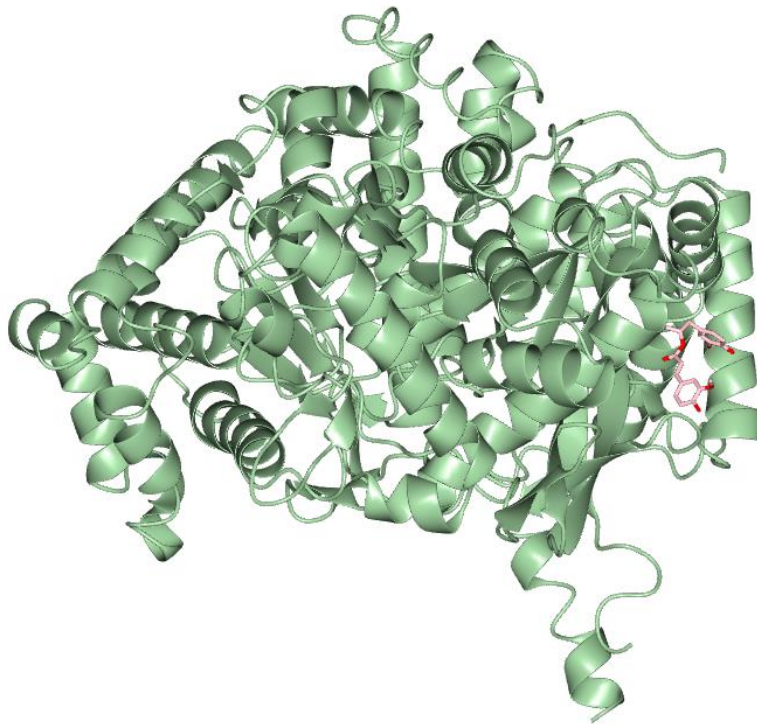


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ: Ο
ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΩΝ ΚΕΝΤΡΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ**



Όνοματεπώνυμο: Στάμου Χριστίνα Πηνελόπη

Πατρώνυμο: Στάμου Αθανάσιος

ΛΑΡΙΣΑ 2021

**ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ: Ο
ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΩΝ ΚΕΝΤΡΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ**

**INHIBITORS OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE: THE ROLE
OF THE PERIPHERAL BINDING SITES**

ΟΝΟΜΑ: ΣΤΑΜΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΠΗΝΕΛΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

**ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ ΜΑΡΙΑ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ,
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ**

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	6
I. Περίληψη.....	7
II. <i>Abstract</i>	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. Η ινσουλίνη	11
1.2.1. Η βιοσύνθεση της ινσουλίνης	11
<i>Εικόνα 1</i>	12
1.2.2. Σηματοδότηση ινσουλίνης	12
1.2.3. Η έκκριση της ινσουλίνης	12
<i>Εικόνα 2</i>	13
1.2.4. Δράσεις ινσουλίνης	13
1.3. Γλυκογόνο.....	14
1.3.1. Σύνθεση του γλυκογόνου	14
<i>Εικόνα 3</i>	15
1.3.2. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου	15
<i>Εικόνα 4</i>	16
<i>Εικόνα 5</i>	16
1.4. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP).....	16
<i>Εικόνα 6</i>	17
<i>Εικόνα 7</i>	18
1.5. Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP).....	18
1.5.1. Η δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	19
1.5.1.1. Καταλυτικό κέντρο	19
1.5.1.2. Αλλοστερικό κέντρο	20
1.5.1.3. Νέο αλλοστερικό κέντρο	20
1.5.1.4. Κέντρο αναστολής	20
1.5.1.5. Κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου	21
1.5.1.6. Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης.....	21
<i>Εικόνα 8</i>	21
1.5.2. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων	22

1.6.	Κρυσταλλογραφία	22
1.6.1.	Πρωτεϊνικός κρύσταλλος.....	22
1.6.2.	Κρυστάλλωση πρωτεϊνών	23
	<i>Εικόνα 9</i>	23
1.6.3.	Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.....	24
1.6.4.	Βελτιστοποίηση του μοριακού μοντέλου	24
1.7.	Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων	25
	<i>Εικόνα 10</i>	26
1.7.1.	Κινητικές μελέτες αλλοστερικών ενζύμων.....	26
	<i>Εικόνα 11</i>	27
1.7.2.	Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων.....	27
	<i>Εικόνα 12</i>	28
	Σκοπός	29
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
2.1.	Αντιδραστήρια.....	30
2.2.	Οργανολογία	31
2.3.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών – Πηκτή SDS (<i>SDS-PAGE</i>)	31
	<i>Εικόνα 13</i>	33
2.4.	Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGbp)	33
2.5.	Κινητικές μελέτες έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	37
	<i>Εικόνα 14</i>	37
2.6.	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου	37
2.7.	Ενζυμικό διάλυμα.....	38
2.8.	Υποστρώματα	39
2.9.	Προσδιορισμός K_m	40
2.10.	Προσδιορισμός της K_a^{app}	41
2.11.	Προσδιορισμός K_i	41
2.12.	Ανάλυση κινητικών δεδομένων	42
2.13.	Κρυσταλλογραφικές Μελέτες	43
2.13.1.	Συλλογή και ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	43
	<i>Εικόνα 15</i>	44
	<i>Εικόνα 16</i>	45
2.13.2.	Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου	45
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	46

3.1. Απομόνωση και καθαρισμός της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κονίλους.....	46
<i>Εικόνα 17</i>	46
3.2. Κινητικές μελέτες	47
3.2.1. Προσδιορισμός της K_m της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς τη συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης.....	47
<i>Εικόνα 18</i>	47
3.2.2. Προσδιορισμός της K_a της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς τη συγκέντρωση <i>AMP</i>	48
<i>Εικόνα 19</i>	48
3.2.3. Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα Β02	49
<i>Εικόνα 20</i>	49
3.3. Δομικά αποτελέσματα	49
<i>Εικόνα 21</i>	51
<i>Εικόνα 22</i>	52
<i>Εικόνα 23</i>	52
Συζήτηση	53
Βιβλιογραφία	54

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η χρονική διάρκεια της πτυχιακής αυτής εργασίας ήταν από τον Μάιο έως τον Αύγουστο του 2021 και έγινε υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο, τον οποίο ευχαριστώ θερμά που δέχτηκε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία υπό την επίβλεψή του καθώς και για την καθοδήγηση αλλά και την υποστήριξη που μου παρείχε όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους καθηγητές της τριμελούς μου επιτροπής, Δρ, Σκαμνάκη Βασιλική και Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή τους. Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, τόσο για την υποστήριξή τους όσο και για την προθυμία να με βοηθήσουν να ενσωματωθώ στο εργαστήριο. Ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Κούλα Συμεών για την βοήθεια του και την και για την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς είχε καταλυτικό ρόλο στην επιτυχή εκπόνησή της. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υποστήριξή τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους όλα αυτά τα χρόνια.

I. Περίληψη

Είναι γεγονός πως ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική διαταραχή του μεταβολισμού με κύριο χαρακτηριστικό της την υπεργλυκαιμία η οποία μπορεί να οφείλεται στη μειωμένη έκκριση ινσουλίνης προκαλώντας έτσι τον διαβήτη τύπου 1 ή στην ελαττωματική δράση της ινσουλίνης προκαλώντας τον διαβήτη τύπου 2. Οι συνέπειες του διαβήτη είναι πολλές και μπορούν να οδηγήσουν έως και στην καταστροφή κάποιων οργάνων θέτοντας έτσι την ανάγκη για την εύρεση νέων φαρμάκων και αποτελεσματικών θεραπειών.

Ένας επικυρωμένος φαρμακευτικός στόχος για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων αποτελεί η φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία φυσιολογικά καταλύει τη διάσπαση του γλυκογόνου παρέχοντας γλυκόζη στο αίμα. Πιο συγκεκριμένα, μελετώνται ενώσεις που έχουν ανασταλτική δράση στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και μπορούν, συνεπώς να χρησιμοποιηθούν ως αντι-υπεργλυκαιμικοί παράγοντες. Το ένζυμο αυτό έχει 2 ισομορφές, την ισομορφή α στην οποία το ένζυμο είναι φωσφορυλιωμένο και την ισομορφή β όπου το ένζυμο δεν είναι φωσφορυλιωμένο. Ακόμη, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου μπορεί να βρίσκεται σε 2 καταστάσεις, την ενεργή κατάσταση R όπου το ένζυμο έχει υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμά του και την ανενεργή κατάσταση T στην οποία το ένζυμο έχει χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα. Στο ένζυμο έχουν εντοπιστεί 6 διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης και οι περισσότεροι αναστολείς που μελετώνται (παράγωγα γλυκόζης), έχουν ως σκοπό την πρόσδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο και την αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, αρχικά απομονώθηκε το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (*rmGP*) το οποίο βρίσκεται στην ισομορφή β και στην κατάσταση T . Στην συνέχεια μελετήθηκε η πρόσδεση και η ανασταλτική δράση ενός μορίου το οποίο έχει σχεδιαστεί για να προσδένεται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ανασταλτική δράση του μορίου αυτού στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου, πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών. Για την συγκεκριμένη ένωση που μελετήθηκε, βρέθηκε ότι η σταθερά αναστολής K_i ήταν $65.02 \mu M$ υποδεικνύοντας ισχυρή αναστολή. όπως έδειξαν κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων X ο αναστολέας προσδένεται στο αλλοστερικό κέντρο. Εκπονήθηκε ανάλυση των αλληλεπιδράσεων αναστολέα (δεσμοί υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*) με πρωτεϊνικά κατάλοιπα με στόχο την ανάλυση της δομικής βάσης της αναστολής του.

II. Abstract

It is a fact that diabetes mellitus is an important metabolic disorder characterized by hyperglycemia which may be due to reduced insulin secretion causing type 1 diabetes or defective action of insulin causing type 2 diabetes. The consequences of diabetes are many and can lead to the destruction of some organs thus raising the need to find new drugs and effective treatments.

A validated pharmaceutical target for the development of new drugs is glycogen phosphorylase which catalyses glycogen degradation. More specifically, small molecule glycogen phosphorylase inhibitors are studied for their use as anti-hyperglycemic drugs. The enzyme has 2 isoforms, the isoform a in which the enzyme is phosphorylated and the isoform b in which the enzyme is not phosphorylated. Furthermore, glycogen phosphorylase can be found in two states, the active R state in which the enzyme displays high affinity for substrates and the inactive state T in which the enzyme has low affinity for substrates. Moreover, 6 different binding sites have been identified and, thus far, most of the studied inhibitors (glucose derivatives), are intended to bind to the active site reducing hereby the enzyme's activity.

In the present thesis, glycogen phosphorylase was purified from rabbit skeletal muscle (rmGP) in the isoform b and in T state. A small molecule designed to bind at the allosteric site was assessed for inhibition. Kinetic studies lead to the measurement of the inhibition constant (K_i) to the value of 65.02 μM which indicates strong inhibition. Moreover, crystallographic X-ray studies were also performed to establish the binding site. The inhibitor binds at the allosteric site and analysis of the protein-inhibitor interactions (hydrogen bonds and the Van der Waals interactions) provided the structural basis of its inhibitory potency.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί ένα σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από επιμέρους ασθένειες που παρουσιάζουν παρόμοια συμπτώματα και επιπλοκές αλλά έχουν διαφορετική αιτιολογία. Με βάση την αιτιολογία και την παθολογία ο σακχαρώδης διαβήτης διαχωρίζεται σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (*T1DM*), σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (*T2DM*), σακχαρώδη διαβήτη κύησης (*GDM*) και σε άλλους τύπους. Η κοινή αιτία σε όλους τους τύπους διαβήτη αποτελεί η έλλειψη της ορμόνης ινσουλίνης, ενώ ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται επιπλέον από αντίσταση στην ινσουλίνη [1].

Κοινό σύμπτωμα όλων των τύπων διαβήτη είναι η υπεργλυκαιμία που προκύπτει είτε από την έκκριση ινσουλίνης είτε από τη δράση της ινσουλίνης είτε και των δυο αυτών μαζί. Η χρόνια υπεργλυκαιμία σχετίζεται με μακροχρόνια καταστροφή και δυσλειτουργία διάφορων οργάνων, κυρίως των οφθαλμών, των νεφρών, των νεύρων, της καρδιάς και των φλεβών. Τα συμπτώματα της έντονης υπεργλυκαιμίας περιλαμβάνουν πολυουρία, πολυδιψία, απώλεια βάρους και μερικές φορές πολυφαγία και θολή όραση. Οι οξείες συνέπειες του ανεξέλεγκτου διαβήτη είναι η υπεργλυκαιμία με κετοξέωση ή το μη κετοξικό υπεροσμωτικό σύνδρομο. Οι μακροχρόνιες επιπλοκές του διαβήτη περιλαμβάνουν την αμφιβληστροειδοπάθεια με πιθανή απώλεια όρασης, νεφροπάθεια με κίνδυνο για έλκος στα πόδια και ακρωτηριασμό και αυτόνομη νευροπάθεια που προκαλεί γαστρεντερικά, ουρογεννητικά και καρδιαγγειακά συμπτώματα και σεξουαλική δυσλειτουργία. Οι ασθενείς με διαβήτη έχουν αυξημένη συχνότητα αθηροσκληρωτικής καρδιαγγειακής, περιφερικής αρτηριακής και εγκεφαλοαγγειακής νόσου [2].

