θα περιθλούν ικανοποιητικά τις ακτίνες Χ. Επίσης, για να κρυσταλλωθεί μια πρωτεΐνη πρέπει να έχει υψηλό βαθμό

καθαρότητας (συνήθως πάνω από 95%) και να είναι καλά αναδιπλωμένη, καθώς ένας πληθυσμός μη ή τυχαία αναδιπλωμένων πρωτεϊνικών μορίων δεν μπορεί να διαταχθεί με τάξη για την δημιουργία κρυστάλλων (30).

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για να επιτευχθεί η κρυστάλλωση, όπως οι μέθοδοι *Batch*, *Bulk*, διάχυση ατμών (κρεμάμενη και καθήμενη σταγόνα), διαπίδυση, διάχυση μέσω επιφάνειας και άλλες (30). Πολλές φορές οι κρύσταλλοι που προκύπτουν δεν είναι κατάλληλοι για την κρυσταλλογραφία ακτινών Χ. Για το λόγο αυτό συχνά πρέπει να επιτευχθεί η βελτιστοποίηση τους για να προκύψουν κρύσταλλοι που περιθλούν ικανοποιητικά τις ακτίνες Χ. Αυτό μπορεί να γίνει με την μεταβολή των συνθηκών κρυστάλλωσης, αλλά και μέσω της μεθόδου μικροπυρήνωσης (*microseeding*) που χρησιμοποιούνται οι αρχικοί κρύσταλλοι ως πυρήνες κρυστάλλωσης (31).

1.5.2 Παράγοντες που καθορίζουν την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση και μπορεί να είναι είτε χημικοί είτε φυσικοί αλλά και βιοχημικοί. Αρχικά, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης τόσο πιο πολύ ευνοείται η αλληλεπίδρασή των πρωτεϊνικών μορίων για τον σχηματισμό κρυστάλλων. Επίσης, πολύ σημαντικό ρόλο έχουν η θερμοκρασία και το *pH*. Για κάθε πρωτεΐνη υπάρχουν οι κατάλληλες τιμές *pH* και θερμοκρασίας, οι οποίες οδηγούν στην ελάχιστη διαλυτότητα της πρωτεΐνης ευνοώντας την κρυστάλλωση. Επίσης, για τη διευκόλυνση της διαδικασίας, χρησιμοποιούνται ορισμένοι παράγοντες που οδηγούν το διάλυμα της πρωτεΐνης σε υπερκορεσμό και έτσι ευνοούν την κρυστάλλωση. Οι παράγοντες αυτοί ονομάζονται παράγοντες κατακρήμνισης. Στους συχνά χρησιμοποιούμενους παράγοντες κατακρήμνισης ανήκουν τα άλατα. Βέβαια, σε χαμηλές συγκεντρώσεις η αύξηση της συγκέντρωσης ενός άλατος οδηγεί σε αύξηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης, λόγω εξουδετέρωσης των επιφανειακών φορτίων της (Εναλάτωση). Ωστόσο, από ένα κρίσιμο σημείο και μετά, η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος οδηγεί σε μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης, λόγω ανταγωνισμού με τα πρωτεϊνικά μόρια στη δέσμευση των μορίων ύδατος (Εξαλάτωση), με αποτέλεσμα να ευνοείται η κρυστάλλωση. Επιπλέον στους παράγοντες κατακρήμνισης ανήκουν και οι οργανικοί διαλύτες αλλά και πολυμερή (πχ *PEG*), καθώς και αυτά ανταγωνίζονται με τα πρωτεϊνικά μόρια στην δέσμευση μορίων ύδατος, αλλά προκαλούν και μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς, με αποτέλεσμα να ευνοείται ο συνωστισμός των πρωτεϊνικών μορίων που θα οδηγήσει στον σχηματισμό κρυστάλλων (30).

1.5.3 Ακτίνες Χ-Πηγές ακτινών Χ

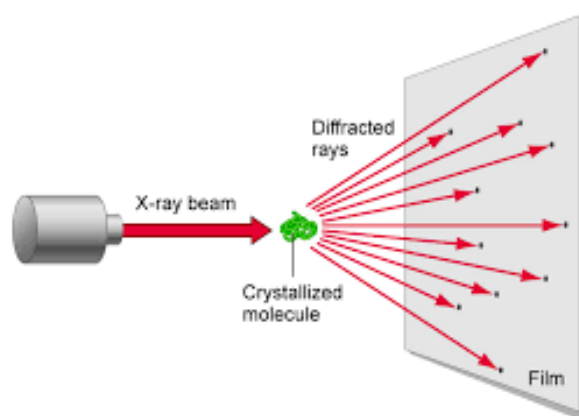
Οι ακτίνες Χ είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με αρκετά μικρό μήκος κύματος (10^{-8} - 10^{-12} m) που είναι αντίστοιχο με το μέγεθος των ατόμων και έτσι μπορούμε να

δούμε τις πρωτεΐνες σε ατομική διακριτικότητα (1.5 Å). Ακτίνες X συγκεκριμένου μήκους κύματος (μονοχρωματική δέσμη ακτίνων X) παράγονται σε σωλήνες υψηλής τάσης. Λόγω της υψηλής τάσης υπάρχει ο κίνδυνος θέρμανσης μιας μεταλλικής πλάκας στο εσωτερικό των σωλήνων κατά την δημιουργία της μονοχρωματικής δέσμης. Συνεπώς, απαραίτητη θεωρείται η ψύξη της πλάκας αυτής κατά την παραγωγή των ακτίνων X. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολύ ισχυρές πηγές ακτίνων X, οι δακτύλιοι αποθήκευσης σωματιδίων ή αλλιώς *synchrotrons*. Αποτελούνται από ένα κυκλικό δακτύλιο κενού, όπου τα ηλεκτρόνια ταξιδεύουν σε παρα πολύ υψηλές ταχύτητες υπό την επίδραση μαγνητών που βρίσκονται στην περιφέρεια του δακτυλίου. Η τεράστια ισχύς των ακτίνων από πηγές *synchrotron* παρέχουν στους κρυσταλλογράφους τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν και μικρούς κρυστάλλους για την απόκτηση διαγραμμάτων περίθλασης, αλλά και την δυνατότητα καταγραφής δεδομένων υψηλής ευκρίνειας (32).

1.5.4 Περίθλαση ακτίνων X

Η ισχυρή μονοχρωματική δέσμη ακτίνων X που παράγεται από μια πηγή ακτίνων X προσπίπτει στον υπό μελέτη κρύσταλλο. Το μεγαλύτερο μέρος (περίπου 98%) δεν αλληλεπιδρά με αυτόν και απλά διέρχεται από αυτόν και στη συνέχεια συλλέγεται από ένα εξάρτημα που ονομάζεται *beamstop*, γιατί επιθυμητή θεωρείται η καταγραφή μόνο των περιθλώμενων ακτίνων X (περίπου 2%). Οι ακτίνες που αλληλεπιδρούν με τα ηλεκτρόνια των ατόμων του κρυστάλλου, οδηγούν στην ταλάντωση των ηλεκτρονίων αυτών. Έτσι παρατηρείται σκέδαση των ακτίνων X προς διάφορες κατευθύνσεις .

Οι σκεδαζόμενες ακτίνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και στο μεγαλύτερο ποσοστό αλληλοαναιρούνται. Ωστόσο, ένα μικρό ποσοστό συμβάλλει και παράγονται περιθλώμενες δέσμες που μπορούν να συλλεχθούν από ανιχνευτές. Ένας τέτοιος ανιχνευτής μπορεί να είναι είτε ηλεκτρονικός ή απλά ένα φιλμ ακτίνων X (Εικόνα 8) (33).



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση ενός κρυσταλλογραφικού πειράματος (33).

Για να μπορέσει να γίνει σύνδεση του διαγράμματος περίθλασης αυτού με τη δομή του κρυστάλλου, χρησιμοποιείται ο νόμος του *Bragg*. Ο *Lawrence Bragg* απέδειξε ότι η περίθλαση πραγματοποιείται αποκλειστικά όταν η διαφορά στην απόσταση ισούται με το μήκος κύματος (ή με κάποιο ακέραιο πολλαπλάσιό του) της ακτινοβολίας. Έτσι, προέκυψε η εξής σχέση μεταξύ της γωνίας σκέδασης (θ), της απόστασης μεταξύ των επιπέδων του κρυστάλλου (d) και του μήκους κύματος (λ) της ακτινοβολίας:

$$2d\sin\theta = n\lambda$$

Έτσι, με τη χρήση αυτής της σχέσης καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός των διαστάσεων της στοιχειώδους κυψελίδας (32).

Επίσης, από την θέση πρόσπτωσης των κυμάτων είναι δυνατός ο προσδιορισμός της διεύθυνσης των κυμάτων. Η ένταση της ανάκλασης αντιστοιχεί στο πλάτος, ενώ το μήκος κύματος ισούται με το μήκος κύματος της πηγής παραγωγής των ακτινών X . Ωστόσο, για την πλήρη περιγραφή μιας ανάκλασης απαιτείται και ο υπολογισμός της φάσης. Καθώς οι ακτίνες X έχουν πολύ μικρό μήκος κύματος, η συχνότητα για τις ακτίνες αυτές είναι πάρα πολύ υψηλή και συνεπώς είναι πολύ δύσκολος ο προσδιορισμός της φάσης κυμάτων με τέτοιες συχνότητες. Για να λυθεί αυτό το πρόβλημα χρησιμοποιούνται ορισμένες μέθοδοι, όπως η πολλαπλή ισόμορφη αντικατάσταση με χρήση βαρέων ατόμων και η μοριακή αντικατάσταση με την χρήση γνωστής δομής μια πρωτεΐνης με υψηλή ομολογία με αυτήν που μελετάμε (32).

1.5.5 Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας – Βελτιστοποίηση ενός αρχικού μοντέλου

Μέσω της χρήσης των πληροφοριών που εξάγονται από τις ανακλάσεις προκύπτει ένας χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Αυτός περιέχει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα ρ για κάθε σημείο (x,y,z) της στοιχειώδους κυψελίδας. Η ποιότητα ενός τέτοιου χάρτη καθορίζεται από την ευκρίνεια (*resolution*). Όσο μικρότερη η ευκρίνεια τόσο καλύτερος και πιο λεπτομερής είναι ένας χάρτης. Ως ευκρίνεια ορίζεται η ελάχιστη απόσταση που μπορούν να έχουν 2 σημεία για να διακρίνονται ως ξεχωριστά. Σημεία που απέχουν λιγότερο από αυτήν την απόσταση φαίνονται ως ενωμένα (32).

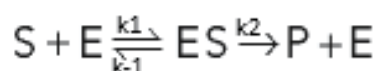
Αρχικά, κατασκευάζεται ένα αρχικό μοντέλο που αντιπροσωπεύει το καλύτερο δυνατό ταίριασμα μεταξύ της γνωστής χημικής σύστασης του μορίου και της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Βέβαια, καθώς ένα αρχικό μοντέλο σίγουρα θα έχει και λάθη, πολύ σημαντική θεωρείται βελτιστοποίηση του μοντέλου μέσω ορισμένων τροποποιήσεων για να υπάρχει καλύτερο ταίριασμα της δομής με το χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Το πόσο συμφωνεί ένα μοντέλο με τα δεδομένα μπορεί να προσδιοριστεί από τον παράγοντα R . Όσο πιο κοντά είναι η τιμή αυτού του παράγοντα προς το 0% τόσο καλύτερο θεωρείται και το ταίριασμα. Τιμές R

μικρότερες ή ίσες με 0,2 ή 20% υποδεικνύουν ότι το μοντέλο είναι αντιπροσωπευτικό ενός καλού ταιριάσματος (34).

1.6 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Τα ένζυμα λειτουργούν ως καταλύτες, επιταχύνοντας τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό. Τα ένζυμα χαρακτηρίζονται από υψηλή εξειδίκευση και η δράση πολλών από αυτά εξαρτάται από μικρά μόρια που ονομάζονται συμπαράγοντες (16), όπως και στο παράδειγμα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, όπου είναι κρίσιμη η παρουσία του συμπαράγοντα *PLP* (18).

Η ταχύτητα κατάλυσης V_o αναφέρεται στο ρυθμό παραγωγής του προϊόντος της αντίδρασης. Γενικά όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος (S), τόσο υψηλότερες τιμές θα έχει και η V_o . Ωστόσο, σε κάποιο σημείο η V_o φτάνει στη μέγιστη τιμή της και δεν αυξάνεται με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Το 1913, οι *Michaelis* και *Menten* πρότειναν ότι καθοριστικό παράγοντα για την κατανόηση της δράσης των ενζύμων είναι το γεγονός ότι τα ένζυμα σχηματίζουν ένα ενδιάμεσο συμπλόκου ενζύμου/υποστρώματος (ES). Αυτό το σύμπλοκο μπορεί είτε να διασπαστεί είτε να αποδώσει το προϊόν της αντίδρασης. Το μοντέλο που προτάθηκε είναι το εξής:



Όπου:

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

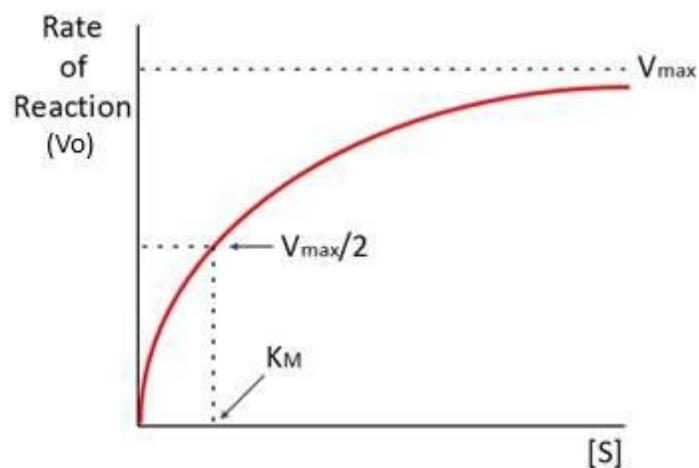
E : Ένζυμο

S : Υπόστρωμα

ES : Σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P : Προϊόν

Κατασκεύασαν ένα διάγραμμα που απεικονίζει την σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του υποστρώματος $[S]$ με την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης (Εικόνα 9)



Εικόνα 9. Κινητική *Michaelis – Menten*. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα η σταθερά Michaelis (K_m) αντιστοιχεί στη συγκέντρωση υποστρώματος που απαιτείται ώστε η ταχύτητα της αντίδρασης να ισούται με το μισό της μέγιστης ταχύτητας ($V_{max}/2$)

Για τον υπολογισμό της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης οι Michaelis και Menten κατέληξαν στην εξής μαθηματική εξίσωση:

$$V_o = V_{max} [S] / [S] + K_m$$

Όπου:

V_o : ταχύτητα της αντίδρασης

V_{max} : μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης. Ισούται με την κινητική σταθερά k_2

K_m : σταθερά Michaelis. Διαθέτει μονάδες συγκέντρωσης και είναι ενδεικτική της συγγένειας μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος.