1.1.1. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 είναι μια γενετική αυτοάνοση ασθένεια του ανοσοποιητικού συστήματος και τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ασθένεια αυτή βρίσκονται στον μικρό βραχίονα του 6^{ου} χρωμοσώματος, τα οποία είναι γνωστό ότι ελέγχουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Προκειμένου να εμφανισθεί η ασθένεια πρέπει ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα να επιτεθούν στα κύτταρα β του παγκρέατος και να τα καταστρέψουν προκαλώντας ανεπάρκεια ινσουλίνης και συνεπώς διαβήτη [1].

Υπάρχουν 3 μορφές του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1. Η πρώτη μορφή εμφανίζεται κατά την αρχή της εφηβείας και η εξέλιξή της είναι αργή, καθώς ο περιβαλλοντικός παράγοντας που διεγείρει την ασθένεια αυτή δρα αρκετά χρόνια πριν η μάζα των β κυττάρων να έχει μειωθεί αρκετά, ώστε να εμφανιστούν τα συμπτώματα στον ασθενή [1].

Η δεύτερη μορφή της νόσου εμφανίζεται σε νεότερα άτομα κυρίως κατά την σχολική ηλικία. Η μορφή αυτή εμφανίζεται πολύ πιο γρήγορα σε σχέση με την μορφή 1 και

σχετίζεται με προηγούμενη ιογενή λοίμωξη. Τα άτομα που εμφανίζουν αυτή τη μορφή της νόσου χάνουν σχεδόν όλα τους τα β κύτταρα με γρήγορο ρυθμό [1].

Η τρίτη μορφή της νόσου ονομάζεται και ως λανθάνων αυτοάνοσος σακχαρώδης διαβήτης και εμφανίζεται και σε ενήλικους και είναι παρόμοια με την πρώτη μορφή της νόσου. [1].

Σε όλες αυτές τις μορφές του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 ο κοινός παρονομαστής είναι η βλάβη και ο θάνατος των κυττάρων β του παγκρέατος από τα T λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, με απώλεια παραγωγής ινσουλίνης. Η ανεπάρκεια ινσουλίνης που παράγεται με τον τρόπο αυτό είναι απόλυτη και με διάρκεια ζωής. Η απόλυτη ανεπάρκεια ινσουλίνης οδηγεί στη συνέχεια σε αποτυχία αναβολικών διεργασιών. Η γλυκόζη δεν μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα και συσσωρεύεται στο αίμα. Η προκύπτουσα υπεργλυκαιμία προκαλεί υπερβολική ούρηση (πολυουρία), στη συνέχεια υπερβολική δίψα (πολυδιψία) για να αντισταθμίσει την απώλεια νερού, ακολουθούμενη από υπερβολική πείνα (πολυφαγία), επειδή τα κύτταρα έχουν ανεπάρκεια καυσίμου. Παρά την πολυφαγία, υπάρχει κυτταρικός θάνατος και απώλεια και έτσι υπάρχει απώλεια βάρους. Όταν η πρόσληψη υγρών και τροφίμων δεν μπορεί πλέον να συμβαδίζει με τις απώλειες, εμφανίζεται αφυδάτωση και έλλειψη ηλεκτρολυτών. Η διάσπαση λίπους έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων (*FFAs*) από τα λιποκύτταρα. Τα *FFA* ταξιδεύουν στο ήπαρ και μετατρέπονται σε ακετόνη, ακετοξικό οξύ και σώματα βιταϋδροξυβουτερικού οξέος ή κετόνης. Όσο μεγαλύτερος είναι ο σχηματισμός κετονικών σωμάτων, τόσο μεγαλύτερη είναι η εμφάνιση οξέωσης. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η κετοξέωση, με αποτέλεσμα κώμα και θάνατο, εάν δεν αντιμετωπιστεί [1].

1.1.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι μια από τις πιο συχνές μεταβολικές διαταραχές παγκοσμίως και η ανάπτυξή του προκαλείται κυρίως από τον συνδυασμό 2 βασικών παραγόντων: την μειωμένη έκκριση ινσουλίνης από τα κύτταρα β του παγκρέατος και την αδυναμία των ευαίσθητων ιστών στην ινσουλίνη να ανταποκριθούν σε αυτή. Οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη σύνθεση και στην απελευθέρωση της ινσουλίνης καθώς και η απόκριση των ιστών στην ινσουλίνη πρέπει να ρυθμίζονται αυστηρά. Συνεπώς, τα ελαττώματα σε οποιονδήποτε από αυτούς τους εμπλεκόμενους μηχανισμούς μπορούν να οδηγήσουν σε μεταβολική ανισορροπία που οδηγεί στην παθογένεση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 [3].

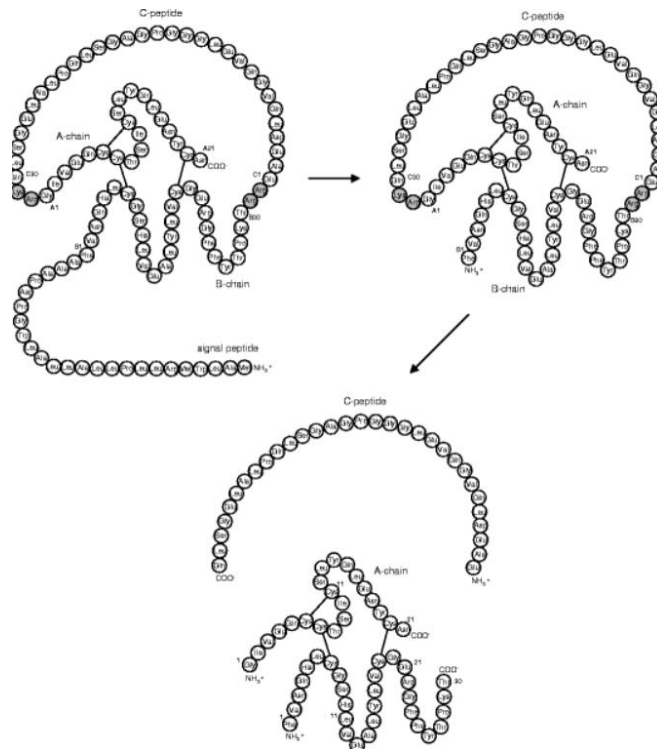
Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (*WHO*) ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια, μεταβολική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, η οποία οδηγεί με την πάροδο του χρόνου σε βλάβη στην καρδιά, στα αγγεία, στα μάτια, στα νεφρά και στα νεύρα. Πάνω από το 90% των περιπτώσεων σακχαρώδους διαβήτη είναι σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης από β-κύτταρα του παγκρέατος, αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη (*IR*) και ανεπαρκή αντισταθμιστική εκκριτική απόκριση ινσουλίνης. Η εξέλιξη της νόσου καθιστά την έκκριση ινσουλίνης ανίκανη να διατηρήσει την ομοιόσταση της γλυκόζης, προκαλώντας υπεργλυκαιμία [3].

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 μπορεί να οφείλεται και σε γενετικούς παράγοντες. Υπάρχουν πολλά γονίδια που ελέγχουν έναν αριθμό χημικών βημάτων στη δράση των κυττάρων β , την έκκριση ινσουλίνης, τη δράση της ινσουλίνης στο επίπεδο των κυττάρων, την παραγωγή υποδοχέα ινσουλίνης από το κύτταρο και τη δράση της ινσουλίνης μέσα στο κύτταρο. Ένα διαφορετικό γονίδιο ελέγχει την παραγωγή ενζύμων για κάθε βήμα αυτής της διαδικασίας. Ένα ελάττωμα σε οποιοδήποτε από αυτά τα γονίδια μπορεί να αποτρέψει την παραγωγή ενζύμων και να εμποδίσει τη δράση της ινσουλίνης. Αυτό το μπλοκ μπορεί να επηρεάσει την πρόσληψη γλυκόζης από το κύτταρο, να αυξήσει την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ, να αποτρέψει την πρόσληψη γλυκόζης και λιπαρών οξέων από τα λιπώδη κύτταρα, να αυξήσει τη διάσπαση των τριγλυκεριδίων και να προκαλέσει πολλά άλλα μεταβολικά ελαττώματα. Όλοι αυτοί οι παράγοντες καθιστούν δύσκολη την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου [1].

1.2. Η ινσουλίνη

1.2.1. Η βιοσύνθεση της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη παράγεται από τα κύτταρα β των νησιδίων *Langerhans* του παγκρέατος ύστερα από την επίδραση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα [1]. Η βιοσυνθετική οδός περιλαμβάνει πολλά βήματα και ξεκινά με την παρασκευή της προπροϊνσουλίνης, η οποία περιέχει προϊνσουλίνη και ένα πεπτίδιο σήματος 24 αμινοξέων που απελευθερώνεται κατά τη μετάθεση στο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο (*RER*) μέσω σήματος από την πεπτιδάση. Η προκύπτουσα προϊνσουλίνη, μια πεπτιδική ορμόνη μονής αλυσίδας με μοριακό βάρος 9.388 *Da*, δημιουργεί δύο διαμοριακούς και έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό αποδίδοντας την απαιτούμενη φυσική δομή. Η ινσουλίνη προέρχεται από την προϊνσουλίνη με την εξάλειψη ενός θραύσματος που ονομάζεται C-πεπτίδιο το οποίο έχει μοριακό βάρος 3,020 *Da* και συνδέει το C-άκρο της αλυσίδας B της ινσουλίνης με το N-άκρο της αλυσίδας A της ινσουλίνης μέσω 2 επιπλέον αμινοξικών καταλοίπων στην κάθε αλυσίδα. Στη συνέχεια, συμπληρωματικές αποκοπές δημιουργούν ινσουλίνη, μια πεπτιδική ορμόνη με μοριακό βάρος 5,807 *Da* που περιλαμβάνει δύο αλυσίδες με 21 (A-αλυσίδα) και 30 (B-αλυσίδα) αμινοξέα που συνδέονται μέσω δύο δισουλφιδικών γεφυρών. Μετά την ολοκλήρωση της βιοσύνθεσης, η ινσουλίνη αποθηκεύεται με ισομοριακές ποσότητες C-πεπτιδίου σε ώριμους κόκκους των β -κυττάρων μέχρι την έκκριση στην κυκλοφορία του αίματος [4].



Εικόνα 1 Η βιοσύνθεση της ινσουλίνης [4]

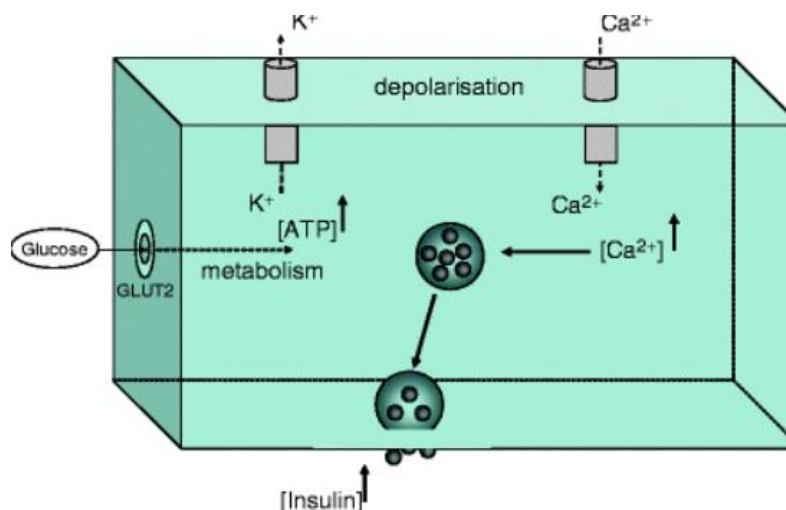
1.2.2. Σηματοδότηση ινσουλίνης

Τα υποστρώματα του υποδοχέα ινσουλίνης (*IRS*) ενσωματώνονται στον πρωτεϊνικό μεμβρανικό υποδοχέα ινσουλίνης που αποτελεί μια κινάση τυροσίνης (*IR*) και ενεργοποιούνται πρωτεΐνες και ένζυμα που έχουν ρόλο στην μεταβολική ρύθμιση του οργανισμού. Η ινσουλίνη προσδένεται στο μεμβρανικό υποδοχέα της και στην συνέχεια αυτός αυτοφωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται. Στον ενεργό πλέον υποδοχέα, προσδένονται τα υποστρώματά *IRS* μέσω της επικράτειας *PTB* που βρίσκεται στο N-άκρο τους και έπειτα ενεργοποιούνται πολλά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι $IRS \rightarrow PI3K \rightarrow AKT \rightarrow GLUT4$ το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη γλυκόζης από κύτταρα των μυών και του λιπώδους ιστού, το $IRS \rightarrow PI3K \rightarrow AKT \rightarrow mTOR$ το οποίο ρυθμίζει την πρωτεϊνοσύνθεση και την βιοσύνθεση των λιπιδίων, το μονοπάτι $IRS \rightarrow PI3K \rightarrow AKT \rightarrow FOXO$ μέσω του οποίου αναστέλλεται η γλυκονεογένεση και η λιπόλυση, το μονοπάτι $IRS \rightarrow PI3K \rightarrow AKT \rightarrow GSK3$ μέσω του οποίου προωθείται η σύνθεση του γλυκογόνου από την ινσουλίνη και το μονοπάτι $GRB2 \rightarrow SOS \rightarrow RAF \rightarrow MAPKs$ το οποίο είναι ανεξάρτητο της *PI3K* και επιτρέπει στην ινσουλίνη να ασκεί μιτογόνο δράση [5].