[S]: συγκέντρωση υποστρώματος (16)

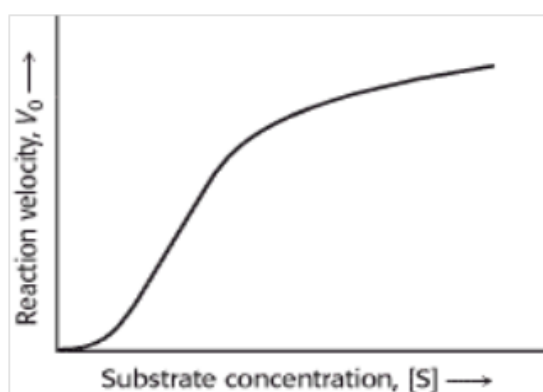
Για τον προσδιορισμό των τιμών K_m και V_{max} πολύ χρήσιμο είναι το διάγραμμα *Lineweaver-Burk* ή διπλού αντιστρόφου. Αποτελεί μια μαθηματική προσαρμογή της εξίσωσης *Michaelis-Menten* με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα διάγραμμα $1/V_o$ προς $1/[S]$ με ευθεία γραμμή, όπου το σημείο τομής της ευθείας με τον άξονα x αποτελεί το λόγο $-1/K_m$, η κλίση της ευθείας αντιστοιχεί στον λόγο K_m/V_{max} και το σημείο τομής με τον άξονα y αντιστοιχεί στον λόγο $1/V_{max}$. Η εξίσωση είναι η εξής :

$$1/V_o = K_m/V_{max} [S] + 1/V_{max} \quad (16)$$

1.6.1 Κινητική αλλοστερικών ενζύμων

Παρόλο που η κινητική *Michaelis-Menten* μπορεί να εξηγήσει τη συμπεριφορά ενός μεγάλου αριθμού ενζύμων, υπάρχουν ορισμένα ένζυμα που δεν υπακούουν σε αυτή. Μια χαρακτηριστική περίπτωση τέτοιων ενζύμων αποτελούν τα αλλοστερικά ένζυμα. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, αλλοστερικό ένζυμο αποτελεί και η

φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν συχνά μια σιγμοειδή καμπύλη κινητικής (Εικόνα 10). Χαρακτηριστικό αυτών των ενζύμων είναι η ύπαρξη πολλαπλών υπομονάδων και ενεργών κέντρων. Έτσι η πρόσδεση ενός υποστρώματος σε ένα από τα ενεργά κέντρα μπορεί να διευκολύνει (συνέργεια) ή να εμποδίζει την πρόσδεση στα άλλα κέντρα. Στη περίπτωση της συνέργειας παρατηρείται η χαρακτηριστική σιγμοειδής καμπύλη κινητικής. Βέβαια, στα αλλοστερικά ένζυμα η δραστηριότητα μπορεί να επηρεάζεται και από την πρόσδεση άλλων μορίων σε θέσεις εκτός των καταλυτικών κέντρων. Έτσι η δραστηριότητα ενός αλλοστερικού ενζύμου μπορεί να προσαρμόζεται στις ανάγκες του κυττάρου (16).



Εικόνα 10. Κινητική αλλοστερικών ενζύμων.

1.6.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Η πρόσδεση ορισμένων μικρών μορίων στα ένζυμα ενδέχεται να προκαλεί μείωση της δραστηριότητά τους. Τα μόρια αυτά ονομάζονται αναστολείς των ενζύμων και μπορούν να συνδέονται είτε μη αντιστρεπτά, δηλαδή να συνδέονται ισχυρά με το ένζυμο με αποτέλεσμα τον αργό διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου/αναστολέα, είτε αντιστρεπτά, δηλαδή να υπάρχει ταχύς διαχωρισμός του συμπλόκου ενζύμου/αναστολέα. Υπάρχουν διάφορα ήδη αντιστρεπτής αναστολής:

1) Συναγωνιστική αναστολή: Σε αυτόν τον τύπο αναστολής, η θέση πρόσδεσης του ενζύμου με τον αναστολέα είναι η ίδια με την θέση πρόσδεσης του υποστρώματος. Συνεπώς, εμποδίζεται η δέσμευση του υποστρώματος στην θέση αυτή και η ταχύτητα της αντίδρασης μειώνεται. Ωστόσο, αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος οδηγεί σε εκτόπιση του αναστολέα με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η προσέγγιση της μέγιστης ταχύτητας της αντίδρασης σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Βέβαια σε αυτόν τον τύπο αναστολής απαιτείται υψηλότερη συγκέντρωση υποστρώματος για την επίτευξη οποιασδήποτε τιμής ταχύτητας. Συνεπώς, η K_m σε αυτόν τον τύπο αναστολής είναι αυξημένη. Γενικά, η K_m που προκύπτει μετά από την αναστολή ενός ενζύμου ονομάζεται φαινομενική K_m (K_m^{app})

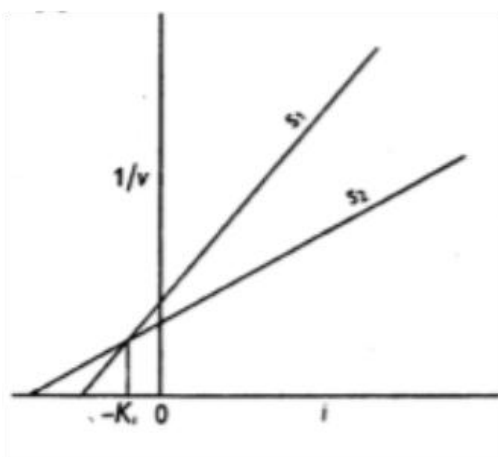
2) Μη συναγωνιστική αναστολή: Σε αυτόν τον τύπο αναστολής, ο αναστολέας και το υπόστρωμα προσδένονται σε διαφορετικές θέσεις. Συνεπώς, ο αναστολέας μειώνει την δραστηριότητα του ενζύμου χωρίς να επιδρά στην αλληλεπίδραση υποστρώματος ενζύμου. Συνεπώς, η αναστολή που προκαλεί δεν μπορεί να αναιρεθεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Για αυτόν τον λόγο, η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης είναι μειωμένη. Η K_m^{app} σε αυτόν τον τύπο αναστολής παραμένει σταθερή.

3) Ασυναγώνιστη αναστολή: Σε αυτόν τον τύπο αναστολής, η δημιουργία του συμπλόκου ενζύμου/υποστρώματος οδηγεί στον σχηματισμό της θέσης πρόσδεσης του αναστολέα. Συνεπώς, ο αναστολέας προσδένεται μόνο στο σύμπλοκο ενζύμου/υποστρώματος και η αναστολή που προκαλεί δεν μπορεί να αναιρεθεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Για αυτόν τον λόγο, η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης είναι μειωμένη. Επίσης, η K_m^{app} σε αυτόν τον τύπο αναστολής είναι επίσης μειωμένη (16).

1.6.3 Σταθερά αναστολής - K_i

Η σταθερά αναστολής K_i αποτελεί έναν δείκτη του επιπέδου αναστολής. Όσο μικρότερη είναι η τιμή της K_i τόσο ισχυρότερη είναι η ανασταλτική δράση του αναστολέα. Ο υπολογισμός της μπορεί να πραγματοποιηθεί με την βοήθεια διαγραμμάτων. Συγκεκριμένα το διάγραμμα $1/V_o$ προς τη συγκέντρωση του αναστολέα ($[i]$) (διάγραμμα διπλού αντιστρόφου) μπορεί να δώσει τέτοιες πληροφορίες. Χρησιμοποιώντας 2 συγκεντρώσεις υποστρώματος προκύπτουν 2 ευθείες γραμμές, που περιέχουν πληροφορίες για τον προσδιορισμό της K_i . Αυτές οι ευθείες στην περίπτωση της συναγωνιστικής αναστολής τέμνονται σε κάποιο σημείο αριστερά του άξονα $y'y$ και το σημείο αυτό αποτελεί την $-K_i$ (Εικόνα 11). Η εξίσωση σε αυτήν την περίπτωση αναστολής είναι η εξής:

$$1/V_o = 1/V_{max} + K_m/V_{max} (1 + [i]/K_i) (1/[S]) \quad (36)$$



Εικόνα 11. Προσδιορισμός της σταθεράς K_i μέσω διαγράμματος διπλού αντιστρόφου στην περίπτωση συναγωνιστικής αναστολής (36).

ΣΚΟΠΟΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια ομάδα μεταβολικών ασθενειών που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία, δηλαδή από αυξημένες τιμές γλυκόζης του αίματος. Η σοβαρότητα της νόσου είναι μεγάλη και οι επιπλοκές που επέρχονται θέτουν την ζωή των ασθενών σε κίνδυνο (9). Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου που οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος (16). Συνεπώς, το ένζυμο αυτό αποτελεί έναν στόχο για την ανάπτυξη αντιδιαβητικών θεραπειών, για τον διαβήτη τύπου 2. Η χρήση αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μπορεί να έχει αντι-υπεργλυκαιμική επίδραση στους ασθενείς αυτούς, οδηγώντας σε επαναφορά των επιπέδων γλυκόζης στα φυσιολογικά όρια (23). Ωστόσο, η ύπαρξη των 3 ισομορφών του ενζύμου καθιστά δύσκολη την στόχευση της επιθυμητής ισομορφής, η οποία είναι αυτή του ήπατος. Βέβαια το γεγονός ότι το ήπαρ αποτελεί το κύριο όργανο έκθεσης στα φάρμακα, δίνει την δυνατότητα εύρεσης της κατάλληλης δόσης που θα βοηθήσει στην στόχευση κυρίως της ηπατικής ισομορφής (26). Η έρευνα για τέτοιους αναστολείς αφορά κυρίως αναστολείς του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου, μέσω χρήσης αναστολέων που είναι παράγωγα της γλυκόζης (24,25). Βέβαια έχουν διεξαχθεί και πολλές μελέτες για άλλα κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου, όπως για παράδειγμα για το αλλοστερικό κέντρο πρόσδεσης, όπου συνδέεται και ο ενεργοποιητής του ενζύμου, το *AMP* (27). Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διεξαγωγή κινητικών και δομικών μελετών για να βρεθεί ο βαθμός αναστολής που έχει ένας υποψήφιος αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου πάνω στο ένζυμο αυτό, ο οποίος μετά από μελέτες βιοπληροφορικής προβλέπεται ότι δεσμεύεται στο αλλοστερικό κέντρο πρόσδεσης, οδηγώντας στην αναστολή του ενζύμου.

Οι μελέτες διεξάγονται σε φωσφορυλάση από μύες κονίκλων (*rmGPb*). Αυτή η φωσφορυλάση επιλέγεται καθώς είναι εύκολα διαθέσιμη και παράλληλα είναι εύκολη η κρυστάλλωσή της για την διεξαγωγή των δομικών μελετών. Οι διαφορές μεταξύ μυϊκής και ηπατικής ισομορφής δεν οφείλονται σε αλλαγές των καταλοίπων στα οποία προσδένονται οι διάφοροι προσδέτες. Μόνο σε 171 αμινοξέα παρατηρούνται διαφορές μεταξύ της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης (*hlGPb*) και της *rmGPb*, η πλειονότητα των οποίων δεν οδηγούν σε αλλαγή της λειτουργικότητας. Επίσης, τα κατάλοιπα του αλλοστερικού κέντρου που προσδένουν την *AMP* είναι συντηρημένα μεταξύ αυτών των 2 μορφών της φωσφορυλάσης. Συνεπώς, οποιοδήποτε συμπέρασμα προκύψει από τις μελέτες στην *rmGPb* θα μπορεί να θεωρηθεί ότι ισχύει και για την ανθρώπινη ηπατική ισομορφή (22).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρία
<i>Acetic acid</i>	<i>Fluka</i>
<i>Acrylamide</i>	<i>Serva</i>
<i>Adenosine Monophosphate</i>	<i>Sigma</i>
<i>Ammonium Molybdate</i>	<i>Sigma</i>
<i>Ammonium Persulfate</i>	<i>Serva</i>
<i>Ammonium Sulfate</i>	<i>Fluka</i>
<i>BES</i>	<i>Sigma</i>
<i>Bis acrylamide</i>	<i>Serva</i>
<i>Coomasie Brilliant Blue R-250</i>	<i>Pierce</i>
<i>Dimethyl sulfoxide</i>	<i>PanReac Applichem</i>
<i>Dithiothreitol</i>	<i>Sigma</i>
<i>Ethanol Absolut</i>	<i>Fluka</i>
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	<i>Scharlam</i>
<i>Glycerol</i>	<i>VWR Chemicals</i>
<i>Glycine</i>	<i>APOLLO Scientific</i>
<i>Glycogen from oyster type II</i>	<i>Sigma</i>
<i>Hydrochloric acid</i>	<i>Scharlau</i>
<i>Imidazole</i>	<i>Aldrich</i>
<i>Potassium Bicarbonate</i>	<i>Sigma</i>
<i>L-ascorbic acid</i>	<i>Sigma</i>
<i>Magnesium acetate tetrahydrate</i>	<i>Sigma</i>
<i>Methanol</i>	<i>Scharleu</i>
<i>Potassium biocarbonate</i>	<i>Sigma</i>
<i>SDS</i>	<i>Serva</i>
<i>TEMED</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>Tris ultra pure</i>	<i>Eurolone</i>

<i>Zinc acetate</i>	<i>Sigma</i>
<i>β-GP</i>	<i>Sigma</i>
<i>β-Mercaptoethanol</i>	<i>ALDFIISCH</i>
Πυκνό διάλυμα αμμωνίας	<i>Fluka</i>

2.2 Οργανολογία

Όργανο	Εταιρία
Φυγόκεντρος	<i>Hermle Labortechnik GmbH</i> <i>Hitachi</i>
Πεχάμετρο	<i>Metrohm</i>
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης	<i>Biorad</i>
Υδατόλουτρο, <i>Wisebath</i>	<i>Wisd</i>
Φωτόμετρο	<i>VWR</i> <i>PerkinElmer</i>
Μεμβράνες διαπίδυσης	<i>Sigma</i>
Χρονόμετρο	<i>Cell signaling technology</i>
Αναλυτικός ζυγός	<i>KERN</i>
Πηγή ακτινών Χ	<i>MicrostarBrukerRotatingAnode</i>
Καταγραφέας <i>mar345dtb</i>	<i>marXperts GmbH</i>
Ροή αζώτου	<i>OxfordCryosystems</i>
Στερεοσκόπιο	<i>OlympusTL2</i>
<i>Vortex</i>	<i>KISKER</i>
<i>Stir plate</i>	<i>nuova</i>

2.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών – Πηκτή SDS (SDS-PAGE)

Κατά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου με σκοπό τον διαχωρισμό τους. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να αποκτηθούν πληροφορίες για το μοριακό βάρος, το φορτίο και το βαθμό καθαρότητας των πρωτεϊνών.

Για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η πηκτή πολυακρυλαμίδιου στην οποία επάγεται πολυμερισμός του μονομερούς ακρυλαμίδιου παρουσία ελευθέρων ριζών προς πολυακρυλαμίδιο. Για την επίτευξη

του πολυμερισμού πολύ σημαντικό είναι το N,N μεθυλένο-δισ- ακρυλαμίδιο που ονομάζεται και αντιδραστήριο διασταύρωσης. Αναγκαία είναι η ύπαρξη ρυθμιστικού διαλύματος, καθώς και υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) που σχηματίζει ελεύθερες ρίζες και είναι υπεύθυνο για την έναρξη του πολυμερισμού. Τέλος, χρησιμοποιείται και η N,N-τετραμέθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED) ως αντιδραστήριο καταλύτης, καθώς προκαλεί επιτάχυνση του πολυμερισμού της ακρυλαμίδης.

Σε πηκτή SDS χρησιμοποιείται το απορρυπαντικό SDS, το οποίο μετουσιώνει τις πρωτεΐνες. Το SDS είναι αρνητικά φορτισμένο και έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, καταργώντας τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις προσδίδοντας αρνητικό φορτίο. Έτσι, οι πρωτεΐνες αποκτούν όλο αρνητικό φορτίο και μπορούν να κινηθούν υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου προς τον θετικό πόλο. Όταν ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε πηκτή SDS, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος και όχι βάση φορτίου ή της τρισδιάστατης διαμόρφωσης. Για το λόγο αυτό, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σε αυτό το είδος πηκτής πραγματοποιείται αποκλειστικά βάση του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών και δεν εξαρτάται από την τρισδιάστατη διαμόρφωση των πρωτεϊνών ή από το φορτίο τους. Γενικά, ισχύει πως οι μικρότερες πρωτεΐνες κινούνται πιο γρήγορα και για μεγαλύτερη διαδρομή, καθώς αύξηση του μεγέθους οδηγεί σε αύξηση της τριβής που προκαλεί μείωση της κινητικότητας.

Η κατασκευή που δημιουργείται διαθέτει 2 υάλους που απέχουν 1 χιλιοστό. Τα δείγματα εισάγονται σε ειδικές θέσεις της κατασκευής (βοθρία) που σχηματίζονται μέσω της προσθήκης μιας χτένας. Αυτή η κατασκευή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και μετά γίνεται η προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος (25 mM Tris-HCl, 192 mM γλυκίνη, 0,1% (w/v) SDS). Για την προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται χρήση ρυθμιστικού διαλύματος 4X ώστε η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε όλα τα δείγματα να είναι η ίδια και η τελική αραιώση των δειγμάτων να είναι 1X (10% (v/v) γλυκερόλη, 154 mM Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 0,01% (v/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 1,25% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη). Η β-μερκαπτοαιθανόλη του ρυθμιστικού διαλύματος εισάγεται ως αναγωγικός παράγοντας που διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς της πρωτεΐνης και συμβάλλει στην κατάργηση της τρισδιάστατης διαμόρφωσής της. Έπειτα, τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά στους 95-98 °C για να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος. Στη συνέχεια, τα δείγματα φορτώνονται στα βοθρία, μαζί με μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους και η συσκευή συνδέεται με τροφοδοτικό που δημιουργεί ηλεκτρικό πεδίο.

Το σύστημα αποτελείται από 2 πηκτές, την πηκτή επιστοιβάξης με pH 6.8 (με Tris/HCl) και την πηκτή διαχωρισμού με pH 8.8 (με Tris/HCl) και από το διάλυμα ηλεκτροδίου με pH 8.3 (με Tris/γλυκίνη). Λόγω των διαφορών στο pH αρχικά οι πρωτεΐνες συσσωρεύονται στην πηκτή επιστοιβάξης και στη συνέχεια ευνοείται ο

διαχωρισμός τους στην πηκτή διαχωρισμού. Το φορτίο της γλυκίνης καθορίζεται από το pH . Η ισχύς του πεδίου προκαλεί την αρνητικά φορτισμένη γλυκίνη να εισέλθει στο πήκτωμα επιστοιβάξης. Στο νέο αυτό περιβάλλον το φορτίο της γλυκίνης γίνεται ουδέτερο και αυτή η αλλαγή επάγει την πολύ αργή μετακίνηση στο ηλεκτρικό πεδίο. Αντίθετα, τα ιόντα χλωρίου μετακινούνται γρηγορότερα και έτσι σχηματίζεται ένα μέτωπο ιόντων που μεταναστεύει μπροστά από τη γλυκίνη. Έτσι, τα επίπεδα της κινητικότητας των πρωτεϊνών είναι ενδιάμεσα από αυτά της γλυκίνης και των ιόντων χλωρίου και σχηματίζεται μια ενδιάμεση ζώνη μεταξύ της γλυκίνης και των ιόντων χλωρίου. Όταν φτάσουν σε σημείο με pH 8.8 τα μόρια γλυκίνης αποκτούν ξανά αρνητικό φορτίο και πλέον μετακινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα από τις πρωτεΐνες. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε μια ζώνη ενδιάμεσα από τα 2 πηκτώματα και έτσι ξεκινάει ο διαχωρισμός τους βάση το μέγεθος.

Αφού ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός, ακολουθεί η χρώση του πηκτώματος. Αρχικά, πραγματοποιείται βρασμός μέσω διαλύματος οξικού οξέος σε φούρνο μικροκυμάτων για ένα λεπτό. Στη συνέχεια, αφού απομακρυνθεί το διάλυμα οξικού οξέος γίνεται προσθήκη του διαλύματος χρώσης (0,1% (v/v) *Coomassie Blue R250*, 10% (v/v) οξικό οξύ, 50% (v/v) μεθανόλη). Έπειτα το πήκτωμα επανατοποθετείται στο φούρνο για 1 λεπτό και ακολουθεί ανάδευση 10 λεπτών. Μετά, απομακρύνεται το διάλυμα χρώσης και γίνεται προσθήκη ξανά του διαλύματος οξικού οξέος και ακολουθεί βράσιμο για 1 λεπτό. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται τρεις με πέντε φορές. Τέλος, μέχρι να ελαχιστοποιηθεί ο θόρυβος, το πήκτωμα διατηρείται σε διάλυμα οξικού (36).

2.4 Απομόνωση μυϊκής φωσφορυλάσης από μύες κονίκλων (*rmGPb*)

Για την επίτευξη της απομόνωσης της *rmGPb* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος *Fischer & Krebs* (37) σε μια τροποποιημένη εκδοχή της. Η τροποποίηση στο πρωτόκολλο αφορά την χρήση της 2-μερκαπτο-αιθανόλης αντί της *L*-κυστεΐνης στα διάφορα στάδια απομόνωσης.

Υλικά

1. 3 αρσενικοί κόνικλοι της ποικιλίας *oryctolagnus cunicullus*
2. Διάλυμα CH_3COOH 1 N
3. Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης του ενζύμου, 50:50:1 (50 mM β φωσφογλυκερόλη/*HCL*, 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM *EDTA*) , pH 6.8
4. Κεκορεσμένο διάλυμα $KHCO_3$, Διάλυμα κορεσμού 90% $(NH_4)_2SO_4$
5. Μembrάνες διαπίδυσης (έπειτα από επεξεργασία με 1% (w/v) Na_2CO_3 και 10 mM *EDTA* σε θερμοκρασία 100 °C , εκπλύσεις με απιονισμένο

ύδωρ πριν από την χρήση τους και αποθήκευση σε 20% (v/v) αιθανόλη στους 4 °C)

6. Διάλυμα 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M pH 7.0
7. Διάλυμα EDTA 0.1 M, pH 7.0
8. Διάλυμα Tris/HCL 0,001 M, pH 7.5
9. Διάλυμα Tris 2 M
10. Διάλυμα AMP 0,1 M, pH 7.0
11. Διάλυμα $(CH_3COO)_2Mg$, 1 M, pH 7.0
12. Γλυκερόλη

Όργανα

1. Πεχάμετρο
2. Χρονόμετρο
3. Φυγόκεντρος
4. Αναλυτικός ζυγός
5. Φασματοφωτόμετρο

Πειραματική Διαδικασία

1^η Ημέρα

A) Παραλαβή μυϊκού εκχυλίσματος

Πραγματοποιείται αφαίρεση του μυϊκού ιστού του κονίκλου από τους ραχιαίους μυς και την περιοχή πίσω από τα πόδια μέσω μαχαιριού/νυστεριού. Ταυτόχρονα, απομακρύνεται το λίπος του κονίκλου. Αφού ολοκληρωθεί η συλλογή του ιστού, τοποθετείται σε πάγο για καλή διατήρηση. Έπειτα, μέσω κρεατομηχανής γίνεται η ομογενοποίηση του ιστού και ο μυϊκός ιστός που λήφθηκε ζυγίζεται με σκοπό τον προσδιορισμό της μάζας του και επανατοποθετείται σε πάγο. Τα 3 κουνέλια απέδωσαν 2700 γραμμάρια μυϊκού ιστού. Στη συνέχεια, ο κιμάς που προέκυψε, εκχυλίστηκε με απιονισμένο ύδωρ τρεις φορές, ώστε να σπάσουν τα κοκκία του γλυκογόνου. Στις πρώτες 2 εκχυλίσεις χρησιμοποιούνται τόσα mL απιονισμένου ύδατος όσα και τα γραμμάρια του ιστού που συλλέχθηκαν (2700 mL), ενώ στη τελευταία τα μισά (1350 mL). Κάθε εκχύλιση διαρκεί 10 λεπτά και περιλαμβάνει διήθηση με τη χρήση διπλής γάζας. Μετά την ολοκλήρωση των διαδοχικών εκχυλίσεων, πραγματοποιείται διήθηση με υαλοβάμβακα, ώστε να απομακρυνθούν αιωρούμενα σωματίδια και λίπη.

B) Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον

Αρχικά, το pH του εκχυλίσματος ρυθμίζεται σε 5.1-5.2 με την προσθήκη 1 N οξικού οξέος και ελαφριά ανάδευση. Αποτέλεσμα είναι η αύξηση της θολερότητας λόγω καταβύθισης άλλων πρωτεϊνών. Μετά την ρύθμιση αυτή, το εκχύλισμα τοποθετείται σε πάγο για 5 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στους 0-4 °C σε 4.225 *rcf* για 30 λεπτά, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που

καταβυθίστηκαν. Έπειτα, το υπερκείμενο διηθείται σε χωνί *Buchner* με τη βοήθεια αντλίας κενού, ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα. Στη συνέχεια, ρυθμίζεται το *pH* του πρωτεϊνικού διαλύματος στην τιμή 6,8 που αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με τη χρήση κεκορεσμένου διαλύματος $KHCO_3$ και συλλέγεται το πρώτο δείγμα (ΔΕΙΓΜΑ Α) το οποίο αργότερα θα ηλεκτροφορηθεί.