1.2.3. Η έκκριση της ινσουλίνης

Μέσω του μεταφορέα *GLUT-2*, η γλυκόζη διέρχεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και υφίσταται μεταβολικές διεργασίες, οι οποίες προκαλούν την ενδοκυτταρική αύξηση της αναλογίας *ATP/ADP*. Και τα δύο υποστρώματα, *ATP* και *ADP*, επηρεάζουν τα ευαίσθητα σε *ATP* κανάλια καλίου (*KATP*), η δραστηριότητα των οποίων αναστέλλεται ή αυξάνεται από αυξημένες συγκεντρώσεις *ATP* ή *ADP*, αντίστοιχα. Η αποπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης που σχετίζεται με, μεταξύ άλλων, την απενεργοποίηση του *KATP*, έχει ως αποτέλεσμα εισροή ασβεστίου μέσω διαύλων ασβεστίου με τάση, που στη συνέχεια ενεργοποιεί την εξωκυττάρωση

κόκκων ινσουλίνης. Η επίδραση της γλυκόζης στα β -κύτταρα του παγκρέατος σχετίζεται με τη δόση και με τον τρόπο χορήγησης. Οι κύριοι λόγοι για αυτό το φαινόμενο συνοψίζονται ως το φαινόμενο ινκρετίνης, το οποίο περιλαμβάνει υποτιθέμενες ιδιότητες ευαισθητοποίησης γλυκόζης των πεπτιδικών ορμονών σε β -κύτταρα, π.χ. το ινσουλινοτροπικό πεπτίδιο που εξαρτάται από τη γλυκόζη (*GIP*), τη χολοκυστοκίνη (*CKK*) και το γλυκαγόνο που μοιάζει με το πεπτίδιο-1 (*GLP-1*), τα οποία απελευθερώνονται μεταγευματικά από το γαστρεντερικό σωλήνα. Εκτός από τους υδατάνθρακες, τα αμινοξέα λευκίνη, αργινίνη και λυσίνη έχουν ινσουλινογενική δράση, η οποία ενισχύεται από τη γλυκόζη [4].



Εικόνα 2 Έκκριση ινσουλίνης από τα β παγκρεατικά κύτταρα [4]

1.2.4. Δράσεις ινσουλίνης

Η ινσουλίνη έχει διάφορες λειτουργίες σε διαφορετικά κύτταρα. Διευκολύνει όχι μόνο την πρόσληψη συστατικών τροφίμων στα κύτταρα αλλά και την αποθήκευσή τους. Φυσιολογικά, μετά από γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες, η γλυκόζη που απορροφάται διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης η οποία έχει ως ρόλο την μεταφορά και αποθήκευση της γλυκόζης σε σχεδόν όλους τους ιστούς, αλλά κυρίως στους μύες, στον λιπώδη ιστό και στο ήπαρ [6]. Η ινσουλίνη επίσης, διεγείρει τα ένζυμα που παράγουν γλυκογόνο και λίπος και καταστέλλει τα ένζυμα που τα διαλύουν [5]. Αυτή η ανάλυση των ουσιών αποθήκευσης είναι μια φυσιολογική διαδικασία και είναι ζωτικής σημασίας για τη μεταβολική διαδικασία. Ελλείψει ινσουλίνης, η διαδικασία είναι πολύ γρήγορη. Το σύστημα δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει τους μεταβολίτες που παράγονται και δημιουργείται καταβολική κατάσταση. Το ήπαρ μπορεί επίσης να παράγει νέα γλυκόζη (γλυκονεογένεση) από πρωτεΐνες και σε μικρότερο βαθμό από τη γλυκερόλη που παράγεται κατά την κατανομή του λίπους. Η παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ είναι μια από τις πιο σημαντικές διαδικασίες που οδηγούν στην υπεργλυκαιμία του διαβήτη, είτε από ανεπάρκεια ινσουλίνης είτε από αντίσταση στην ινσουλίνη [4].

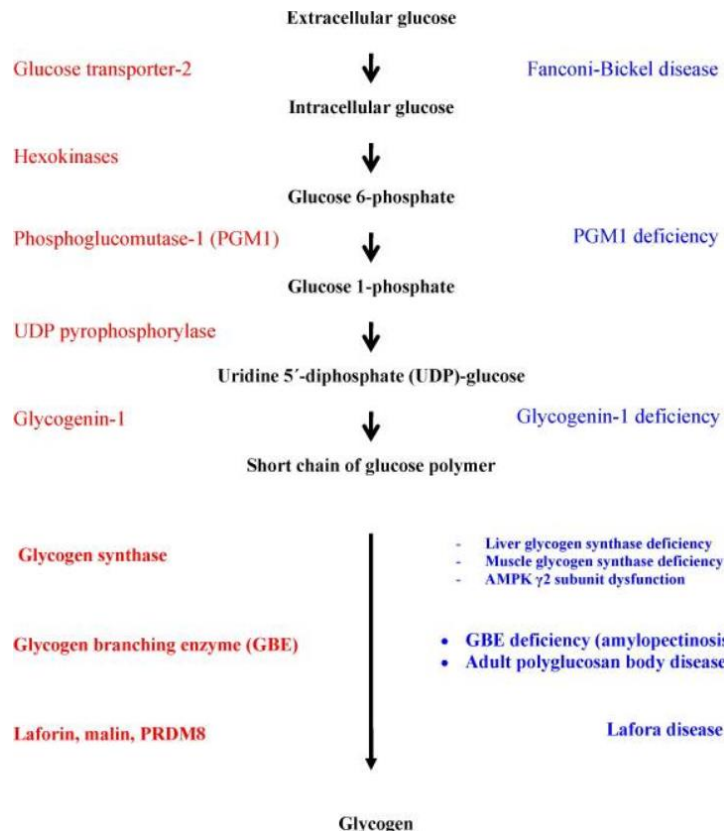
1.3.Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης που περιέχει μικρή ποσότητα φωσφορικών και γλυκοζαμίνης. Στις γραμμικές αλυσίδες, τα κατάλοιπα γλυκόζης συνδέονται με α -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ οι α -1,6-γλυκοζιτικοί δεσμοί δημιουργούν τα σημεία διακλάδωσης. Τα σωματίδια γλυκογόνου αποτελούνται από 55.000 κατάλοιπα γλυκόζης [7].

Το γλυκογόνο λειτουργεί ως αποθήκη υδατανθράκων και ως πηγή 6-φωσφορικής γλυκόζης για τη γλυκόλυση στους περισσότερους ιστούς. Ωστόσο, στο ήπαρ το γλυκογόνο χρησιμεύει ως πηγή γλυκόζης για την διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στο αίμα κατά τα χρονικά διαστήματα μεταξύ των γευμάτων. Το γλυκογόνο του ήπατος συντίθεται μετά από ένα γεύμα ως απόκριση σε αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στην πυλαία φλέβα, αύξηση της αναλογίας ινσουλίνης προς γλυκαγόνης και στα ενδοκρινικά σήματα που ενεργοποιούνται από τα υποστρώματα στην πυλαία φλέβα [8].

1.3.1. Σύνθεση του γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου απαιτεί τη συντονισμένη δράση ενός αριθμού ενζύμων. Η γλυκόζη εισέρχεται στα κύτταρα μέσω μεταφορέων γλυκόζης, φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη από ισοένζυμα εξωκινάσης. Ακολουθεί ο ισομερισμός της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 1-φωσφορική γλυκόζη από την φωσφογλυκοματάση-1. Έπειτα η πυροφωσφορυλάση της γλυκόζης 5-διφωσδορικής ουριδίνης (*UDP*) καταλύει τον σχηματισμό της *UDP*-γλυκόζης από την 1-φωσφορική γλυκόζη. Η γλυκογενίνη ξεκινά την σύνθεση του γλυκογόνου με αυτογλυκοσυλίωση και με μεταφορά της γλυκόζης από τη *UDP*-γλυκόζη στον εαυτό της και σχηματίζεται έτσι μια μικρή γραμμική αλυσίδα που αποτελείται περίπου από 10-20 μονομερή γλυκόζης. Η συνθάση του γλυκογόνου είναι αυτή που είναι υπεύθυνη για την επιμήκυνση της αλυσίδας αυτής καθώς μεταφέρει μονομερή γλυκόζης από την *UDP*-γλυκόζη στην αλυσίδα αυτή και επίσης δημιουργεί α -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των μονομερών γλυκόζης που προστίθενται. Ακόμη, το ένζυμο διακλάδωσης εισάγει σημεία διακλάδωσης στα μόρια γλυκογόνου δημιουργώντας α -1,6-γλυκοζιτικούς δεσμούς ανά τακτά διαστήματα [9].

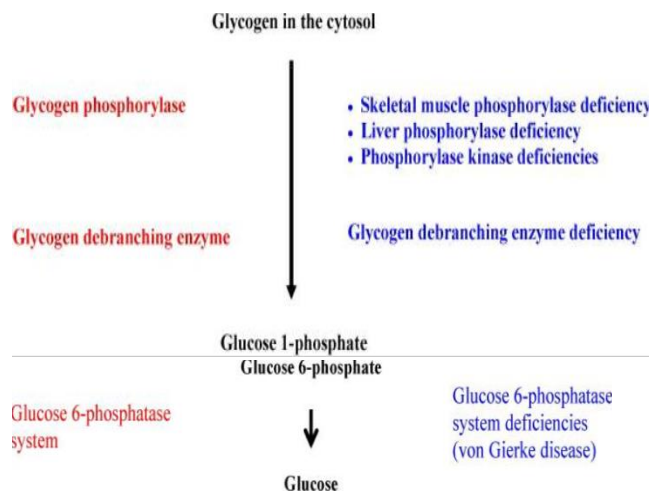


Εικόνα 3 Πορεία σύνθεσης γλυκογόνου. Με μπλε γράμματα φαίνονται οι αντίστοιχες ασθένειες που μπορεί να προκύψουν σε κάθε βήμα της σύνθεσης [9]

1.3.2. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

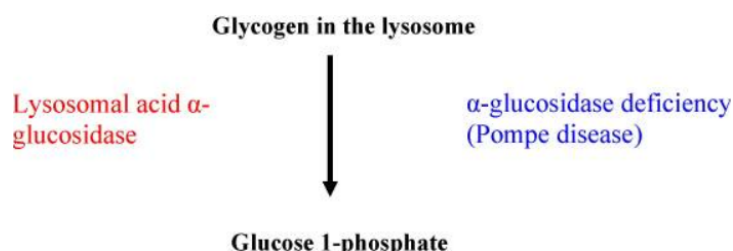
Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα καθώς και στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων. Στο κυττόςόλιο η διάσπαση του γλυκογόνου λαμβάνει χώρα με τη συντονισμένη δράση τριών ενζύμων. Αρχικά, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης, μέσω της διάσπασης των α -1,4-γλυκοζιτικών δεσμών. Όμως, οι α -1,6-γλυκοζιτικοί δεσμοί που βρίσκονται στα σημεία διακλάδωσης αποτελούν εμπόδιο για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου σταματά τη διάσπαση των α -1,4-γλυκοζιτικών δεσμών 4 κατάλοιπα πριν το σημείο διακλάδωσης. Προκειμένου να συνεχίσει η αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι απαραίτητη η δράση του ενζύμου αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου, το οποίο διαθέτει δραστηριότητα μεταφοράς και γλυκοσιδάσης. Η δραστηριότητα μεταφοράς, είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά τριών καταλοίπων από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη με αποτέλεσμα να αφήνεται ελεύθερο ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης το οποίο αποτελεί διακλάδωση καθώς είναι συνδεδεμένο με α -1,6-γλυκοζιτικό δεσμό ο οποίος στην συνέχεια υδρολύεται με δράση της γλυκοσιδάσης [10].

Η 1-φωσφορική γλυκόζη η οποία απελευθερώθηκε από το γλυκογόνο και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα μπορεί να ισομεριστεί σε 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία αποφωσφορυλιώνεται από την φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης και εν τέλει απελευθερώνεται γλυκόζη. Η γλυκόζη στη συνέχεια εξέρχεται από τα κύτταρα μέσω του μεταφορέα γλυκόζης .



Εικόνα 4 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου στο κυτταρόπλασμα. Με μπλε γράμματα φαίνονται οι αντίστοιχες ασθένειες που μπορεί να προκύψουν σε κάθε βήμα της αποικοδόμησης. [9]

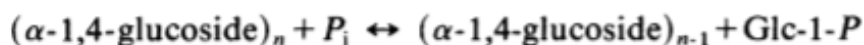
Στα λυσοσώματα, η διάσπαση του γλυκογόνου επιτυγχάνεται με το λυσοσωμικό ένζυμο οξική α-γλυκοσιδάση ή οξική μαλτάση [9].