Γ) Καταβύθιση του ενζύμου με θειικό αμμώνιο (κορεσμού 90%)

Ο όγκος του διαλύματος θειικού αμμωνίου που χρησιμοποιείται υπολογίζεται ως εξής:

$$0,837 \times \text{όγκος διαλύματος (6760)} = 5.658,12 \text{ mL}$$

Το *pH* του διαλύματος θειικού αμμωνίου ρυθμίζεται επίσης σε 6.8 με τη χρήση σταγόνων πυκνής αμμωνίας με τη βοήθεια πεχαμετρικού χαρτιού και έπειτα προστίθεται στο πρωτεϊνικό διάλυμα και το μείγμα φυλάσσεται σε ψυκτικό θάλαμο για 24 ώρες. Τέλος, στον ψυκτικό θάλαμο αποθηκεύονται και 20 λίτρα απιονισμένου ύδατος με σκοπό την ψύξη τους για την παρασκευή του διαλύματος διαπίδυσης κατά την ημέρα 2.

2^η Ημέρα

Αρχικά, για την προετοιμασία των μεμβρανών διαπίδυσης, κόβεται η μεμβράνη στο επιθυμητό μήκος και ζυγίζονται 6.5 γραμμάρια Na_2CO_3 και 2.44 γραμμάρια *EDTA* με σκοπό την παρασκευή 650 mL διαλύματος. Στο διάλυμα αυτό βράζουν για 30 λεπτά τα σακουλάκια διαπίδυσης και στη συνέχεια ξεπλένονται με τη χρήση απιονισμένου ύδατος. Στη συνέχεια, αφήνονται πάλι να βράσουν σε διάλυμα απιονισμένου ύδατος για άλλα 30 λεπτά και μετά, αφού ξεπλυθούν καλά, φυλάσσονται στους 4 °C σε διάλυμα αιθανόλης (20% v/v).

Μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο που πραγματοποιήθηκε την προηγούμενη ημέρα έχουν προκύψει 2 φάσεις: υπερκείμενο και ίζημα. Αφού γίνει η απομάκρυνση του υπερκείμενου μέσω αντλίας, το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0-4 °C σε 5.110 *rcf* για 40 λεπτά με χρήση της μεγάλης κεφαλής. Μετά τη φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος.

Στη συνέχεια, ετοιμάζεται ένα διάλυμα Tris 0,001 M, *pH* 7.5 συνολικού όγκου 2 λίτρων. Αρχικά, 10 mL Tris 2 M αραιώνονται σε τελικό όγκο 400 mL, μέσω απιονισμένου ύδατος. Η ρύθμιση του *pH* γίνεται με 1 N *HCL* και το διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται σε τελικό όγκο 20 λίτρων, με τη χρήση του απιονισμένου ύδατος που είχε εισαχθεί στον ψυκτικό θάλαμο.

Έπειτα, απομακρύνεται το αιθανολικό διάλυμα από τα σακουλάκια διαπίδυσης μέσω απιονισμένου ύδατος και σε αυτά εισάγεται το διαλυτοποιημένο ένζυμο. Μετά, εμβαπτίζονται στο διάλυμα Tris 0.001 M, pH 7.5 που προετοιμάστηκε και τοποθετούνται στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύχτα. Ο στόχος της διαπίδυσης είναι η αντικατάσταση του θειικού αμμωνίου σε Tris.

Πριν την διαπίδυση γίνεται και η λήψη δεύτερου δείγματος (ΔΕΙΓΜΑ Β) για την ηλεκτροφόρηση.

3^η Ημέρα

A) Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Λαμβάνεται το διάλυμα μετά τη διαπίδυση και φυγοκεντρείται στις 34.549 *rcf* για 15 λεπτά στους 0-4 °C. Το υπερκείμενο που προκύπτει ογκομετρείται και λαμβάνεται το τρίτο δείγμα (ΔΕΙΓΜΑ Γ) που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί. Στη συνέχεια προστίθενται διαλύματα 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης και EDTA σύμφωνα με τους εξής τύπους:

Όγκος 2-μερκαπτοαιθανόλης = όγκος πρωτεϊνικού διαλύματος (161 mL) X 3/27 = 17,88 mL

Όγκος EDTA = όγκος πρωτεϊνικού διαλύματος (μετά την προσθήκη β-2μερκαπτοαιθανόλης) (179 mL) X 0,005 = 0,895 mL ή 895 μL.

Στη συνέχεια, προστίθεται και διάλυμα Tris 2 M για να φτάσει το pH σε τιμή 8.8 και το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 1 ώρα με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση ανά σύντομα χρονικά διαστήματα. Η επώαση αυτή γίνεται με σκοπό την μετουσίωση άλλων πρωτεϊνών που δεν αντέχουν σε αυτήν την θερμοκρασία. Μετά, το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 λεπτά και το pH ρυθμίζεται σε τιμή 7 με τη χρήση διαλύματος οξικού οξέος 1 N. Τέλος, πραγματοποιείται διαύγαση του διαλύματος, μέσω φυγοκέντρωσης σε 32.540 *rcf* για 10 λεπτά στους 25-30 °C.

B) Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση φωσφορυλάσης β

Αρχικά ογκομετρείται το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα μετά την φυγοκέντρωση και γίνεται η λήψη του τέταρτου δείγματος (ΔΕΙΓΜΑ Δ) για ηλεκτροφόρηση. Έπειτα, προστίθενται διαλύματα AMP 0.1M, pH 7 και οξικού μαγνησίου pH 7 σύμφωνα με τον εξής τύπο:

Όγκος AMP/οξικού μαγνησίου = πρωτεϊνικός όγκος (170 mL) X 0,01 = 1,7 mL

Μετά την προσθήκη των διαλυμάτων αυτών το διάλυμα που προκύπτει εισάγεται σε μικρούς σωλήνες φυγοκέντρωσης, ισοζυγίζεται και τοποθετείται στον ψυκτικό θάλαμο για να γίνει η κρυστάλλωση.

4^η Ημέρα

Μέσω φυγοκέντρησης σε 28.710 *rcf* στους 0-4 °C για 10 λεπτά, συλλέγονται οι κρύσταλλοι και γίνεται επαναφορά της θερμοκρασίας της φυγόκεντρου στους 25-30 °C. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διαλυτοποίηση του κρυσταλλικού ιζήματος στον ελάχιστο δυνατό όγκο διαλύματος 50:50:1 με *pH* 6.8 στους 30 °C σε υδατόλουτρο και μετά γίνεται διαύγαση του διαλύματος μέσω φυγοκέντρησης σε 28.710 *rcf* στους 25-30°C για 10 λεπτά και το υπερκείμενο που προκύπτει ογκομετρείται και συλλέγεται το πέμπτο δείγμα (ΔΕΙΓΜΑ Ε) για την ηλεκτροφόρηση. Τέλος, γίνεται ξανά προσθήκη *AMP* και οξικού μαγνησίου με τους προαναφερθέντες τύπους και εισαγωγή σε ψυκτικό θάλαμο για την 1^η ανακρυστάλλωση. Μετά από 3-4 ώρες επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία για την πραγματοποίηση της δεύτερης ανακρυστάλλωσης.

5^η Ημέρα

Γίνεται άλλη μια ανακρυστάλλωση και στη συνέχεια επανάληψη της διαδικασίας ανακρυστάλλωσης απλά αυτή τη φορά δεν προστίθενται τα διαλύματα οξικού μαγνησίου και *AMP*. Στη συνέχεια, στο τελικό ενζυμικό διάλυμα γίνεται φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης με τον εξής τρόπο:

10 mL ενζυμικού διαλύματος / 2500 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 και φωτομέτρηση σε μήκη κύματος 280 *nm* και 260 *nm*. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ενζυμικού διαλύματος γίνεται μέσω της σχέσης:

$$(OD\ 280/\epsilon) \times (2510/10) = [GPb],\ mg/mL$$

Όπου: ϵ : συντελεστής μοριακής απορρόφησης = 1,32

Έτσι, βρίσκουμε την συγκέντρωση της φωσφορυλάσης, όπου στην συγκεκριμένη περίπτωση ήταν 150 mg/ml

Μετά το ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται και αφού προστεθεί ίσος όγκος γλυκερόλης, φυλάσσεται στους -20 °C.

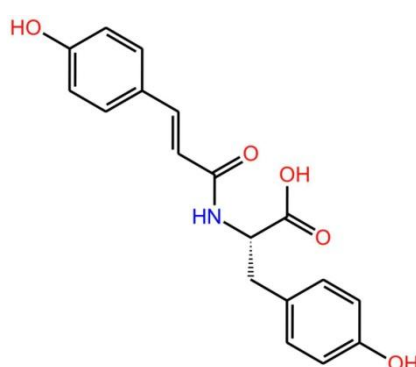
Τέλος, πραγματοποιείται και μια *SDS-PAGE* ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν στα στάδια που αναφέρθηκαν με σκοπό να δούμε το κατά πόσο αυξανόταν η καθαρότητα του ενζύμου κατά την διάρκεια και με την ολοκλήρωση της διαδικασίας (37).

2.5 Κινητικές μελέτες έναντι της GP

Στα κινητικά πειράματα που διεξάχθηκαν *in vitro*, μελετήθηκε η αντίστροφη αντίδραση που καταλύει η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από κονίκλους,

δηλαδή η ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο, που οδηγεί σε γλυκογόνο επιμηκυμένο κατά ένα κατάλοιπο γλυκόζης στον σκελετό του, καθώς και παραγωγή ορθοφωσφορικού.

Ο αναστολέας που μελετήθηκε ονομάζεται *F02* (Εικόνα 12) και έχει σχεδιαστεί για να προσδένεται στο αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, λόγω της τρισδιάστατης διαμόρφωσής του. Σκοπός της κινητικής μελέτης είναι να εξετασθεί το κατά πόσο η πιθανή αυτή πρόσδεση του αναστολέα στο συγκεκριμένο κέντρο του ενζύμου έχει επίπτωση στη δραστηριότητά του και να εξετασθεί το είδος και το μέγεθος της αναστολής αυτής.



Εικόνα 12. Χημική δομή του αναστολέα *F02*

2.5.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου

Για τον προσδιορισμό όλων των επιθυμητών κινητικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης των φωσφορικών ιόντων φασματοφωτομετρικά. Αυτή η προσέγγιση στηρίζεται στο γεγονός ότι τα φωσφορικά ιόντα σχηματίζουν σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο σε *pH* 5 με την παρουσία και ιόντων ψευδαργύρου. Το σύμπλοκο αυτό ανάγεται μέσω ασκορβικού οξέος, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός χρωμοφόρου συμπλόκου που απορροφά στα 850 *nm* (μήκος κύματος). Συνεπώς, αύξηση της απορρόφησης συνεπάγεται αυξημένη παρουσία φωσφορικών ιόντων, η οποία με τη σειρά της είναι ενδεικτική της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που οδήγησε στην αυξημένη αυτή παρουσία.

Παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

1) Διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου (15 *mM*) / οξικού ψευδαργύρου (100 *mM*) με το επιθυμητό *pH* 5 που επιτρέπει την δημιουργία συμπλόκου με τα

ορθοφωσφορικά ιόντα. Η ρύθμιση του pH διεξάχθηκε μέσω διαλύματος πυκνού *HCl* και η φύλαξη του γίνεται σε αδιαφανές μπουκάλι

2) Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v) με τιμή pH 5. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε μέσω διαλύματος πυκνού *NaOH*. Η ανανέωση του συγκεκριμένου διαλύματος είναι τακτική και η φύλαξη γίνεται σε αδιαφανές μπουκάλι.

Αφού παρασκευαστούν τα διαλύματα αυτά, αναμιγνύονται σε αναλογία 4 προς 1 και το διάλυμα που προκύπτει αφήνεται για 15 λεπτά με σκοπό την δημιουργία έγχρωμης ένωσης. Στη συνέχεια, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος αυτού σε κάθε δείγμα (0,7 mL ή 700 μ L) και μετά ακολουθεί άλλη μια επώαση 15 λεπτών στο υδατόλουτρο πριν γίνει η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων. Βέβαια, απαραίτητη είναι και η προετοιμασία ενός δείγματος αναφοράς ορθοφωσφορικών ανιόντων που θα αποτελεί πρότυπο για τον υπολογισμό της ποσότητας των ορθοφωσφορικών στα άγνωστα δείγματα (38).

2.5.2 Ενζυμικό διάλυμα

Η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης στο διάλυμα ισούται με 15 μ g/mL με συνολικό όγκο διαλύματος τα 240 μ L. Επίσης στο διάλυμα υπάρχουν:

A) Γλυκογόνο: 24 μ L γλυκογόνου 10% w/v, με αποτέλεσμα να προκύψει τελική συγκέντρωση 1% w/v στα 240 μ L.

B) Διάλυμα 50:50:1 ως ρυθμιστικό διάλυμα: 12 μ L διαλύματος με αποτέλεσμα οι τελικές συγκεντρώσεις να είναι 2.5:2.5:0.05 στα 240 μ L.

Γ) Νερό: μέχρι να συμπληρωθούν τα 240 μ L

Αφού ολοκληρωθεί η παρασκευή του διαλύματος, επάζεται για 15 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 30 °C.

Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
Γλυκογόνο 10% (w/v)	Γλυκογόνο 1% (w/v)
Διάλυμα 50:50:1	Διάλυμα 2.5:2.5:0.05
<i>rmGPb</i>	<i>rmGPb</i> 15 μ g/ml

2.5.3 Υποστρώματα – Προσδιορισμός K_m/K_a

Υπόστρωμα της αντίστροφης αντίδρασης που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι η 1-φωσφορική γλυκόζη (*G1P*).

Αρχικά, παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα *Assay Buffer* 1 που διαθέτει την εξής σύσταση:

KCl συγκέντρωσης 400 mM

Ιμιδαζόλιο συγκέντρωσης 200 mM

DTT συγκέντρωσης 4 mM

EDTA συγκέντρωσης 4 mM

Αυτό το διάλυμα χρησιμοποιείται για την παρασκευή του διαλύματος *Assay Buffer 2* με τελικές συγκεντρώσεις 270 mM (KCl) , 135 mM (ιμιδαζόλιο), 2.7 mM (DTT), 2.7 mM (EDTA). Το υπόστρωμα της αντίδρασης βρίσκεται διαλυμένο σε αυτό το διάλυμα.

Αρχικά μέσω ενός διαλύματος 1-φωσφορικής γλυκόζης, συγκέντρωσης 400 mM με pH 6.8, παρασκευάζεται ένα άλλο διάλυμα με συγκέντρωση G1P ίση με 90 mM, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την παρασκευή διαλυμάτων με επιθυμητές συγκεντρώσεις G1P.

Για τον προσδιορισμό της K_m ως προς τη συγκέντρωση της G1P, παρασκευάστηκαν ορισμένα διαλύματα (από το διάλυμα της G1P με συγκέντρωση 90 mM) και αυτά χρησιμοποιούνται, μέσω προσθήκης 40 μ L, για να προκύψουν 5 δείγματα υποστρωμάτων με διαφορετικές τελικές συγκεντρώσεις G1P σε τελικό όγκο 180 μ L (μετά την προσθήκη 36 μ L του ενζυμικού διαλύματος).

Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	[G1P] στην αντίδραση
Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 90mM	Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 45mM	Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 10mM
Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 90mM	Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 27mM	Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 6mM
Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 90mM	Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 18mM	Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 4mM
Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 90mM	Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 13.5mM	Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 3mM
Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 90mM	Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 9mM	Διάλυμα G1P συγκέντρωσης 2mM

Επίσης, κάθε δείγμα υποστρώματος περιέχει συγκέντρωση AMP ίση με 1 mM, μέσω προσθήκης 7,2 μ L από διάλυμα AMP με συγκέντρωση 25 mM. Τέλος, γίνεται προσθήκη 96,2 μ L νερού για να προκύψει τελικός όγκος ίσος με 180 μ L.

Αφού παρασκευαστούν αρχικά 144 μ L για κάθε δείγμα υποστρώματος (χωρίς την προσθήκη ενζυμικού διαλύματος) γίνεται επώαση στους 30 °C στο υδατόλουτρο, στα τελευταία 3 από τα 15 λεπτά που βρίσκεται το ενζυμικό διάλυμα στο υδατόλουτρο. Αφού περάσουν αυτά, γίνεται προσθήκη 36 μ L από το ενζυμικό

διάλυμα σε κάθε δείγμα υποστρώματος, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται ο τελικός όγκος των 180 μL , και εκείνη τη χρονική στιγμή ξεκινάει η αντίδραση. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης λαμβάνονται 40 μL του υποστρώματος και προστίθενται σε 10 μL SDS 1% (w/v) κάθε λεπτό για 4 λεπτά. Το αποτέλεσμα είναι να τερματίζεται στα χρονικά αυτά σημεία η αντίδραση λόγω του SDS. Αφού ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκρασία 4 °C και ύστερα μπορεί να πραγματοποιηθεί ο φωτομετρικός προσδιορισμός των παραγόμενων ορθοφωσφορικών ιόντων, όπως αναφέρθηκε.

Επίσης, παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα «τυφλού μάρτυρα» :

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 διαλύματος $G1P$ με συγκέντρωση 45 mM
Τυφλό φωσφορικών	10 μL SDS 1 % (w/v)+ 30 μL dH_2O + 10 μL διαλύματος Pi συγκέντρωσης 1 mM

Για τον προσδιορισμό της K_a ως προς τη συγκέντρωση της AMP ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία, με τη διαφορά ότι κάθε δείγμα υποστρώματος διαθέτει συγκέντρωση $G1P$ ίση με 10 mM μέσω προσθήκης των 40 μL από το διάλυμα $G1P$ συγκέντρωσης 45 mM και ότι ο παράγοντας που μεταβάλλεται μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων υποστρώματος είναι η συγκέντρωση της AMP . Συγκεκριμένα, μέσω χρήσης διαλύματος της AMP με συγκέντρωση 100 mM παρασκευάζονται τα κατάλληλα διαλύματα, ώστε στη συνέχεια μέσω προσθήκης 7,2 μL από κάθε ένα από αυτά να προκύπτουν 6 δείγματα υποστρώματος με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις AMP στον τελικό όγκο των 180 μL .

Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	[AMP] στην αντίδραση
Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 25 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 1000 μM
Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 5 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 200 μM
Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 2.5 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 μM
Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 1.25 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 50 μM

Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 0,75 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 30 μM
Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 0,5 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 20 μM

Έτσι, τα υποστρώματα σε αυτή τη περίπτωση έχουν διαφορετική συγκέντρωση της AMP.

Άρα συνολικά, για τον υπολογισμό της K_a ως προς την συγκέντρωση του AMP παρασκευάστηκαν τα εξής υποστρώματα:

Υποστρώματα	A	B	Γ	Δ	E	ΣΤ
G1P (45mM)	40μL	40μL	40μL	40μL	40μL	40μL
dH ₂ O	93,2μL	93,2μL	93,2μL	93,2μL	93,2μL	93,2μL
100% DMSO	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL
AMP (από stock mM)	7.2 μL (25mM)	7.2 μL (5mM)	7.2 μL (2.5mM)	7.2 μL (1.25mM)	7.2 μL (0.75mM)	7.2 μL (0.5mM)
Ντελ	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL

2.5.4 Προσδιορισμός της K_a^{app}

Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία όπως και για τον προσδιορισμό της K_a ως προς την AMP, με τη διαφορά ότι στα δείγματα των υποστρωμάτων υπάρχει και μια συγκέντρωση του αναστολέα F02, διαλυμένος σε DMSO. Πραγματοποιείται προσδιορισμών των τιμών K_a^{app} για συγκεντρώσεις αναστολέα: 20, 40, 50, 70 μM. Παρασκευάστηκαν τα εξής υποστρώματα για κάθε συγκέντρωση του αναστολέα:

Υποστρώματα	A	B	Γ	Δ	Ε	ΣΤ
G1P (45mM)	40μL	40μL	40μL	40μL	40μL	40μL
dH2O	93,2μL	93,2μL	93,2μL	93,2μL	93,2μL	93,2μL
Αναστολέας (DMSO)	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL	3,6 μL
AMP (από stock mM)	7.2 μL (25mM)	7.2 μL (5mM)	7.2 μL (2.5mM)	7.2 μL (1.25mM)	7.2 μL (0.75mM)	7.2 μL (0.5mM)
Ντελ	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL	144 μL

2.5.5 Προσδιορισμός της K_i

Έγινε μέσω του προσδιορισμού της K_a^{app} για 4 συγκεντρώσεις αναστολέα: 20,40,50,70 μM και αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της K_i .

2.5.6 Ανάλυση των κινητικών δεδομένων

Η επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος *GraFit* (39). Για τον προσδιορισμό των επιθυμητών κινητικών παραμέτρων πρέπει πρώτα να υπολογιστεί και η ειδική δραστικότητα του ενζύμου για την κάθε συγκέντρωση G1P (για K_m ως προς G1P) ή AMP (για K_a ως προς AMP και για K_a^{app} παρουσία αναστολέα). Ως ειδική δραστικότητα ορίζονται τα μmol υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα του χρόνου για κάθε mg της πρωτεΐνης. Αρχικά, μέσω του τυφλού φωσφορικών ιόντων (συγκέντρωσης 0.25 mM) υπολογίζονται τα μmol φωσφορικών ιόντων που προέκυψαν από την αντίδραση. Καθώς ο όγκος του τυφλού ισούται με 40 μL , τα μmol των φωσφορικών ιόντων ισούνται με 0.01. Έτσι, με βάση τον προσδιορισμό της απορρόφησης του διαλύματος αυτού, γνωρίζουμε ποια τιμή απορρόφησης αντιστοιχεί σε 1 μmol φωσφορικών ιόντων και έτσι βάση των απορροφήσεων των δειγμάτων μπορούμε να προσδιορίσουμε τα μmol των φωσφορικών ιόντων σε αυτά, αφού πρώτα γίνει αφαίρεση των τιμών απορρόφησης από τα τυφλά της G1P και του ενζυμικού διαλύματος. Στη συνέχεια, γίνεται προσδιορισμός της ειδικής δραστικότητας μέσω μη γραμμικής εξίσωσης που λαμβάνει υπόψη το ανώτατο όριο υδρόλυσης και έναν συντελεστή f .

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

όπου:

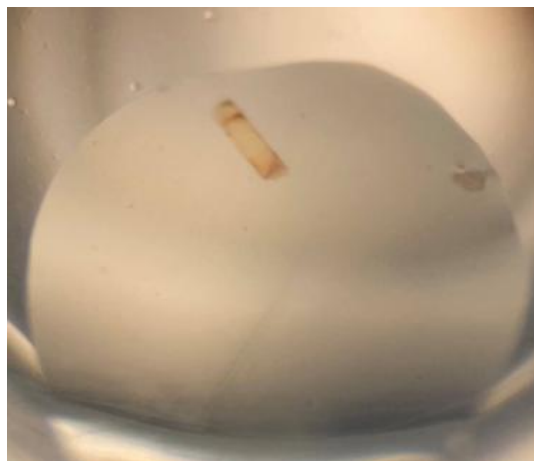
$limit = 0.78 [G1P]$ assay volume. Το 0.78 αντιστοιχεί στο ποσοστό της *G1P* που καταναλώθηκε για την παραγωγή φωσφορικών όταν η αντίδραση φτάσει σε ισορροπία, ενώ ο *assay volume* είναι ο όγκος που λήφθηκε για να τερματιστεί η αντίδραση (40 μ L). Επίσης ως *C* ορίζεται η συγκέντρωση του ενζύμου στον όγκο της αντίδρασης.

Οι κινητικές σταθερές K_m και K_m^{app} υπολογίστηκαν μέσω της εξίσωσης Michaelis-Menten, αλλά και μέσω διαγράμματος διπλού αντιστρόφου. Για τον προσδιορισμό της K_i χρησιμοποιήθηκε ένα διάγραμμα με τις τιμές K_m^{app} (γ' γ άξονας) προς τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του αναστολέα (x' χ άξονας). Μέσω γραμμικής εξίσωσης, μπορεί να υπολογιστεί η τιμή της K_i , καθώς το σημείο τομής της ευθείας με τον x' χ άξονα αντιστοιχεί στην $-K_i$.

2.6 Κρυσταλλογραφικές μελέτες

2.6.1 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

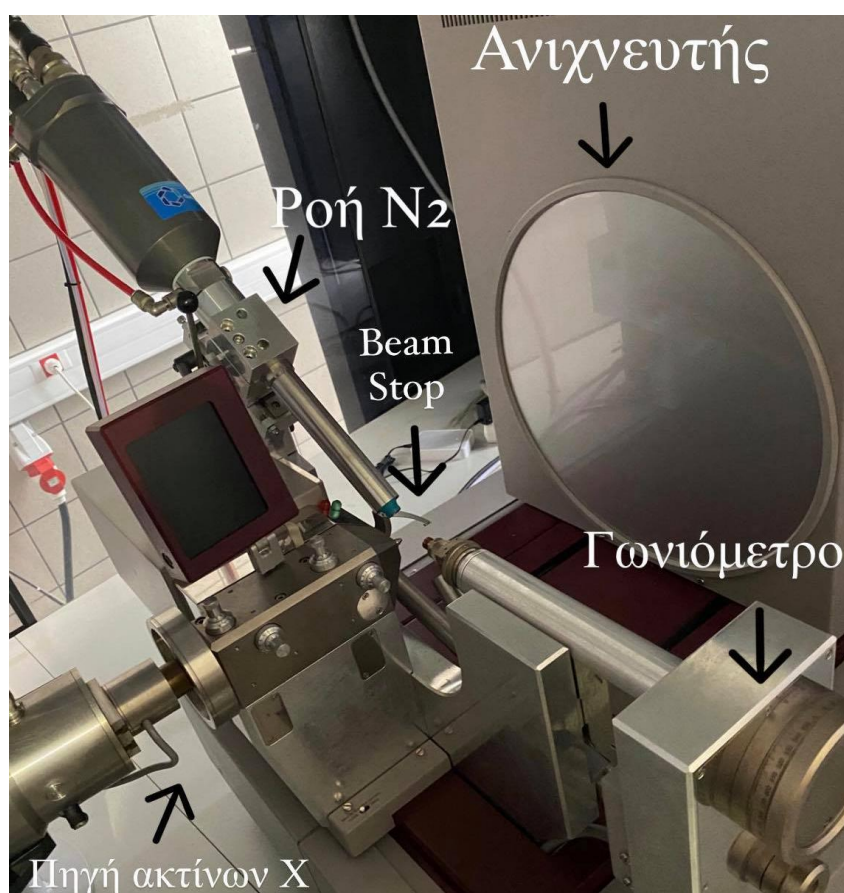
Αφού παρήχθησαν κρύσταλλοι για την *rmGPb* πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση τους με διάλυμα που περιείχε 10 mM *BES*, pH 6.7, 30% v/v *DMSO*, καθώς και τον αναστολέα σε συγκέντρωση 15 mM. Ο χρόνος εμβάπτισης ήταν 8 μέρες και η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 16 °C (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Κρύσταλλος της *rmGPb* ύστερα από την εμβάπτιση.