Εικόνα 5 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου στα λυσοσώματα. Με μπλε γράμματα φαίνονται οι αντίστοιχες ασθένειες που μπορεί να προκύψουν σε κάθε βήμα της αποικοδόμησης [9]

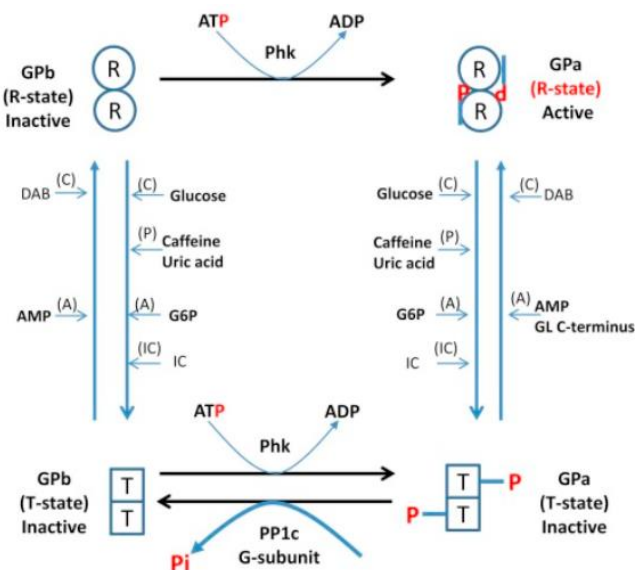
1.4. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (E.C.2.4.1.1) είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο που καταλύει την ενδοκυτταρική αποικοδόμηση του γλυκογόνου στους μύες για την παροχή ενέργειας και στο ήπαρ για την παραγωγή αερίων που χρησιμοποιούνται από άλλους ιστούς [11]. Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι η εξής:



In vitro, η αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση είναι εύκολα αντιστρεπτή και πραγματοποιείται σε $pH=6,8$ [10].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ομοδιμερές ένζυμο με δύο πανομοιότυπες υπομονάδες των 97 kDa (842 κατάλοιπα), το οποίο υπάρχει σε δύο μορφές: τη φωσφορυλιωμένη α και τη μη φωσφορυλιωμένη β . Το ποσοστό στο οποίο υπάρχει κάθε ισομορφή ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Πιο συγκεκριμένα η λιγότερο ενεργή μορφή β μετατρέπεται στην πιο ενεργή ισομορφή α μέσω φωσφορυλίωσης. Η ισομορφή α της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποφωσφορυλιώνεται από τη φωσφατάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και επιστρέφει στην λιγότερη ενεργή ισομορφή β [13]. Επίσης, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου μπορεί να βρίσκεται σε δύο διαμορφώσεις: στην ανενεργή κατάσταση T (*Tense*) και στην ενεργή κατάσταση R (*Relaxed*) [12]. Η R κατάσταση έχει υψηλή συγγένεια για τα υποστρώματα και για ορισμένους αλλοστερικούς τελεστές όπως την AMP ενώ η T κατάσταση έχει χαμηλή συγγένεια για τα υποστρώματα, το γλυκογόνο και τα φωσφορικά ιόντα (P_i). Παρόλο που φωσφορυλίωση της $Ser-14$ και η πρόσδεση της AMP στην αλλοστερική θέση πρόσδεσης οδηγούν σε μετατροπή του ενζύμου στην ενεργή R κατάσταση, προσδέτες του ενεργού κέντρου και του αλλοστερικού κέντρου μπορούν να διαμορφώσουν την κατάσταση του ενζύμου. Η αλλοστερική θέση πρόσδεσης της AMP που είναι δίπλα στη θέση φωσφορυλίωσης, μπορεί να αποτελεί θέση πρόσδεσης για διάφορους προσδέτες όπως η 6-φωσφορική γλυκόζη, η 1-φωσφορική φρουκτόζη, την ATP , την ADP και την IMP που σταθεροποιούν την T κατάσταση. Η πρόσδεση της 6-φωσφορικής γλυκόζης και της AMP είναι αμοιβαία αποκλειστική καθώς οι φωσφορικές τους ομάδες προσδένονται στα ίδια κατάλοιπα αν και είναι σε μερικώς επικαλυπτόμενες θέσεις και σταθεροποιούν αντίστοιχα την T και R κατάσταση [8].

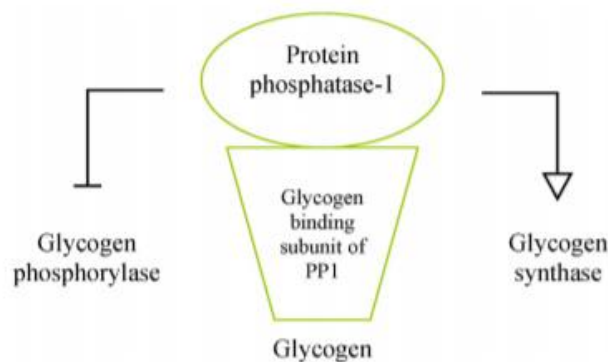


Εικόνα 6 Έλεγχος τη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μέσω φωσφορυλίωσης και αλλοστερικών επιδράσεων. Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Phk) προάγει τη μετατροπή του GPb σε GPa με φωσφορυλίωση μιας σερίνης που βρίσκεται στο N -άκρο κάθε υπομονάδας του διμερούς. Οι αλλοστερικοί προσδέτες σταθεροποιούν είτε

την *R* κατάσταση είτε την *T*. Οι αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μπορεί να σταθεροποιούν είτε την *T* κατάσταση είτε την *R* κατάσταση. [8]

Στο ήπαρ, ο κύριος μηχανισμός ελέγχου είναι μέσω της αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης που μετατρέπει την ανενεργή μορφή β του ενζύμου (*T* κατάσταση) στην ενεργή μορφή α (*R* κατάσταση). Η γλυκόζη είναι ένας φυσιολογικός ηπατικός ρυθμιστής του μεταβολισμού του γλυκογόνου και προωθεί την απενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και δρα συνεργατικά με την ινσουλίνη. Η γλυκόζη απενεργοποιεί την ισομορφή α της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μέσω συναγωνιστικής αναστολής με την 1-φωσφορική γλυκόζη και μέσω της σταθεροποίησης της *T* κατάστασης, η οποία αποτελεί καλύτερο υπόστρωμα απ' ότι η *R* κατάσταση για αποφωσφορυλίωση από την φωσφατάση 1. Μειωμένες συγκεντρώσεις της ισομορφής α της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου επιτρέπουν την ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου [14].

Στους μύες, ο έλεγχος της φωσφορυλάσης γίνεται τόσο από την αντιστρεπτή φωσφορυλίωση ως απόκριση στα νευρικά ή ορμονικά σήματα όσο και μέσω της μη ομοιοπολικής σύνδεσης αλλοστερικών τελεστών καθώς επίσης και από αλλαγές στις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις της *AMP*, της *IMP* και φωσφορικών ιόντων καθώς και από την ενεργότητα της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Όλοι αυτοί οι παράγοντες είναι αυξημένοι κατά τη συστολή [13,14]. Στους μύες, η ινσουλίνη διεγείρει τη συνθάση του γλυκογόνου ενεργοποιώντας τη φωσφατάση 1 καθώς και την αποφωσφορυλίωση της ισομορφής α της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου [14].



Εικόνα 7 Ο ρόλος της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1

1.5. Φωσφορική πυριδοξάλη (*PLP*)

Η φωσφορική πυριδοξάλη (*PLP*) αποτελεί συμπράγοντα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και έχει ρόλο στον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, το υπόστρωμα ορθοφωσφορικά ιόντας δημιουργεί ένα δεσμό υδρογόνου με τη φωσφορική πυριδοξάλη. Η *PLP* συνδέεται με δεσμό βάσης *Schiff* με το κατάλοιπο της λυσίνης 680 που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ουσιαστική η φωσφορική πυριδοξάλη λειτουργεί σαν οξεοβασικός καταλύτης για τη

φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου και εμποδίζει την επαφή με το νερό στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [15].

1.5.1. Η δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι μια ομοδιμερής α - β πρωτεΐνη με το κάθε μονομερές να αποτελείται από 842 κατάλοιπα και να έχει μοριακό βάρος 97.4 kDa. Σύμφωνα με μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, αλλαγές που αφορούν τη διαμόρφωση του ενζύμου λαμβάνουν χώρα μετά την ενεργοποίηση του ενζύμου στους μύες, ύστερα από φωσφορυλίωση. Για παράδειγμα, στην T κατάσταση του ενζύμου στη ισομορφή β , τα αμινοτελικά κατάλοιπα 10-22 βρίσκονται σε εκτεταμένη διαμόρφωση και δεν έχουν συγκεκριμένη διαμόρφωση. Ύστερα από φωσφορυλίωση τα κατάλοιπα αυτά αλλάζουν διαμόρφωση προκειμένου να σχηματίσουν μια α -έλικα 3_{10} . Ακόμη, σημαντικός είναι και ο ρόλος της σερίνης 14 η οποία σχηματίζει ιοντικούς δεσμούς με άλλα κατάλοιπα όπως η αργινίνη 69 ύστερα από φωσφορυλίωση καθώς επίσης και το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης *AMP* και το κέντρο πρόσδεσης γλυκογόνου [16].

Στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχουν προσδιοριστεί 6 διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης:

- το καταλυτικό κέντρο
- το αλλοστερικό κέντρο
- το νέο-αλλοστερικό κέντρο
- το κέντρο αναστολής
- το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου
- το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης [17]

1.5.1.1. Καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης είναι θαμμένο στο κέντρο μεταξύ των δυο μονομερών της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, κοντά στον συμπαράγοντα PLP και περίπου 15 Å μακριά από την επιφάνεια του μορίου και της περιοχής αλληλεπίδρασης των δυο υπομονάδων. Το καταλυτικό κέντρο συνδέεται με την περιοχή της διεπαφής μέσω του βρόχου 280s. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται θαμμένο, στη βάση μια στενής διόδου που σχηματίζεται στη διεπιφάνεια των δύο περιοχών της κάθε υπομονάδας και περιλαμβάνει το συμπαράγοντα PLP. Η Lys680 η οποία εδράζεται στο καταλυτικό κέντρο της GP περιορίζεται χωρικά λόγω αλληλεπιδράσεων με μια έλικα π (κατάλοιπα 488-494) της GP η οποία βρίσκεται αρκετά κοντά με τη Lys680. Η Trp491 βρίσκεται τοποθετημένη πάνω από την Lys680 και μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals σταθεροποιεί τη διάταξη της Lys680-PLP σε τέτοια θέση ώστε να είναι επιτρεπτή η αλληλεπίδραση της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP με το υπόστρωμα (ορθοφωσφορικό ιόν). Η πρόσδεση της γλυκόζης, που αποτελεί το φυσιολογικό αναστολέα του ενζύμου, στο καταλυτικό κέντρο γίνεται κυρίως μέσω δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων van der Waals με τα κατάλοιπα Gly135, Leu136, Leu139, Asn284, His377, Val455, Asn484, Glu672, Ala673, Ser674, Gly675. Επιπρόσθετα, μόρια ύδατος γεφυρώνουν

αλληλεπιδράσεις της γλυκόζης με γειτονικά αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της GP [18]. Οι αναστολείς που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο, οι οποίοι είναι ανάλογα γλυκόζης, σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόγχου 280s (κατάλοιπα 282-287) με αποτέλεσμα να μην επιτρέπουν την πρόσδεση του υποστρώματος και παράλληλα να σταθεροποιούν την κατάσταση *T* του ενζύμου [17].

1.5.1.2. Αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στο σημείο όπου συναντιούνται τα καρβοξυτελικά άκρα των ελίκων α2 (κατάλοιπα 47-78) και α8 (κατάλοιπα 289-314). Ευθυγραμμίζεται από τα β-πτυχωτά φύλλα των β4 (κατάλοιπα 153-160) και β11 (κατάλοιπα 237-247) και περιτριγυρίζεται από το μικρό β-πτυχωτό φύλλο β7 (κατάλοιπα 191-193) καθώς και από το βρόχο του 197 που ακολουθεί. Επιπλέον, το αλλοστερικό κέντρο 'κλείνεται' από την περιοχή καλύπτρας (κατάλοιπα 36-47) από τη συμμετρική υπομονάδα και απέχει από το καταλυτικό κέντρο περίπου 35 Å [16]. Στο αλλοστερικό κέντρο προσδένονται φωσφορυλιωμένες ενώσεις όπως η AMP, το IMP, η ATP, η 6-φωσφορική γλυκόζη (η οποία αποτελεί και τον πιο πιθανό φυσιολογικό αναστολέα της ισομορφής β της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που προσδένεται στο αλλοστερικό κέντρο), NADH, UDP-γλυκόζη, 2-δεοξυ-6-φωσφορική γλυκόζη, β-γλυκεροφωσφορικό και ανόργανο φωσφορικό. Ο ρόλος των προσδετών που προσδένονται στο αλλοστερικό κέντρο είναι να αναστέλλουν τη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με 2 τρόπους: είτε μέσω ανταγωνισμού με το AMP που αποτελεί το φυσιολογικό ενεργοποιητή είτε μέσω σταθεροποίησης της ανενεργής κατάστασης *T* του ενζύμου [17].