Στη συνέχεια, ακολουθεί κρυσταλλογραφία ακτίνων X για τον προσδιορισμό του τρόπου πρόσδεσης του υπό μελέτη αναστολέα σε κάποιο από τα κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου. Αρχικά, ένας κρύσταλλος τοποθετείται σε βρόχο και έπειτα σε γωνιόμετρο και το σύστημα εισάγεται στην κατάλληλη υποδοχή του μηχανήματος. Αφού ευθυγραμμιστεί ο κρύσταλλος μέσω των ρυθμίσεων του γωνιόμετρου, η πηγή εκπέμπει τις ακτίνες X και πραγματοποιείται η αλληλεπίδρασή του κρυστάλλου με αυτές. Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας μετράται με τη βοήθεια

ανιχνευτών και έτσι προκύπτει το διάγραμμα περίθλασης. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε στους 100 K με χρήση κρυοπροστατευτικού διαλύματος. Ο κρύσταλλος σε όλη την διάρκεια της διαδικασίας διατηρείται σε θερμοκρασία 100 K, μέσω ενός ρεύματος ψυχρού αέριου αζώτου. Οι πληροφορίες από το διάγραμμα περίθλασης χρησιμοποιούνται και επεξεργάζονται από κατάλληλα λογισμικά και έτσι προκύπτει ο χάρτης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Μέσω ειδικού λογισμικού καταχωρούνται όλα τα χαρακτηριστικά της πειραματικής διαδικασίας, δηλαδή το μήκος κύματος της ακτινοβολίας (λ), η απόσταση μεταξύ κρυστάλλου και ανιχνευτή (d), ο χρόνος έκθεσης (t), η γωνία περιστροφής και ο αριθμός των εικόνων (40).



Εικόνα 14. Διάταξη ενός κρυσταλλογραφικού πειράματος.

2.6.2 Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου

Χρησιμοποιήθηκε η δομή της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου σε κατάσταση T (*PDB id 7P7D*) και με τη βοήθεια του προγράμματος *REFMAC* (41,42) [της συλλογής προγραμμάτων *CCP4* (43)] έγινε ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου ενζύμου/αναστολέα. Η διαδικασία περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό κύκλων βελτιστοποίησης του μοντέλου, μέσω του προγράμματος *COOT* (44,45) και βελτιστοποίησης μέσω του *REFMAC* (41,42). Πραγματοποιείται προσθήκη μορίων

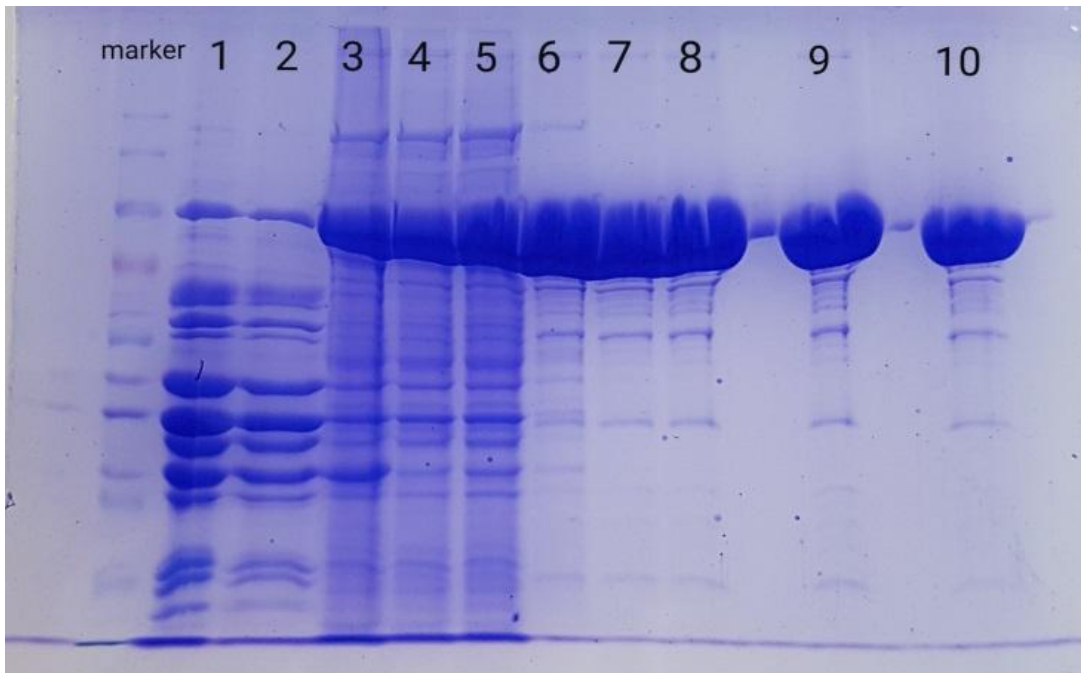
ύδατος που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος και εντοπίζονται στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Επίσης, μέσω του προγράμματος *Ligand builder* του προγράμματος *COOT*, γίνεται παραγωγή του τρισδιάστατου μοντέλου του αναστολέα, το οποίο συμπεριλαμβάνεται στα τελικά στάδια της βελτιστοποίησης. Τέλος, η βελτιστοποίηση ιστροπικών παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων συμβάλει στην βελτιστοποίηση του μοντέλου.

Μέσω υπολογισμού των διαφορικών χαρτών $F_{obs}-F_{calc}$ και $2F_{obs}-F_{calc}$, γίνεται ο προσδιορισμός της θέσης πρόσδεσης του αναστολέα στο σημείο που παρατηρείται επιπλέον ηλεκτρονιακή πυκνότητα (στο αλλοστερικό κέντρο πρόσδεσης). Στην συνέχεια, το μοντέλο που περιλαμβάνει και τον αναστολέα υφίσταται επιπρόσθετη προσαρμογή και βελτιστοποίηση, σύμφωνα με την στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την δομή της πρωτεΐνης μέσω της συλλογής προγραμμάτων *CCP4*. Η δομή που προκύπτει χρησιμοποιείται για την εύρεση των αλληλεπιδράσεων (*Van der Waals*, δεσμοί υδρογόνου) που σχηματίζονται μεταξύ του αναστολέα και των αμινοξέων του ενζύμου που εντοπίζονται στη θέση δέσμευσης του αναστολέα. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω του προγράμματος *CONTACT* του *CCP4* με όρια απόστασης 3.35 Å και 4 Å για τους δεσμούς υδρογόνου και τις αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* αντίστοιχα. Τέλος, για να απεικονιστούν τα τρισδιάστατα μακρομοριακά μόρια, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα γραφικών *CCP4 Molecular Graphics (mg)* (46).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Απομόνωση και καθαρισμός της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κονίκλους

Στην Εικόνα 15 φαίνεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου (10 % πυκνότητα) υπό αποδιατακτικές συνθήκες, στην οποία αναλύθηκαν ως προς την ποσότητα και την καθαρότητα, δείγματα από τα διάφορα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης του ενζύμου.



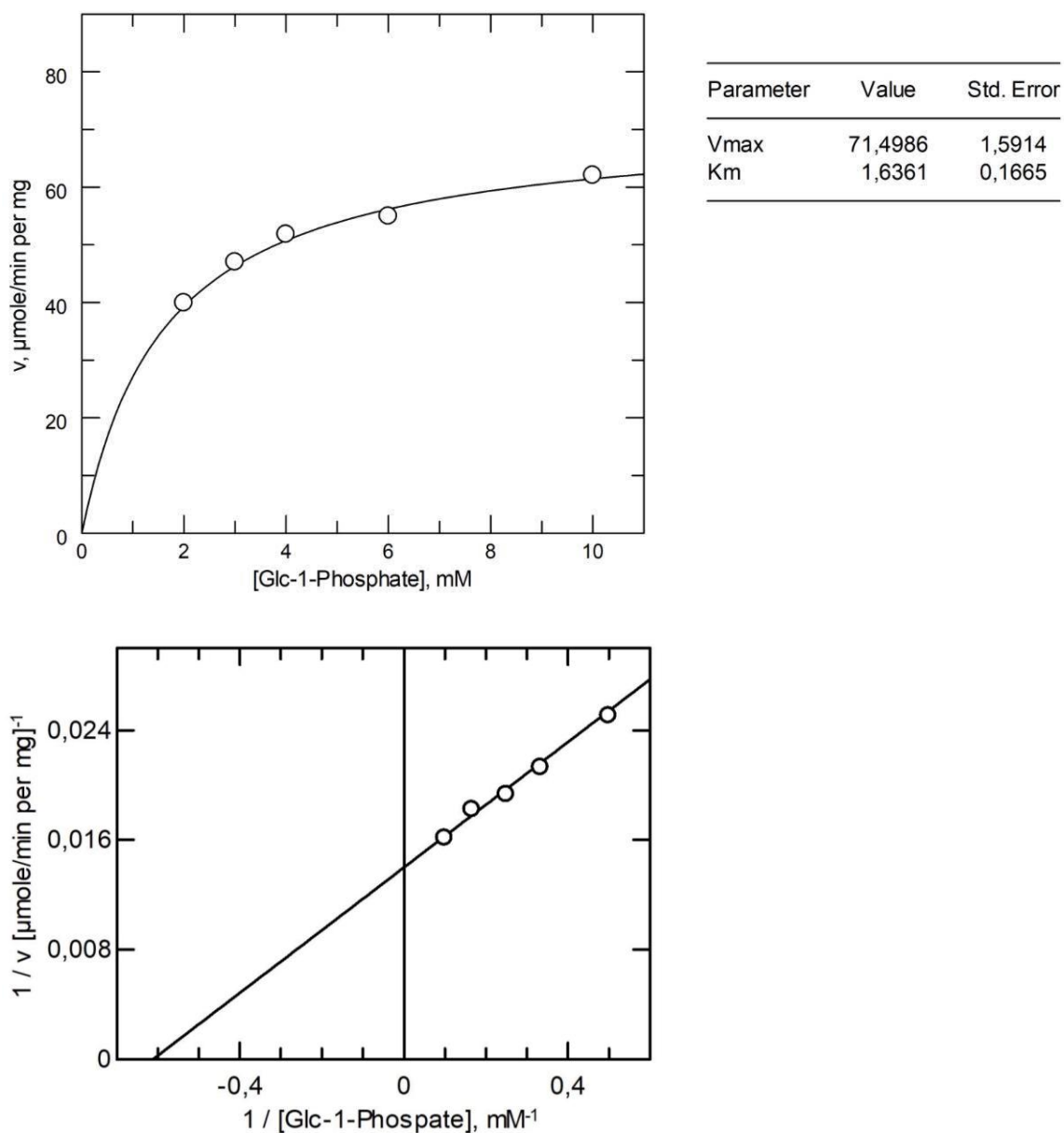
Εικόνα 15. Απεικόνιση της πηκτής πολυακρυλαμιδίου που προέκυψε μετά την μέθοδο καθαρισμού του ενζύμου. Η διαδρομή 1 αντιστοιχεί σε δείγμα πριν την προσθήκη θειικού αμμωνίου, μετά την καταβύθιση σε όξινο περιβάλλον, πριν τη ρύθμιση του pH, η διαδρομή 2 σε δείγμα μετά την προσθήκη θειικού αμμωνίου, η διαδρομή 3 σε δείγμα μετά τη διαπίδυση σε 1 mM Tris-HCl pH 7.5, η διαδρομή 4 σε δείγμα μετά τη διαύγαση, η διαδρομή 5 σε δείγμα μετά την κρυστάλλωση, η διαδρομή 6 σε δείγμα μετά την 1^η ανακρυστάλλωση, η διαδρομή 7 σε δείγμα μετά την 2^η ανακρυστάλλωση, η διαδρομή 8 σε δείγμα μετά την 3^η ανακρυστάλλωση, η διαδρομή 9 σε δείγμα μετά την 4^η ανακρυστάλλωση, η διαδρομή 10 σε δείγμα μετά την 5^η ανακρυστάλλωση.

Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν πως όσο προχωράει η διαδικασία απομόνωσης του ενζύμου, τόσο αυξάνεται και η καθαρότητα του. Η καθαρότητα του ενζύμου μετά από την 5^η ανακρυστάλλωση είναι αρκετά υψηλή ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η κρυστάλλωση του ενζύμου. Η τελική απόδοση της μεθόδου ήταν **0,417 g ανά kg** σκελετικών μυών κονίκλων.

3.2 Κινητικές μελέτες

3.2.1 Προσδιορισμός της K_m της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς την συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης (G1P)

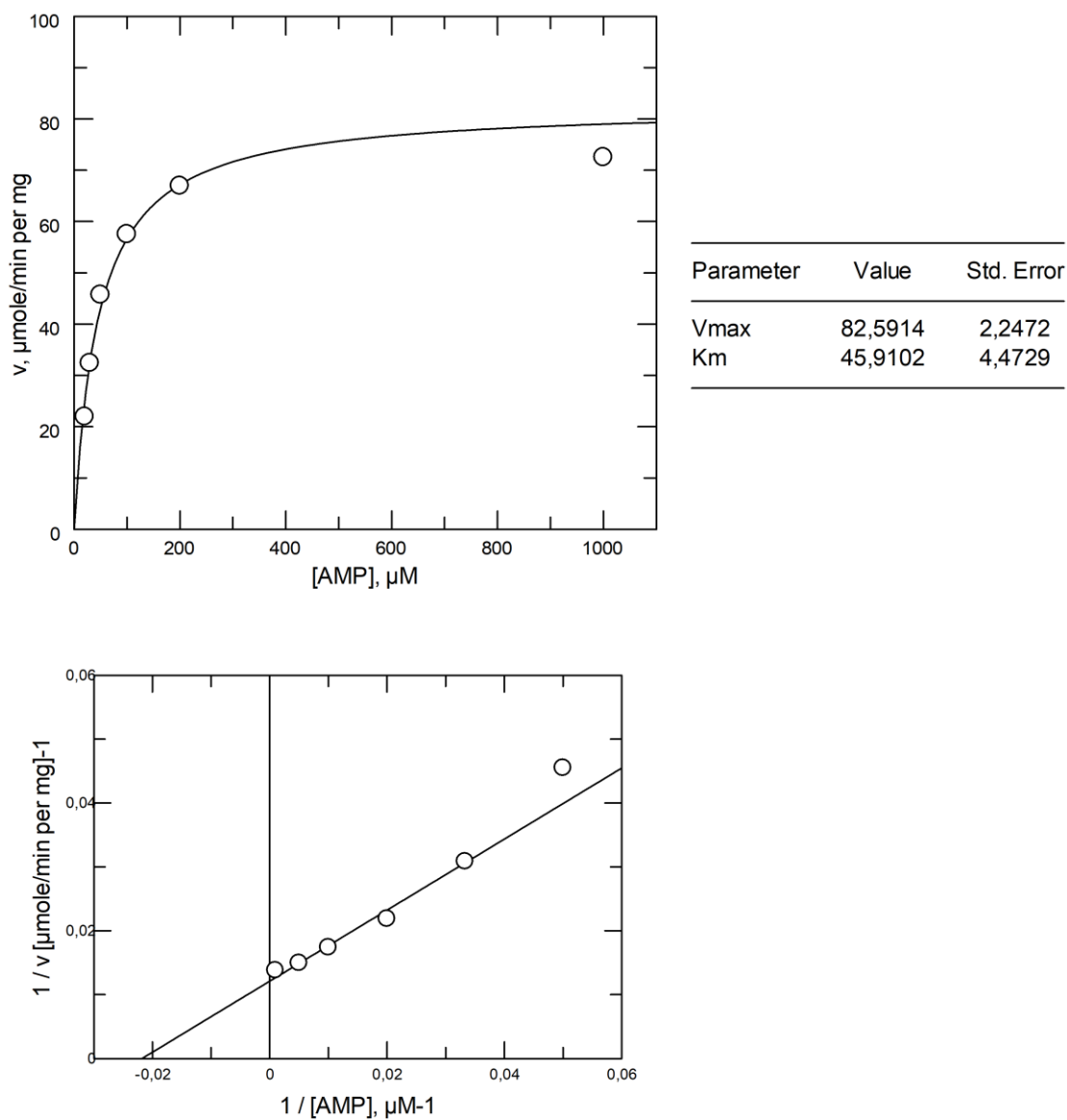
Η K_m της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς την συγκέντρωση της G1P βρέθηκε πως είναι $1,63 \pm 0,16$ mM, μέσω διαγραμμάτων *Michaelis-Menten* και *Lineweaver-Burk* (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Παρουσιάζονται τα διαγράμματα *Michaelis-Menten* και *Lineweaver-Burk*, μέσω των οποίων προσδιορίζεται η K_m της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς την συγκέντρωση της G1P

3.2.2 Προσδιορισμός της K_m της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς την συγκέντρωση της AMP

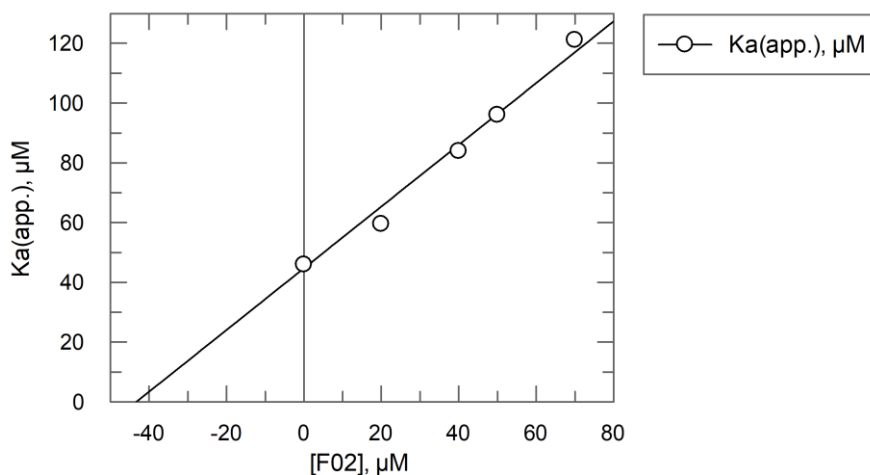
Η K_m της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς την συγκέντρωση της AMP βρέθηκε πως είναι $45,91 \mu\text{M} \pm 4,47 \mu\text{M}$, μέσω διαγραμμάτων *Michaelis-Menten* και *Lineweaver-Burk* (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Παρουσιάζονται τα διαγράμματα *Michaelis-Menten* και *Lineweaver-Burk*, μέσω των οποίων προσδιορίζεται η K_m της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς την συγκέντρωση της AMP

3.2.3 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα

Η K_i του αναστολέα $F02$ βρέθηκε πως είναι $43,3 \mu\text{M} \pm 3,46$



Εικόνα 18. Διάγραμμα για υπολογισμό της K_i . Η K_i αντιστοιχεί στο σημείο που τέμνει τον άξονα x'

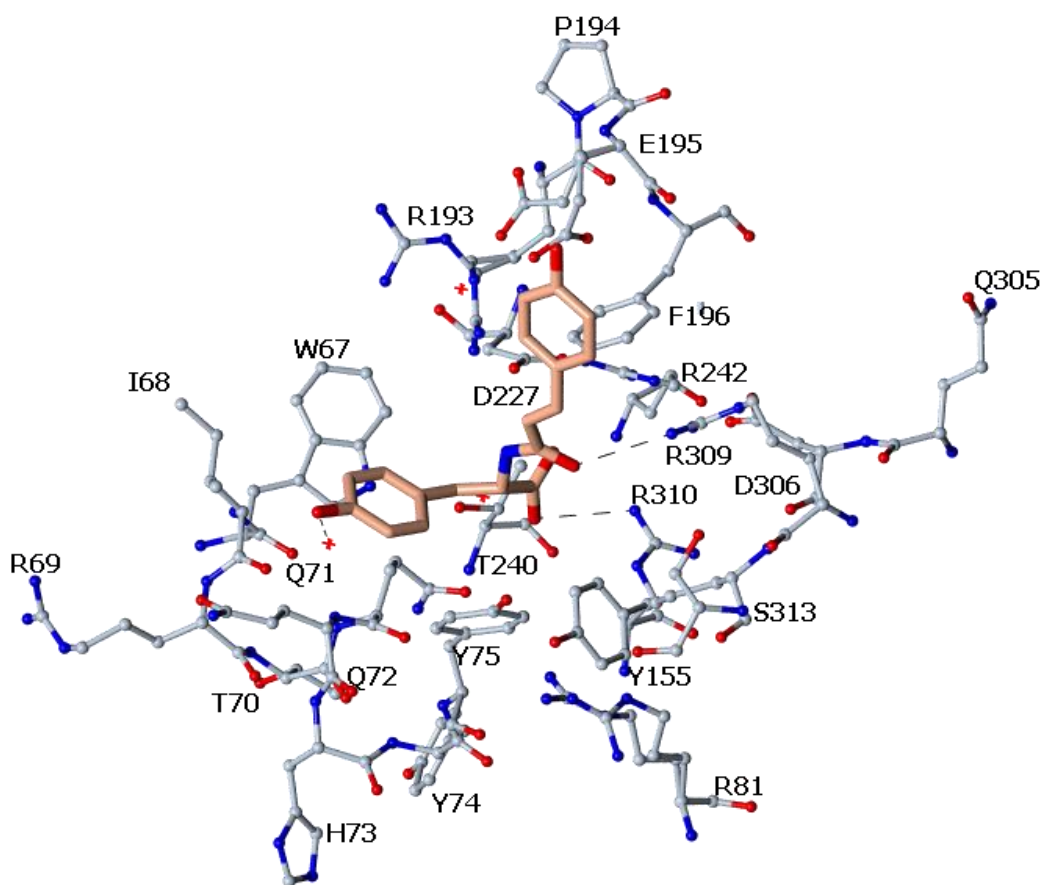
3.3 Δομικά αποτελέσματα

Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζεται το σύνολο των αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου, *Van der Waals*) που σχηματίζει ο αναστολέας με αμινοξέα αλλά και με μόρια νερού και *DMSO*, που βρίσκονται στο αλλοστερικό κέντρο. Συγκεκριμένα ο αναστολέας σχηματίζει 34 δεσμούς *Van der Waals*. Επίσης, ο αναστολέας σχηματίζει 2 δεσμούς υδρογόνου με 2 κατάλοιπα αργινίνης (*Arg309*, *Arg310*), καθώς και έναν δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο ύδατος (*Water389*) (Εικόνα 19).

<i>Inhibitor atom</i>	<i>Protein residues</i>	
	<i>Hydrogen bonds(-3.35A)</i>	<i>Van der Waals bonds(-4A)</i>
O_1	-	<i>Water1: 3.87</i>
O_2	<i>Arg309 (NH1): 3.28</i>	<i>Phe196 (CZ) : 3.73</i>
O_3	<i>Water389: 2.12</i>	<i>Gln72 (CB,CG): 3.52,3.76</i> <i>Water389: 2.12</i>
O_4	-	<i>Arg310 (NH2): 3.53</i> <i>Phe196 (CE2): 3.87</i>
O_5	<i>Arg310 (NH2): 3.32</i>	<i>Gln71 (OE1): 3.79</i> <i>Arg310 (NE,CZ): 3.57,3.89</i> <i>Water4: 3.42</i>
C_3	-	<i>Glu195 (OE1): 3.56</i>
C_4	-	<i>Glu195 (OE1): 3.68</i> <i>Phe196 (CZ): 3.86</i>

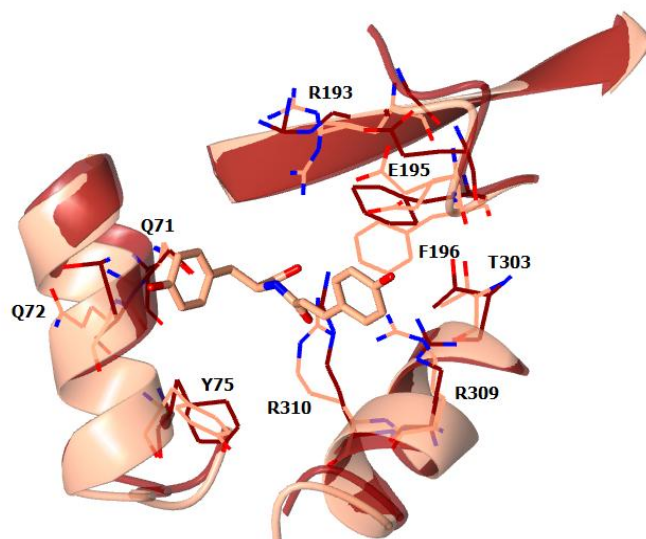
C₅	-	<i>Phe196 (CE1,CZ): 3.87,3.69</i>
C₆	-	-
C₇	-	<i>Phe196 (CE1,CZ): 3.92,3.51</i>
C₈	-	<i>Phe196 (CZ): 3.49</i>
C₉	-	<i>Phe196 (CZ): 3.55</i>
C₁₀	-	-
C₁₁	-	<i>Arg310 (NH2): 3.74</i>
C₁₂	-	<i>Gln71 (CB): 3.74 DMS13: 3.84</i>
C₁₃	-	<i>Gln71 (CB): 3.81 DMS13: 3.89</i>
C₁₄	-	<i>DMS13: 3.13</i>
C₁₅	-	<i>DMS13: 3.96</i>
C₁₆	-	<i>Gln72 (CA): 3.96 Gln72 (CB): 3.90 Water389: 3.01</i>
C₁₇	-	<i>Gln72 (CA,N): 3.74,3.97 Water389: 3.20</i>
C₁₈	-	<i>Gln71 (O): 3.84</i>
	<i>Total: 3</i>	<i>Total: 34</i>

Πίνακας 3.1. Συγκεντρωτικός πίνακας αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται κατά την πρόσδεση του αναστολέα στο ένζυμο

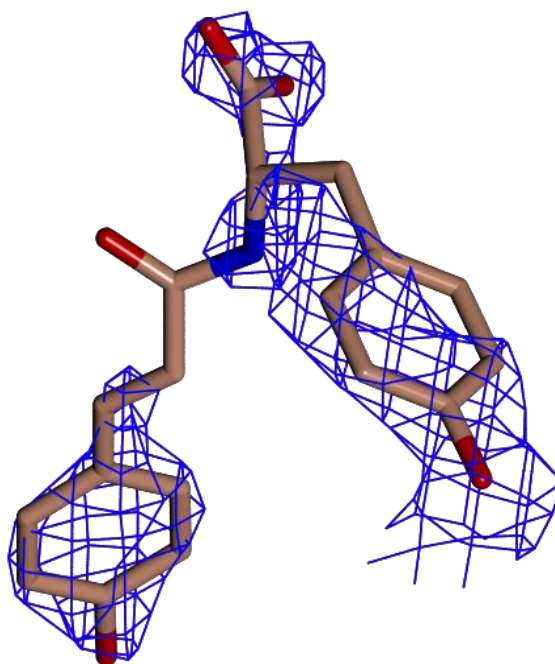


Εικόνα 19. Απεικόνιση της πρόσδεσης του αναστολέα στο αλλοστερικό κέντρο πρόσδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Οι διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ του αναστολέα με 2 κατάλοιπα αργινίνης (*Arg309, Arg310*), καθώς και με ένα μόριο ύδατος (*Water389*).