1.5.1.3. Νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στο κέντρο του ενζύμου, το οποίο σχηματίζεται στο ένα άκρο από κατάλοιπα την περιοχής της καλύπτρας και της έλικας α2 (*Arg33*, *His34*, *Arg60*, *Arg61* και τα συμμετρικά τους) ενώ στο άλλο άκρο σχηματίζεται από τον πύργο ελίκων α7 (*Asn270*, *Glu273*, *Ser276* και τα συμμετρικά τους). Το ινδόλιο αποτελεί τον πιο γνωστό αναστολέα του νέου αλλοστερικού κέντρου και γι' αυτό το λόγο το κέντρο αυτό ονομάζεται και κέντρο πρόσδεσης ινδολίου. Οι αναστολείς που προσδένονται σε αυτό το κέντρο σταθεροποιούν την ανενεργή κατάσταση *T* του ενζύμου, δρώντας ως αλλοστερικοί αναστολείς, καθώς επίσης δρουν συνεργατικά με άλλους αναστολείς όπως για παράδειγμα με τη γλυκόζη [17].

1.5.1.4. Κέντρο αναστολής

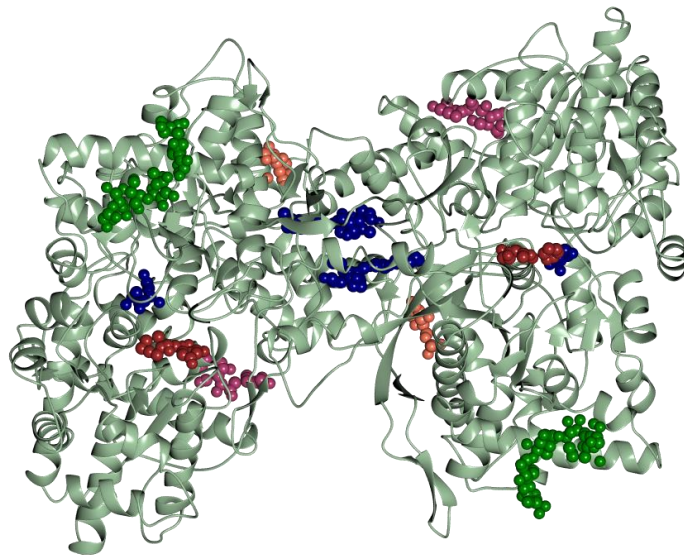
Το κέντρο αναστολής αναφέρεται και ως κέντρο πρόσδεσης της καφεΐνης ή κέντρο νουκλεοτιδίων πουρινών και βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Η αλληλεπίδραση των αρωματικών πλευρικών ομάδων των καταλοίπων *Phe285* και *Tyr613* και ο σχηματισμός αλληλεπιδράσεων π-π όπως και η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης έχουν καταλυτικό ρόλο στην πρόσδεση των προσδετών. Ο πρώτος αναστολέας που ταυτοποιήθηκε πως προσδένεται στο κέντρο αναστολής ήταν η καφεΐνη [17].

1.5.1.5. Κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου

Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου ονομάζεται έτσι καθώς είναι η περιοχή του ενζύμου όπου προσδένεται το γλυκογόνο. Βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου και αποτελείται από 2 έλικες που αποτελούνται από τα κατάλοιπα 396-418 και 420-429 αντίστοιχα καθώς και από ένα βρόχο που συνδέει δύο αντιπαράλληλους κλώνους και αποτελείται από τα κατάλοιπα 430-432 και 437-411 αντίστοιχα. Οι κυκλοδεξτρίνες α-β- και γ- καθώς και οι ακαρβόζη, η μαλτοπεντόζη και μαλτοεπτόζη είναι μερικοί αναστολείς που έχουν βρεθεί ότι προσδένονται στο κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, ύστερα από την αλληλεπίδραση με συγκεκριμένα κατάλοιπα όπως *Ser429*, *Lys473*, *Asn407*. Επίσης, καταλυτική είναι η αλληλεπίδραση μέσω μορίων ύδατος με τα κατάλοιπα *Gln401*, *Arg426*, *Val431* και *Gln433* [17].

1.5.1.6. Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Έχει βρεθεί ότι η κερσετίνη σε αντίθεση με την χρυσίνη και την φλαβοφυριδόλη που αποτελούν προσδέτες του αλλοστερικού κέντρου, προσδένεται σε ένα νέο κέντρο το οποίο ονομάζεται κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης. Το νέο αυτό κέντρο πρόσδεσης σχηματίζεται από συγκεκριμένα κατάλοιπα της καρβοξυτελικής περιοχής (*Lys544*, *Arg551*, *Lys665*, *Tyr548*) και της αμινοτελικής περιοχής (*Glu120*, *Glu123*). Έχει βρεθεί ότι η πρόσδεση της κερσετίνης στο κέντρο αυτό ευνοεί την σταθεροποίηση της ανενεργής *T* κατάστασης, καθώς σταθεροποιεί το βρόχο που αποτελείται από τα κατάλοιπα 548-556 [17].



Εικόνα 8 Απεικόνιση των κέντρων πρόσδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου: το καταλυτικό κέντρο (πράσινο) το αλλοστερικό κέντρο, το νέο-αλλοστερικό κέντρο, το κέντρο αναστολής (κόκκινο) το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου (μωβ) και το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης (ροζ)

1.5.2. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχει προταθεί ως πιθανός στόχος για τη δημιουργία αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων ως θεραπεία ενάντια στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, για τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των διαβητικών ασθενών. Πιο συγκεκριμένα, αναστολείς της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχουν σχεδιαστεί και μελετηθεί ως πιθανή θεραπεία έναντι της υπεργλυκαιμίας που χαρακτηρίζει το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Το ένζυμο αυτό έχει καταλυτικό ρόλο στην αποθήκευση και την απελευθέρωση της γλυκόζης καθώς και στην γλυκογονόλυση, και ο ρόλος αυτών των αναστολέων είναι να σταματήσουν την γλυκογονόλυση η οποία είναι ανεπιθύμητη [13]. Όμως, η ανθρώπινη φωσφορυλάση βρίσκεται σε 3 ισομορφές: την ηπατική, την μυϊκή και του εγκεφάλου, θέτοντας έτσι τον περιορισμό για την μελέτη αναστολέων που αναστέλλουν μόνο την ηπατική ισομορφή χωρίς να επηρεάζουν τις άλλες δύο ισομορφές [17].

Πραγματοποιούνται μελέτες σχετικά με τη δράση αναστολέων που αποτελούν ανάλογα γλυκόζης με βάση τη τρισδιάστατη δομή της ανενεργής T κατάστασης της μυϊκής ισομορφής β του ενζύμου που έχει απομονωθεί από κουνέλια και είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένη και εμφανίζει 80% ομολογία με την ανθρώπινη ισομορφή. Για τους αναστολείς αυτούς, εκτός από κινητικές μελέτες πραγματοποιούνται και δομικές μελέτες με ακτίνες X , έτσι ώστε να διαπιστωθεί το κέντρο πρόσδεσης που αλληλεπιδρά ο κάθε αναστολέας [14].

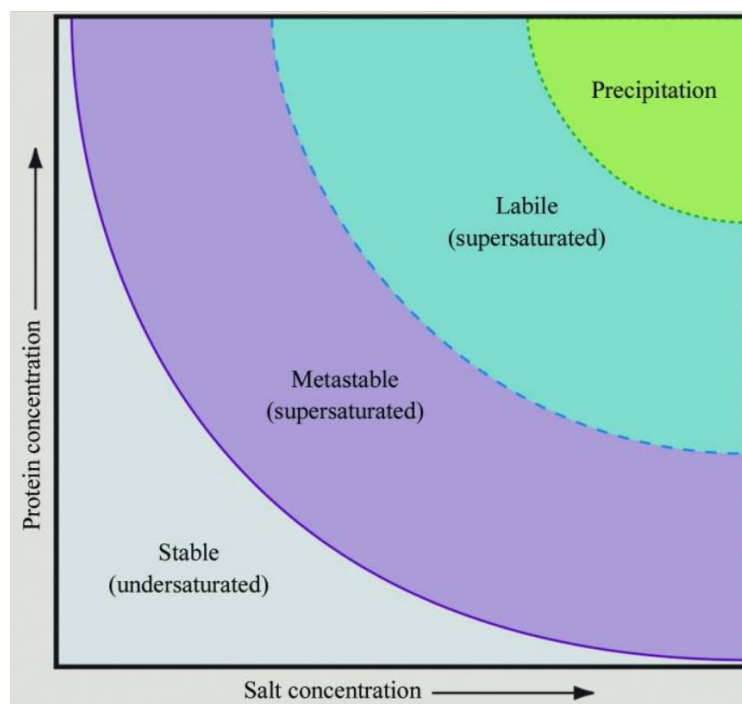
1.6.Κρυσταλλογραφία

1.6.1. Πρωτεϊνικός κρύσταλλος

Ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος περιέχει πολλά μόρια διατεταγμένα με πανομοιότυπο προσανατολισμό και αποτελεί την τρισδιάστατη συστοιχία μορίων τακτοποιημένων σε μια σταθερή και επαναλαμβανόμενη διάταξη, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις. Οι κρύσταλλοι αποτελούνται από πολλά δισεκατομμύρια μικρές πανομοιότυπες μονάδες που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και αποτελούν τη στοιχειώδη κυψελίδα. Συνεπώς, ένας κρύσταλλος αποτελείται από πολλές στοιχειώδεις κυψελίδες οι οποίες πακετάρονται η μια δίπλα στην άλλη καταλαμβάνοντας και τις 3 διαστάσεις του χώρου και η καθεμία από αυτές μπορεί να περιέχει ένα ή και περισσότερα μόρια. Ο αριθμός των μορίων που περιέχει κάθε κυψελίδα είναι σταθερός για όλες τις κυψελίδες του κρυστάλλου αλλά μπορεί να διαφέρει μεταξύ κυψελίδων από διαφορετικούς κρυστάλλους της ίδια πρωτεΐνης. Η στοιχειώδης κυψελίδα χαρακτηρίζεται από δύο παραμέτρους: τα μήκη των ακμών της κυψελίδας (a , b , c) και από τις μεταξύ τους γωνίες (α , β , γ). Συνολικά υπάρχουν 230 διαφορετικοί τρόποι για να πακεταριστούν τα μόρια σε 3 διαστάσεις και να σχηματίσουν έναν κρύσταλλο (*space groups*) καθώς επίσης υπάρχουν κρυσταλλικά συστήματα τα οποία περιλαμβάνουν όλες τις κρυσταλλικές τάξεις που παρουσιάζουν παρόμοια κύρια συμμετρία και καθορίζονται από τα 14 πλέγματα *Bravais*. Επιπλέον, η στοιχειώδης κυψελίδα χαρακτηρίζεται από την ασύμμετρη μονάδα (*unit cell*), δηλαδή την μικρότερη μονάδα που μπορεί να περιστραφεί και να μετατεθεί προκειμένου να δημιουργηθεί η στοιχειώδης κυψελίδα και χρησιμοποιεί μόνο τα στοιχεία συμμετρίας που καθορίζονται από τη συμμετρία του κρυστάλλου [19].

1.6.2. Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Οι κρύσταλλοι αναπτύσσονται σε υδατικά διαλύματα μέσω αργής και ελεγχόμενης καταβύθισης κάτω από συνθήκες που δεν είναι αποδιατακτικές για τις πρωτεΐνες. Προκειμένου να επιτευχθεί η κρυστάλλωση πρέπει τα μόρια της πρωτεΐνης να βρίσκονται σε πολύ κοντινή απόσταση μεταξύ τους έτσι ώστε να είναι σε θέση να σχηματίσουν δεσμούς μεταξύ τους και αυτό επιτυγχάνεται μόνο σε συνθήκες υπερκορεσμού του πρωτεϊνικού διαλύματος. Αρχικά πρέπει να ξεπεραστεί ένα ενεργειακό φράγμα, δηλαδή η ελεύθερη ενέργεια που είναι απαραίτητη για την δημιουργία του πυρήνα κρυστάλλωσης και στη συνέχεια η ανάπτυξη κρυστάλλων πραγματοποιείται αυθόρμητα. Παρ' όλα αυτά, όταν το πρωτεϊνικό διάλυμα βρίσκεται σε συνθήκες υπερκορεσμού, μπορεί να χαρακτηρίζεται από 3 καταστάσεις: τη μετασταθερή κατάσταση κατά την οποία δημιουργούνται κρύσταλλοι από πυρήνες που προϋπάρχουν στο διάλυμα χωρίς να δημιουργούνται όμως νέοι πυρήνες, την κατάσταση πυρήνωσης ή αλλιώς ασταθή κατάσταση όπου σχηματίζονται νέοι πυρήνες κρυστάλλωσης, καθώς επίσης και από την κατάσταση κατακρήμνισης όπου η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται ως άμορφο ίζημα το οποίο μπορεί να είναι άλας ή πολυμερές [20].



Εικόνα 9 Διάγραμμα φάσης κρυστάλλωσης. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την ισορροπία μεταξύ της στερεής φάσης (κρυστάλλωσης) της πρωτεΐνης και της φάσης ελεύθερου μορίου της πρωτεΐνης. Η περιοχή του υπερκορεσμού χωρίζεται στη μετασταθή περιοχή, τη περιοχή πυρήνωσης και την περιοχή κατακρήμνισης [20]

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι πρωτεΐνης, θα πρέπει στο διάλυμα της πρωτεΐνης να υπάρχουν συγκεκριμένοι παράγοντες κατακρήμνισης όπως άλατα, οργανικοί διαλύτες και πολυμερή ευθείας αλυσίδας, ή να μεταβληθούν ορισμένοι παράγοντες όπως το pH , η θερμοκρασία, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η ιοντική ισχύ του διαλύτη και η διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος προκειμένου να επιτευχθεί η κατάσταση υπερκορεσμού του διαλύματος [19]. Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για την ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων μερικές από τις οποίες είναι η μέθοδος *batch* και *microbatch*, η διάχυση ατμών μέσω της καθήμενης ή της

κρεμάμενης σταγόνας, η μέθοδος διαπίδυσης και η μέθοδος διάχυσης μέσω επιφανείας [20].

1.6.3. Κρυσταλλογραφία ακτίνων X

Προκειμένου να προσδιοριστεί η δομή πρωτεΐνη με τη μέθοδο κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια πηγή ακτίνων X, η οποία θα έχει υψηλή ένταση προκειμένου να είναι δυνατή η απόκτηση υψηλής ποιότητας δεδομένων από μικρούς πρωτεϊνικούς κρυστάλλους με σύντομο χρόνο έκθεσης. Παράδειγμα τέτοιας πηγής ακτίνων X αποτελεί η συγχροτρονική ακτινοβολία. Από τις ακτίνες X που προσκρούουν σε ένα πρωτεϊνικό κρύσταλλο μόνο ένα μικρό ποσοστό ~ περίπου 2% ~ αλληλεπιδρά με τον κρύσταλλο ενώ οι υπόλοιπες ακτίνες X συλλέγονται από το *beamstop* προκειμένου να μην χτυπήσουν τον ανιχνευτή και τον καταστρέψουν. Οι ακτίνες X που προσκρούουν με τον πρωτεϊνικό κρύσταλλο σκεδάζονται ή περιθλώνται από τα ηλεκτρόνια του κρυσταλλικού πλέγματος και ανιχνεύονται από έναν ανιχνευτή ως αμαυρώσεις στο περιθλασίγραμμα [10].

Κατά την κρυσταλλογραφία ακτίνων X, ο κρύσταλλος τοποθετείται σε συγκεκριμένο προσανατολισμό και απόσταση από την πηγή ακτίνων X και τον ανιχνευτή και περιστρέφεται προκειμένου οι ακτίνες X να αλληλεπιδράσουν με όλες τις διευθύνσεις του κρυστάλλου. Ως αποτέλεσμα, συλλέγεται μια «φωτογραφία» ακτίνων X στον ανιχνευτή που αποτελείται από πολλές αμαυρώσεις ή αλλιώς ανακλάσεις. Από τη θέση πρόσπτωσης των ακτίνων X στον ανιχνευτή μπορούμε να ερμηνεύσουμε τη διεύθυνση των κυμάτων των ακτίνων X, ενώ από το πόσο πολύ μαυρίζει ο ανιχνευτής σε ένα σημείο μπορεί να προσδιοριστεί η ένταση και κατά συνέπεια το πλάτος του κύματος των ακτίνων X. Προκειμένου όμως να υπολογιστεί η φάση του κύματος των ακτίνων X πρέπει να γίνουν επιπλέον υπολογισμοί, όπως ο μετασχηματισμός Fourier, ο οποίος εφαρμόζεται στην υπολογιζόμενη φάση της κάθε ανάκλασης. Το αποτέλεσμα που προκύπτει αποτελεί τον χάρτη της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, δηλαδή μια τρισδιάστατη αναπαράσταση της πυκνότητας των ηλεκτρονίων της πρωτεΐνης στο χώρο της πρωτεΐνης και είναι καταλυτική για τον προσδιορισμό της θέσης των ατόμων της πρωτεΐνης [10].

1.6.4. Βελτιστοποίηση του μοριακού μοντέλου

Η ποιότητα των κρυστάλλων που χρησιμοποιούνται για την συλλογή των δεδομένων περιθλασης και την δημιουργία του χάρτη της ηλεκτρονιακής πυκνότητας έχει καταλυτικό ρόλο στην ποιότητα του τελικού χάρτη που θα προκύψει καθώς η ποιότητα των δεδομένων δεν μπορεί να αλλάξει και το μόνο που είναι δυνατόν είναι η βελτιστοποίηση του μοριακού μοντέλου, προκειμένου να προσαρμοστεί καλύτερα στον χάρτη της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η βελτιστοποίηση αυτή γίνεται με βάση την προσαρμογή των παραγόντων δομής, όπως για παράδειγμα ο $F(S)_{calc}$ χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των φάσεων που αποτελούν εμπόδιο κατά την κρυσταλλογραφία ακτίνων X, κι ο $|F(S)_{obs}|$ που υπολογίζεται από την παρατηρούμενη ένταση.

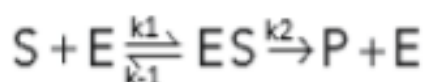
Μια άλλη παράμετρος, ο παράγοντας R ή αλλιώς δείκτης αξιοπιστίας R χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των δεδομένων και υπολογίζεται από τον τύπο:

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

Ο παράγοντας R κυμαίνεται μεταξύ 0% και 70% και όσο μικρότερη είναι η τιμή του παράγοντα αυτού τόσο καλύτερο είναι το ταίριασμα. Το ανώτατο κατώφλι για τον προσδιορισμό όσο το δυνατόν καλύτερο ταίριασμα είναι 20%, το οποίο μπορεί να επιτευχθεί μέσα από μια διαδικασία αξιολόγησης του μεγαλύτερου μέρους των πειραματικών δεδομένων (90-95%) που ονομάζονται σετ δεδομένων εργασίας με βάση το σετ δεδομένων ελέγχου που αποτελούν το υπόλοιπο 5-10% των πειραματικών δεδομένων. Κατά τη διαδικασία αυτή υπολογίζονται 2 παράγοντες R , ένας για το σετ πειραματικών δεδομένων και ένας για το σετ δεδομένων ελέγχου που ονομάζεται R_{free} . Ο δεύτερος αυτός παράγοντας, θα πρέπει να μειώνεται όσο προχωράει η βελτιστοποίηση μέχρι να φτάσει ένα πλατώ όπου η μείωση θα σταματήσει να υφίσταται, και το μοριακό μοντέλο θα έχει δεχτεί ικανοποιητική βελτιστοποίηση [21].

1.7.Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Τα ένζυμα (E) ορίζονται και ως καταλύτες των βιολογικών συστημάτων που χαρακτηρίζονται από καταλυτική ισχύ και εξειδίκευση, και έχουν ως βασικό ρόλο την επιτάχυνση των αντιδράσεων προκειμένου να ικανοποιούν τις ανάγκες του οργανισμού. Τα ένζυμα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης τόσο ως προς τα υποστρώματα (S) που συνδέονται όσο και ως προς τις αντιδράσεις που καταλύουν. Κατά την κατάλυση των αντιδράσεων από ένζυμα, αρχικά τα υποστρώματα προσδένονται στο ενεργό κέντρο των ενζύμων δημιουργώντας το σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος (ES). Σύμφωνα με τους *Leonor Michaelis* και *Maud Menten*, οι οποίοι μελετούσαν το ένζυμο ιμπερτάση, το σύμπλοκο ES που δημιουργείται είναι αναγκαίο ενδιάμεσο για την κατάλυση. Το σύμπλοκο αυτό μπορεί είτε να διασπαστεί ξανά σε E και S είτε να σχηματίσει το προϊόν P . Το μοντέλο που προτάθηκε είναι το εξής:



Όπου k_1 είναι η σταθερά ταχύτητας για τη δημιουργία του ενδιάμεσου συμπλόκου, k_{-1} είναι η σταθερά ταχύτητας για την διάσπαση του ES σε E και S ενώ k_2 είναι η σταθερά ταχύτητας για την διάσπαση του ES σε E και P [10].

Επιπλέον οι *Michaelis* και *Menten* πρότειναν ότι η ταχύτητα της αντίδρασης V_0 προσδιορίζεται για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος μετρώντας τον σχηματισμό του προϊόντος σε αρχικούς χρόνους προτού συσσωρευτεί P .

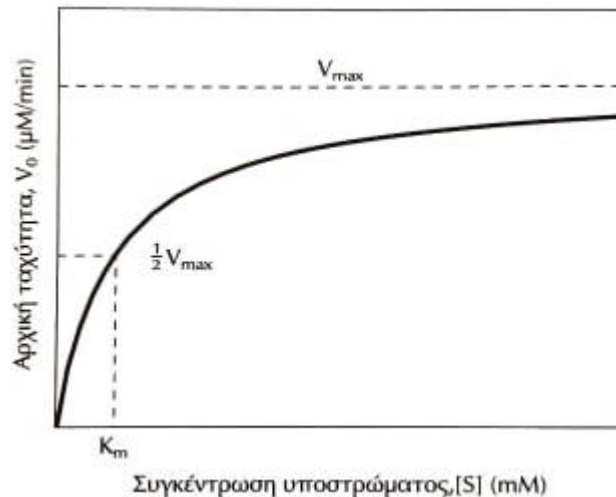
Έτσι οι *Michaelis* και *Menten* πρότειναν την εξής εξίσωση από την οποία υπολογίζεται η ταχύτητα της αντίδρασης και ονομάζεται εξίσωση *Michaelis-Menten*:

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

Όπου V αντιστοιχεί στη V_0 , V_{max} είναι η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης, $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος και K_m η σταθερά *Michaelis* η οποία ορίζεται ως

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

Ακόμη, οι *Michaelis* και *Menten* μελετώντας την ιμβερτάση, δημιούργησαν ένα διάγραμμα όπου δείχνει την επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην αρχική ταχύτητα μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης.



Εικόνα 10 Σύμφωνα με το διάγραμμα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος για την οποία ισχύει $V_0=1/2 V_{max}$ [22]

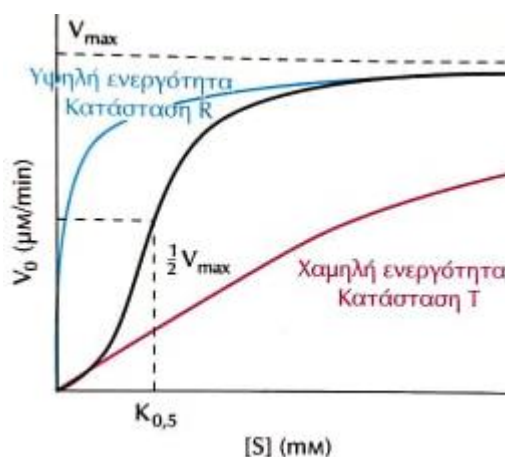
Η σταθερά K_m μπορεί να διαφέρει κατά πολύ από ένζυμο σε ένζυμο καθώς επίσης και για διαφορετικά υποστρώματα του ίδιου ενζύμου. Η σταθερά αυτή έχει μονάδες συγκέντρωσης και είναι ενδεικτική των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υποστρώματος και του ενζύμου [22].

1.7.1. Κινητικές μελέτες αλλοστερικών ενζύμων

Είναι γεγονός ότι η κινητική μελέτη που πρότειναν οι Michaelis-Menten δεν μπορεί να βρει εφαρμογή σε όλα τα ένζυμα, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση των αλλοστερικών ενζύμων. Τα αλλοστερικά ένζυμα ανήκουν στην κατηγορία των ρυθμιστικών ενζύμων και αποτελούν πρωτεΐνες με πολλαπλές υπομονάδες καθώς και σε μερικές περιπτώσεις οι ρυθμιστικές θέσεις και το ενεργό κέντρο βρίσκονται σε ξεχωριστές υπομονάδες. Τα ένζυμα αυτά δρουν ύστερα από την αντιστρεπτή, μη ομοιοπολική πρόσδεση ρυθμιστικών ενώσεων που ονομάζονται αλλοστερικοί ρυθμιστές ή τελεστές και η δράση τους μπορεί να είναι ανασταλτική ή διεγερτική. Η πρόσδεση των τελεστών συνήθως προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση οι οποίες επηρεάζουν την δραστηριότητα άλλων θέσεων πάνω στην πρωτεΐνη. Συνήθως, η πρόσδεση των τελεστών έχει ως συνέπεια την μετατροπή του ενζύμου από μια ανενεργή κατάσταση T σε μια ενεργή κατάσταση R [22].

Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν διαφορετική σχέση μεταξύ της αρχικής ταχύτητα V_0 και της συγκέντρωσης του υποστρώματος S , καθώς όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ υψηλή εμφανίζουν κορεσμό για το υπόστρωμα. Τα ένζυμα

αυτά αποδίδουν σιγμοειδή καμπύλη κορεσμού αντί για υπερβολή όπως συμβαίνει στην περίπτωση των η ρυθμιστικών ενζύμων. Όπως είναι προφανές για τα ένζυμα αυτά δεν ορίζεται τιμή της K_m παρόλο που υπάρχει τιμή της συγκέντρωσης του υποστρώματος για την οποία η ταχύτητα της αντίδρασης ισούται με το μισό της μέγιστης ταχύτητας, διότι δεν ακολουθεί την σχέση υπερβολή *Michaelis-Menten* [22]



Εικόνα 11 Σιγμοειδής καμπύλη αλλοστερικού ενζύμου. Ως $K_{0,5}$ αναφέρεται η συγκέντρωση του υποστρώματος για την οποία η ταχύτητα της αντίδρασης ισούται με το μισό της μέγιστης αντίδρασης. Στο διάγραμμα φαίνονται και οι σιγμοειδής καμπύλες για τις καταστάσεις T, R [22]

1.7.2. Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Ως αναστολείς των ενζύμων ορίζεται μοριακοί παράγοντες που παρεμβαίνουν στην κατάλυση επιβραδύνοντας ή τερματίζοντας τις αντιδράσεις που καταλύουν τα ένζυμα. Η αναστολή που προκαλούν οι αναστολείς μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Κατά την μη αντιστρεπτή αναστολή, ο αναστολέας προσδένεται ομοιοπολικά ή καταστρέφει μια λειτουργική ομάδα του ενζύμου απαραίτητη για τη λειτουργία του. Η αντιστρεπτή αναστολή μπορεί να είναι συναγωνιστική, όπου ο αναστολέας προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, ασυναγωνιστική όπου ο αναστολέας προσδένεται σε διαφορετική θέση από το ενεργό κέντρο αλλά μόνο στο σύμπλοκο *ES* και μικτή όπου ο αναστολέας πάλι προσδένεται εκτός ενεργού κέντρου αλλά είτε στο *E* είτε στο σύμπλοκο *ES*. Η μη συναγωνιστική αναστολή αποτελεί ειδική περίπτωση μικτής αναστολής καθώς παρατηρείται ταυτόχρονη σύνδεση του υποστρώματος και το αναστολέα αλλά σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης. Σε αυτή την περίπτωση αναστολής, η K_m παραμένει σταθερή ενώ η V_{max} μειώνεται.

Κατά τη συναγωνιστική αναστολή, οι αναστολείς που είναι ενώσεις που μοιάζουν με το υπόστρωμα του ενζύμου, μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο με το ένζυμο (*EI*) εμποδίζοντας έτσι τη δημιουργία του συμπλόκου *ES*, ελαττώνοντας έτσι την ταχύτητα κατάλυσης. Ως αποτέλεσμα το υπόστρωμα συναγωνίζεται τον αναστολέα στο ενεργό κέντρο. Κατά την συναγωνιστική αναστολή η V_{max} αυξάνεται ενώ η K_m παραμένει σταθερή.

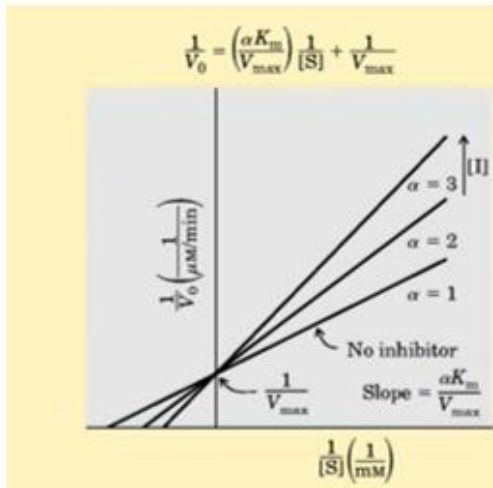


FIGURE 1 Competitive inhibition.

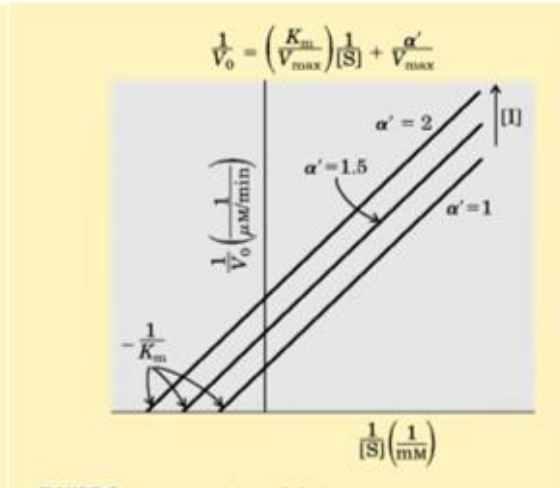


FIGURE 2 Uncompetitive inhibition.

Εικόνα 12 Διαγράμματα απεικόνισης συναγωνιστικής και μη συναγωνιστικής αναστολής.

Σκοπός

Είναι γεγονός ότι τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται εναντίον του σακχαρώδους διαβήτη σήμερα είναι ανεπαρκή στις περισσότερες περιπτώσεις. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, λόγω του ρόλου της στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και στην ομοιοστάση της γλυκόζης στο αίμα αποτελεί επικυρωμένο στόχο για τον ανακάλυψη νέων αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων για την καταπολέμηση του σακχαρώδους διαβήτη [10, 14].

Σκοπός της παρούσα πτυχιακής είναι η κινητική και δομική μελέτη της ανασταλτικής δράσης ενός αναστολέα, του B02, στην δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου η οποία έχει απομονωθεί από μύες κονίκλων (*rmGPb*).

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	Fluka
------------------------	-------

2.2. Οργανολογία

Όργανο	Εταιρία
Φυγόκεντρος	Hermle Labortechnik GmbH Hitachi
Πεχόμετρο	Metrohm
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης	Biorad
Υδατόλουτρο, Wisbath	Wisd
φωτόμετρο	VWR PerkinElmer
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Χρονόμετρο	Cell signaling technology
Αναλυτικός ζυγός	KERN
Πηγή ακτινών X	Microstar Bruker Rotating Anode
Καταγραφέας mar345dtb	marXperts GmbH
Ροή αζώτου	Oxford Cryosystems
Στερεοσκόπιο	Olympus TL2
Vortex	KISKER
Stir plate	nuova

2.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών – Πηκτή SDS (SDS-PAGE)

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών βασίζεται στην δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων σε ηλεκτρικά πεδία και δίνει την δυνατότητα διαχωρισμού των πρωτεϊνών από άλλα μακρομόρια όπως το DNA και το RNA, τη δυνατότητα προσδιορισμού του μοριακού βάρους και του φορτίου των πρωτεϊνών όπως και το χαρακτηρισμό της δομής των υπομονάδων και της καθαρότητας της πρωτεΐνης. Σύμφωνα με αυτή την τεχνική, η ταχύτητα μετακίνησης κάθε μορίου στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το φορτίο του μορίου καθώς και από τον συντελεστή τριβής και υπολογίζεται από τον τύπο:

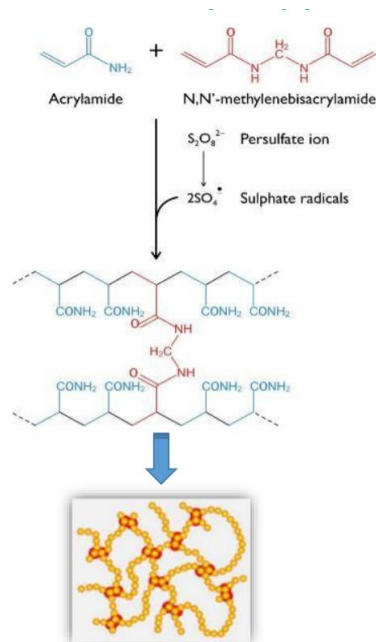
$$U = \frac{E_z}{f}$$

Όπου u είναι η ταχύτητα μετακίνησης του μορίου, E η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, z το φορτίο του μορίου και f ο συντελεστής τριβής.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πήκτωμα ακρυλαμίδης το οποίο αποτελεί ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που αποτελούν χημικά ουδέτερες ενώσεις και ενώνονται μεταξύ τους με μόρια *N-N* μεθυλενοδις-ακρυλαμίδης (*MBA*). Με βάση τη συγκέντρωση της ακρυλαμίδης και της *MBA* είναι δυνατή η ρύθμιση του μεγέθους των πόρων που θα σχηματιστούν. Το πήκτωμα ακρυλαμίδης σχηματίζεται ύστερα από τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και *MBA* σε θερμοκρασία δωματίου ε τη βοήθεια πολυμεριστικών παραγόντων όπως είναι το υπερθειικό αμμώνιο (*APS*) και το *N,N,N,N*-τετραμέθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο (*TEMED*) το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το *APS*. Ως αποτέλεσμα, σχηματίζεται ένα πλέγμα με μέγεθος πόρων το οποίο μπορεί να κυμαίνεται ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδης και της *MBA* και με τη σχετική συγκέντρωση της *MBA* ως προς την ακρυλαμίδα. Ισχύει ότι πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και αντίστροφα.

Η ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*) πραγματοποιείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης το οποίο επιτρέπει την διέλευση μικρών μορίων δια μέσου των πόρων που σχηματίζονται καθώς και την καθυστέρηση των μεγαλύτερων μορίων οι οποίες μένουν στο σημείο εκκίνησης, επιτρέποντας έτσι τον διαχωρισμό μορίων με βάση τη μάζα τους. Αρχικά, το μείγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (*SDS*) που αποτελεί ένα ανιονικό απορρυπαντικό που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Έπειτα, προστίθεται μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς και ύστερα με θέρμανση προκαλείται η αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Ακόμη, τα ανιόντα του *SDS* δημιουργούν σύμπλοκα με τις αποδιαταγμένες πρωτεΐνες προσδίδοντας τους ισχυρό αρνητικό φορτίο, πολύ μεγαλύτερο από το φορτίο που είχαν αρχικά, και συνεπώς κινούνται με κατεύθυνση προς το θετικό πόλο. Αφού ηλεκτροφορηθούν οι πρωτεΐνες, η ανίχνευσή τους μπορεί να γίνει είτε με χρώση κυανού του Coomassie, είτε με ραδιενεργή σήμανση και εμφάνισή του σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Το φόρτωμα των δειγμάτων στην ανάλογη συσκευή, γίνεται σε κατάλληλες θέσεις υποδοχής (*slots*) που δημιουργούνται σε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης με την τοποθέτηση ειδικής χτένας όσο το πήκτωμα είναι ακόμα υγρό. Η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής δηλαδή γίνεται στο πήκτωμα πακεταρίσματος (*stacking gel*) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και στο πήκτωμα διαχωρισμού (*separating ή resolving gel*). Το *stacking gel* δεν διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά τις συμπυκνώνει σε μια μικρή ζώνη εξασφαλίζοντας ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στο *separating gel*. Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (*running buffer*) και στο επάνω και στο κάτω μέρος της συσκευής σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Ύστερα, διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης αντισταθμίζοντας αλλαγές που προκαλούνται λόγω της αντίστασης που προβάλλει το υλικό [24].



Εικόνα 13 Δημιουργία της πηκτής πολυακρυλαμίδης

2.4. Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGbp)

Η μέθοδος Fisher & Krebs (*Methods in Enzymology Vol V, p. 369-373, 1962*) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε 2-μερκαπτοαιθανόλη και το ένζυμο απομονώθηκε από αρσενικούς κονίκλους *Oryzotolagus cuniculus*.

Πειραματικό Μέρος

Ημέρα 1^η

Μέρος πρώτο: Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος.

1. Απομόνωση μυϊκού ιστού από τα πόδια και τους ραχιαίους μύες των κουνελιών και τοποθέτηση σε πάγο.
2. Ομογενοποίηση του μυϊκού ιστού με την χρήση της κρεατομηχανής και ζύγισμα, και επανατοποθέτηση σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία της άλεσης.
3. Εκχύλιση του προϊόντος άλεσης με απιονισμένο νερό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές σε θερμοκρασία δωματίου και έχει ως στόχο την έξοδο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από τα ζωικά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, κατά την πρώτη εκχύλιση, ίσος όγκος κιμά και απιονισμένου νερού «ζυμώθηκαν επί 8 λεπτά» και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση με διπλή γάζα και έγινε συλλογή του τελικού ψυχρού εκχυλίσματος. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τις υπόλοιπες 2 εκχυλίσεις, και διαρκεί 10 λεπτά κάθε φορά.
4. Διήθηση του εκχυλίσματος με τη χρήση υαλοβάμβακα προκειμένου να απομακρυνθούν τα αιωρούμενα σωματίδια και τα λίπη.

Μέρος δεύτερο: Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον

5. Προσθήκη 1 N CH_3COOH για την ρύθμιση του pH του ψυχρού εκχυλίσματος σε 5.1 – 5.2.
6. Ξεκούραση του εκχυλίσματος για 5 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια τοποθέτηση του σε σωλήνες φυγοκέντρησης. Αφού ισοζυγιστούν τοποθετούνται στη φυγόκεντρο.
7. Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 4.225 *rcf* για μισή ώρα. Σκοπός της φυγοκέντρησης είναι η απομάκρυνση των πρωτεϊνών που καταβυθίστηκαν.
8. Απομάκρυνση των αιωρούμενων υλικών με διήθηση του υπερκείμενου υγρού. Για τη διήθηση χρησιμοποιείται χωνί Buchner και η διαδικασία γίνεται εν ψυχρώ.
9. Ρύθμιση του pH του πρωτεϊνικού διαλύματος που προκύπτει στο ισοηλεκτρικό σημείο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, δηλαδή στο 6,8 με τη χρήση του κεκορεσμένου διαλύματος $KHCO_3$.