Επιπλέον, εκτιμήθηκε το κατά πόσο η πρόσδεση του αναστολέα οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης των αμινοξέων που είναι γειτονικά της θέσης πρόσδεσης του αναστολέα. Η αλλαγή διαμόρφωσης της περιοχής αυτής (με έμφαση στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων *Q71, Q72, Y75, R193, E195, F196, R309, R310*) παρουσιάζονται στην Εικόνα 20. Τέλος, στην εικόνα 21 παρουσιάζεται η ηλεκτρονική πυκνότητα που αντιστοιχεί στον αναστολέα, όπως προέκυψε στα αποτελέσματα της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. Η εικόνα λήφθηκε αφού έγινε και η βελτιστοποίηση του χάρτη.



Εικόνα 20. Το σκούρο κόκκινο αντιστοιχεί στη φυσιολογική δομή, απουσία αναστολέα, της περιοχής αυτής, ενώ το ανοιχτό ροζ αντιστοιχεί στην δομή των καταλοίπων αυτών μετά την πρόσδεση του αναστολέα. Έμφαση δίνεται στην αλλαγή διαμόρφωσης των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων Q71, Q72, Y75, R193 E195, F196, R309, R310.



Εικόνα 21. Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας $2F_{obs}-F_{calc}$ για τον αναστολέα σε 1σ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί έναν επικυρωμένο στόχο για την θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη. Έχει ήδη δοκιμαστεί ένας μεγάλος αριθμός μορίων/αναστολέων του ενζύμου αυτού και έχει αποδειχθεί πως η αναστολή του έχει άντι-υπεργλυκαιμικά αποτελέσματα. Έτσι, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης τέτοιων αναστολέων ως φαρμακευτικά σκευάσματα για την θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη. Η έρευνα για την εύρεση τέτοιων αναστολέων έχει επικεντρωθεί σε αναστολείς που είναι παράγωγα της γλυκόζης, τα οποία συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο πρόσδεσης του ενζύμου. Ωστόσο, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελείται από 6 κέντρα πρόσδεσης, το καταλυτικό, το αλλοστερικό, το νέο αλλοστερικό, το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης, το κέντρο αναστολής και το κέντρο πρόσδεσης του γλυκογόνου. Συνεπώς, έχουν δοκιμαστεί και άλλα μόρια που προσδέονται σε κάποιο άλλο κέντρο πρόσδεσης του ενζύμου πέρα από το καταλυτικό. Για παράδειγμα, όσον αφορά το αλλοστερικό κέντρο πρόσδεσης, έχει βρεθεί ότι το μόριο W1807 έχει ανασταλτική δράση σε επίπεδα nM ($K_i = 1.6 \text{ nM}$). Ο αναστολέας αυτός προσδέεται στο ένζυμο σχηματίζοντας συνολικά 9 δεσμούς υδρογόνου και 67 δεσμούς Van der Waals με αμινοξέα του ενζύμου και μόρια ύδατος (27). Η αναστολή του ενζύμου οδηγεί σε μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης του γλυκογόνου, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα να μειώνονται.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκε η ανασταλτική επίδραση ενός μορίου που βάση της δομής του προβλέπεται να προσδέεται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Διεξάχθηκαν κινητικές μελέτες για να προσδιοριστεί το είδος και το μέγεθος της αναστολής. Οι μελέτες αυτές έγιναν έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κονίκλους, η οποία διαθέτει μεγάλα ποσοστά ομοιότητας με την ανθρώπινη φωσφορυλάση. Η σταθερά αναστολής K_i του αναστολέα που μελετήθηκε βρέθηκε πως είναι $43,3 \mu\text{M} \pm 3,46$. Συνεπώς, μέσω των μελετών αυτών αποδείχθηκε η ανασταλτική επίδραση του αναστολέα που μελετήθηκε και βρέθηκε ότι οδηγεί σε αναστολή του ενζύμου σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Επιπλέον, διεξάχθηκαν και δομικές μελέτες σε σύμπλοκο του αναστολέα με την μυϊκή φωσφορυλάση από κονίκλους. Μέσω αυτών, επιβεβαιώθηκε η πρόσδεση του αναστολέα στο αλλοστερικό κέντρο πρόσδεσης του ενζύμου και ταυτοποιήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις (δεσμοί υδρογόνου, *Van der Waals*) που αυτός σχηματίζει. Συγκεκριμένα ο αναστολέας σχηματίζει 2 δεσμούς υδρογόνου με 2 κατάλοιπα αργινίνης του ενζύμου (*Arg309*, *Arg310*) και 1 δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο ύδατος (Εικόνα 19). Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι ο αναστολέας σχηματίζει συνολικά 34 δεσμούς *Van der Waals* είτε με αμινοξέα που βρίσκονται γειτονικά της θέσης πρόσδεσης ή με μόρια ύδατος ή με ένα μόριο *DMSO* (Πίνακας 3.1). Η πρόσδεση του αναστολέα οδηγεί σε αναστολή του ενζύμου, καθώς εμποδίζεται η δέσμευση του

φυσιολογικού ενεργοποιητή του ενζύμου, της *AMP* στο αλλοστερικό κέντρο πρόσδεσης του ενζύμου. Επίσης, η πρόσδεση αυτή πιθανώς οδηγεί σε αναστολή της πρόσδεσης του υποστρώματος 1-φωσφορική γλυκόζη αλλοστερικά, γεγονός που συμβάλλει στην αναστολή.

Αποτέλεσμα των κινητικών και δομικών μελετών που διεξάχθηκαν είναι ότι το μόριο που εξετάστηκε συνδέεται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου και οδηγεί στην αναστολή του. Συνεπώς, ο αναστολέας αυτός έχει προοπτικές να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός αντι-υπεργλυκαιμικός παράγοντας για την θεραπεία ατόμων που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Association AD. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2005 Jan 1;28(suppl 1):s37–42. https://care.diabetesjournals.org/content/28/suppl_1/s37
- 2) Kahanovitz L, Sluss PM, Russell SJ. Type 1 Diabetes – A Clinical Perspective. *Point Care*. 2017 Mar;16(1):37–40. doi: [10.1097/POC.000000000000125](https://doi.org/10.1097/POC.000000000000125)
- 3) Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet*. 2017 Jun 3;389(10085):2239–51. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2)
- 4) Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006
- 5) Patel S, Dutta S. Diabetes mellitus. RCSB PDB-101. August 2018 doi: [10.2210/rcsb_pdb/GH/DM/drugs/Insulin/Insulin](https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/GH/DM/drugs/Insulin/Insulin)
- 6) Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol*. 2018 Jul 2;217(7):2273–89. doi: [10.1083/jcb.201802095](https://doi.org/10.1083/jcb.201802095)
- 7) Cheng, Z., Tseng, Y., White, M.F., 2010. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 21, 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.005>
- 8) Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 1994 Feb 1 <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpcell.1994.266.2.C319>
- 9) Backer JM, Myers MG, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J*. 1992 Sep;11(9):3469–79.
- 10) Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol*. 2009 Mar;156(6):885–98. doi: [10.1111/j.1476-5381.2008.00085.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00085.x)
- 11) Bae SS, Cho H, Mu J, Birnbaum MJ. Isoform-specific Regulation of Insulin-dependent Glucose Uptake by Akt/Protein Kinase B *. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Dec 5;278(49):49530–6. DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M306782200>
- 12) Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA, et al. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell Metab*. 2008 Jul;8(1):65–76. doi: [10.1016/j.cmet.2008.06.006](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.006)
- 13) Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J*. 2012 Feb 1;441(3):763–87. doi: [10.1042/BJ20111416](https://doi.org/10.1042/BJ20111416)

- 14) Engelking LR. Chapter 23 - Glycogen. In: Engelking LR, editor. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition) [Internet]. Boston: Academic Press; 2015 [cited 2021 Aug 2]. p. 147–52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391909-0.50023-2>
- 15) Adeva-Andany MM, González-Lucán M, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C, Ameneiros-Rodríguez E. Glycogen metabolism in humans. BBA Clinical. 2016 Jun 1;5:85–100. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.02.001>
- 16) Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.
- 17) Baskaran S. Structure and Regulation of Yeast Glycogen Synthase. 2010 Jan 1;
- 18) 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 DOI: [10.1023/a:1020978825802](https://doi.org/10.1023/a:1020978825802)
- 19) Lukacs CM, Oikonomakos NG, Crowther RL, Hong L-N, Kammlott RU, Levin W, et al. The crystal structure of human muscle glycogen phosphorylase a with bound glucose and AMP: An intermediate conformation with T-state and R-state features. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2006;63(4):1123–6. <https://doi.org/10.1002/prot.20939>
- 20) Agius L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. Molecular aspects of medicine. 2015 Nov 2;46. DOI: [10.1016/j.mam.2015.09.002](https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.09.002)
- 21) Fletterick RJ, Sprang SR. Glycogen phosphorylase structures and function. Acc Chem Res. 1982 Nov 1;15(11):361–9. <https://doi.org/10.1021/ar00083a004>
- 22) Hayes JM, Kantsadi AL, Leonidas DD. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. Phytochem Rev. 2014 Jun 1;13(2):471–98.
- 23) Kun S, Begum J, Kyriakis E, Stamati ECV, Barkas TA, Szennyes E, et al. A multidisciplinary study of 3-(β -d-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazole derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors: Computation, synthesis, crystallography and kinetics reveal new potent inhibitors. Eur J Med Chem. 2018 Mar 10;147:266–78. DOI: [10.1016/j.ejmech.2018.01.095](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.095)
- 24) Martin JL, Veluraja K, Ross K, Johnson LN, Fleet GW, Ramsden NG, et al. Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: the design of potential drugs for diabetes. Biochemistry. 1991 Oct 22;30(42):10101–16. DOI: [10.1021/bi00106a006](https://doi.org/10.1021/bi00106a006)
- 25) Watson KA, Mitchell EP, Johnson LN, Cruciani G, Son JC, Bichard CJ, et al. Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: from crystallographic analysis to drug prediction using GRID force-field and GOLPE variable selection. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 1995 Jul 1;51(Pt 4):458–72. DOI: [10.1107/S090744499401348X](https://doi.org/10.1107/S090744499401348X)
- 26) Somsák L, Czifrák K, Tóth M, Bokor E, Chrysina ED, Alexacou K-M, et al. New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. Curr MedChem. 2008;15(28):2933–83. DOI: [10.2174/092986708786848659](https://doi.org/10.2174/092986708786848659)

- 27) Oikonomakos NG, Tsitsanou KE, Zographos SE, Skamnaki VT, Goldmann S, Bischoff H. Allosteric inhibition of glycogen phosphorylase a by the potential antidiabetic drug 3-isopropyl-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate. *Protein Sci.* 1999 Oct;8(10):1930–45. doi: 10.1110/ps.8.10.1930.
- 28) Blundell TL, Jhoti H, Abell C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Jan;1(1):45–54. DOI: [10.1038/nrd706](https://doi.org/10.1038/nrd706)
- 29) Shi Y. A glimpse of structural biology through X-ray crystallography. *Cell.* 2014 Nov 20;159(5):995–1014. DOI: [10.1016/j.cell.2014.10.051](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.051)
- 30) McPherson A, Gavira JA. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2014 Jan;70(Pt 1):2–20. doi: 10.1107/S2053230X13033141.
- 31) Russo Krauss I, Merlino A, Vergara A, Sica F. An overview of biological macromolecule crystallization. *Int J Mol Sci.* 2013 May 31;14(6):11643–91. DOI: [10.3390/ijms140611643](https://doi.org/10.3390/ijms140611643)
- 32) Braden C, Tooze J. Introduction to protein structure. 19 Union Square West. New York. Garland Publishing, Inc. 1999
- 33) Zhang Y. Combining Empirical and Experimental Data in Protein Structure Determination [master thesis]. University of Massachusetts Amherst. 2009
- 34) Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. Principles of physical biochemistry. 2nd ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall; 2006.
- 35) Lineweaver H, Burk D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J Am Chem Soc.* 1934 Mar 1;56(3):658–66. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>
- 36) Gel electrophoresis of proteins. Adapted from Chapter 7, Gel Electrophoresis of Proteins, by David E. Garfin, pages 197-268, in *Essential Cell Biology, Volume 1: Cell structure, A Practical Approach*, Edited by John Davey and Mike Lord, Oxford University Press, Oxford UK (2003).
- 37) *Methods in Enzymology Vol V.* p. 369-373, 1962
- 38) Saheki S, Takeda A, Shimazu T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal Biochem.* 1985 Aug 1;148(2):277–81. doi: 10.1016/0003-2697(85)90229-5.
- 39) Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998
- 40) Rhodes G. Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2006
- 41) Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011 Apr;67(Pt 4):355–67. doi: 10.1107/S0907444911001314.

- 42) Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1997 May 1;53(Pt 3):240–55. doi: [10.1107/S0907444996012255](https://doi.org/10.1107/S0907444996012255).
- 43) Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1994 Sep 1;50(Pt 5):760–3. doi: [10.1107/S0907444994003112](https://doi.org/10.1107/S0907444994003112).
- 44) Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004 Dec;60(Pt 12 Pt 1):2126–32. doi: [10.1107/S0907444904019158](https://doi.org/10.1107/S0907444904019158)
- 45) Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 Apr;66(Pt 4):486–501. doi: [10.1107/S0907444910007493](https://doi.org/10.1107/S0907444910007493)
- 46) McNicholas S, Potterton E, Wilson KS, Noble MEM. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011 Apr;67(Pt4):386–94. DOI: [10.1107/S0907444911007281](https://doi.org/10.1107/S0907444911007281)