Μέρος τρίτο: Καταβύθιση του ενζύμου με θειικό αμμώνιο (90 % w/v).

10. Υπολογισμός του απαιτούμενου όγκου διαλύματος θειικού αμμωνίου σύμφωνα με τη σχέση:
Όγκος διαλύματος θειικού αμμωνίου = 0.837 X όγκος εκχυλίσματος
11. Προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνής αμμωνίας για την ρύθμιση του pH του διαλύματος του θειικού αμμωνίου στο 6.8.
12. Προσθήκη του διαλύματος του θειικού αμμωνίου με αργό ρυθμό και ταυτόχρονη συνεχή ανάδευση.
13. Το μίγμα αφήνεται στον ψυκτικό θάλαμο για μια ημέρα.
14. Ψύξη 20 λίτρων απιονισμένου ύδατος προκειμένου να παρασκευαστεί το διάλυμα διαπίδυσης.

Ημέρα 2^η

1. Κόβουμε τη μεμβράνη στο επιθυμητό μήκος.
2. Ζύγισμα 6.5 g Na_2CO_3 και 2.44 g $EDTA$ για την παρασκευή διαλύματος με τελικό όγκο 650 ml.
3. Στο διάλυμα που προκύπτει τοποθετούνται τα σακουλάκια διαπίδυσης αφήνονται να βράσουν για 30 λεπτά.
4. Ακολουθεί ξέπλυμα με απιονισμένο νερό.
5. Τα σακουλάκια διαπίδυσης εισάγονται σε απιονισμένο νερό και αφήνονται να βράσουν για 30 min.
6. Στη συνέχεια ξεπλένονται και διατηρούνται σε διάλυμα (20 % v/v) αιθανόλης στους 4°C.

Στο πρωτεϊνικό διάλυμα έχουν σχηματιστεί το υπερκείμενο και το ίζημα λόγω της καταβύθισης με θειικό αμμώνιο.

1. Το υπερκείμενο αποχύνεται μέσω αντλίας.
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση θερμοκρασία 0 – 4 °C σε 5.110 *rcf* για 40 λεπτά με τη χρήση της μεγάλης κεφαλής με σκοπό τη συλλογή του ιζήματος.
3. Απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος που προκύπτει και διαλυτοποίηση του ιζήματος στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου νερού σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος *Tris* 0.001 M *pH* 7.5 με τελικό όγκο 2 λίτρα.

Αραιώση 10 ml διαλύματος *Tris* 2 M με απιονισμένο νερό σε όγκο 400 ml. Ρύθμιση του *pH* του διαλύματος στο 7.5 με τη χρήση διαλύματος 1 N *HCl*. Το διάλυμα που προκύπτει αραιώνεται σε τελικό όγκο 20 λίτρα με τη χρήση του απιονισμένου ύδατος που έχει ψυχθεί.

5. Για την απομάκρυνση του αιθανολικού διαλύματος, τα σακουλάκια διαπίδυσης πλένονται με απιονισμένο νερό.
6. Τοποθέτηση του διαλυτοποιημένου ενζύμου σε σακουλάκια διαπίδυσης και εμφύσηση σε ρυθμιστικό διάλυμα *Tris* 0.001 M, *pH* 7.5 στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύκτα.

Ημέρα 3^η

Μέρος πρώτο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

1. Μετά τη διαπίδυση το πρωτεϊνικό διάλυμα συλλέγεται σε ογκομετρικό κύλινδρο.
2. Φυγοκέντρηση του πρωτεϊνικού διαλύματος στις 34.540 *rcf* για 15 λεπτά (0 – 4 °C).
3. Ογκομέτρηση του υπερκείμενου υγρού
4. Προσθήκη ποσότητας διαλύματος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης *pH* 7.0 η οποία υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{2-μερκαπτοαιθανόλης} = \text{πρωτεϊνικός όγκος} \times 3/27$$

5. Προσθήκη ποσότητας διαλύματος *EDTA* 0.1 M, *pH* 7.0 η οποία υπολογίζεται από τον τύπο:

EDTA = πρωτεϊνικός όγκος που προκύπτει μετά την προσθήκη του διαλύματος 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλης $\times 5/1000$

6. 2 M *Tris* διάλυμα προστίθεται αργά και υπό ανάδευση στο πρωτεϊνικό διάλυμα έτσι ώστε το *pH* να πάρει την τιμή 8.8.
7. Επώαση του μίγματος στους 37 °C για μια ώρα. Ταυτόχρονα γίνεται ήπια ανάδευση.
8. Το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και το *pH* (περίπου 10-15 min) ρυθμίζεται σε τιμή 7.0 με τη χρήση διαλύματος *CH₃COOH* 1 N.
9. Φυγοκέντρηση του πρωτεϊνικού διαλύματος σε 34.540 *rcf* για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 25-30 °C.

Μέρος δεύτερο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β

10. Ογκομέτρηση του υπερκείμενου ενζυμικού διαλύματος.

11. Προθήκη ποσότητας διαλύματος AMP 0.1 M με pH 7.0 η οποία υπολογίζεται από τον τύπο:

Όγκος AMP = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100

12. Προσθήκη ποσότητας διαλύματος $(CH_3COO)_2Mg$ pH 7.0 η οποία υπολογίζεται από τον τύπο:

Όγκος $(CH_3COO)_2Mg$ = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100

13. Τοποθέτηση του διαλύματος σε μικρά *tubes* φυγοκέντρησης τα οποία πρέπει να ισοζυγιστούν. Έπειτα αφήνονται μέσα σε πάγο και τοποθετούνται στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύχτα προκειμένου η πρωτεΐνη να κρυσταλλωθεί.

Ημέρα 4^η

1. Συλλογή των κρυστάλλων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με φυγοκέντρηση σε 28.710 *ref* και σε θερμοκρασία 0 – 4 °C για 10 λεπτά. Η φυγοκέντρηση γίνεται με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

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

3. Διαλυτοποίηση του κρυσταλλικού ιζήματος με την χρήση του ελάχιστου δυνατού όγκου ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 (pH 6.8) και σε θερμοκρασία 30 °C η οποία επιτυγχάνεται εντός του υδατόλουτρου.

4. Φυγοκέντρηση του ενζυμικού διαλύματος σε 28.710 *ref* για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 25-30 °C με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

5. Ογκομέτρηση του υπερκείμενου ενζυμικού υγρού.

6. Προσθήκη ποσότητας διαλύματος AMP 0.1 M, pH 7.0 η οποία υπολογίζεται από τον τύπο:

Όγκος AMP = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100

7. Προσθήκη ποσότητας διαλύματος $(CH_3COO)_2Mg$, pH 7.0 η οποία υπολογίζεται από τον τύπο:

Όγκος $(CH_3COO)_2Mg$ = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100

8. Τοποθέτηση του διαλύματος σε μικρά *tubes* φυγοκέντρησης τα οποία πρέπει να ισοζυγιστούν. Έπειτα αφήνονται μέσα σε πάγο και τοποθετούνται στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 ώρες προκειμένου η πρωτεΐνη να ανακρυσταλλωθεί.

Επανάληψη της διαδικασίας αυτής αφού περάσει το χρονικό διάστημα των 3-4 ωρών και στην συνέχεια το δείγμα τοποθετείται για μια νύχτα στον ψυκτικό θάλαμο.

Ημέρα 5^η

1. Επανάληψη της διαδικασίας της τέταρτης ημέρας.
2. Επανάληψη της προηγούμενης διαδικασίας της παραπάνω διαδικασίας για δυο ακόμα φορές χωρίς την προσθήκη *AMP* και $(CH_3COO)_2Mg$.
3. Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης β σε μήκη κύματος 280nm και 260 nm. Ο προσδιορισμός γίνεται με την προσθήκη 10 μL ενζυμικού διαλύματος και 2500 μL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1.

Η συγκέντρωση του ενζυμικού διαλύματος προσδιορίζεται από τη σχέση:

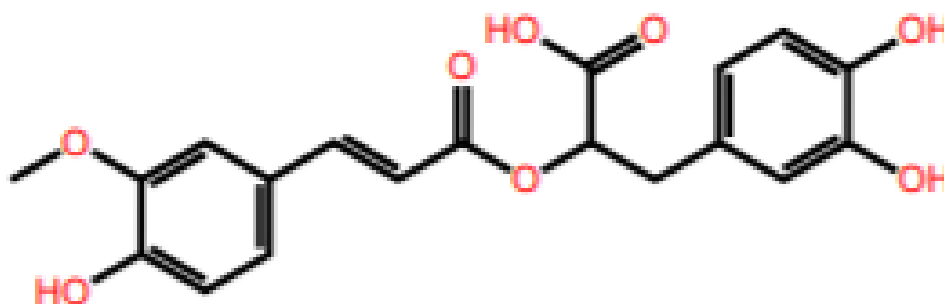
$$(OD\ 280/1.32) \times (2510/10) = [GPb],\ mg/Ml$$

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

5. Ογκομέτρηση του ενζυμικού διαλύματος και προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος γλυκερόλης 100% και φυλάσσεται στους $-20^\circ C$.

2.5.Κινητικές μελέτες έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει αμφίδρομη αντίδραση αλλά στις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* μελετήθηκε η αντίστροφη αντίδραση δηλαδή η αντίδραση που οδηγεί στη σύνθεση του γλυκογόνου από την 1-φωσφορική γλυκόζη καθώς και στην απελευθέρωση ιόντων φωσφορικών τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά και στη συνέχεια να ποσοτικοποιηθούν. Στο εργαστήριο μελετήθηκε αναστολέας ο οποίος σχεδιάστηκε με βάση την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου να στοχεύσει το αλλοστερικό του κέντρο και έχει τη δομή [25] :



Εικόνα 14 Χημική δομή του αναστολέα B02

2.6.Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου

Με βάση τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των φωσφορικών ιόντων που παράγονται κατά την αντίστροφη αντίδραση υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός των φωσφορικών ιόντων έγινε με τη

βοήθεια ενός χρωμοφόρου συμπλόκου το οποίο σχηματίζεται μεταξύ των φωσφορικών ιόντων και του μολυβδαινικού αμμωνίου παρουσία ιόντων ψευδαργύρου και σε pH=5. Το χρωμοφόρο σύμπλοκο το οποίο δημιουργείται ύστερα από την αναγωγή παρουσία ασκορβικού οξέος απορροφά σε μήκος κύματος 850 nm.

Παρασκευάστηκαν δυο διαλύματα:

- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% w/v, pH=5. (Το pH ρυθμίζεται με την χρήση πυκνού υδροξειδίου του νατρίου και η συντήρησή του γίνεται σε αδιαφανές μπουκάλι).
- Διάλυμα 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου και 100 mM οξικού ψευδαργύρου, pH=5. (Η ρύθμιση του pH γίνεται με την χρήση πυκνού υδροχλωρίου και το διάλυμα συντηρείται σε αδιαφανές μπουκάλι).

Εφόσον έχουν παρασκευαστεί και τα 2 διαλύματα, ακολουθεί ανάμιξή τους σε αναλογία 4 (διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου και οξικού ψευδαργύρου) προς 1 (διάλυμα ασκορβικού οξέος) και το μίγμα που προκύπτει αφήνεται να επωαστεί για 15 λεπτά προκειμένου να είναι ορατή η δημιουργία της έγχρωμης ένωσης. Έπειτα σε κάθε δείγμα ενζυμικού διαλύματος προστίθεται 700 μL του διαλύματος φωτομέτρησης που προέκυψε και τα δείγματα αφήνονται για επώαση στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15 λεπτά προκειμένου να σχηματιστεί το χρωμοφόρο σύμπλοκο. Ύστερα ακολουθεί φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των φωσφορικών ιόντων με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στο τυφλό δείγμα προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σαν πρότυπο για τον υπολογισμό της ποσότητας των φωσφορικών ιόντων στα δείγματα των ενζυμικών διαλυμάτων [26].

2.7. Ενζυμικό διάλυμα

Προκειμένου να διεξαχθούν τα κινητικά πειράματα για την ισομορφή β της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου η οποία έχει απομονωθεί από σκελετικούς μύες κονίκλων (*rmGPb*), παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα το οποίο έχει συγκέντρωση 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και όγκο 240 μL . Η συγκέντρωση του ενζύμου είναι 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ προκειμένου στον όγκο αντίδρασης 180 μL να έχει τελική συγκέντρωση 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Το ενζυμικό διάλυμα περιέχει επίσης γλυκογόνο και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1. Οι αναλογίες για κάθε συστατικό φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

<i>rmGPb</i>	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Γλυκογόνο 10% w/v, 24 μL	Γλυκογόνο 1% (w/v)
50:50:1, 12 μL	2,5:2,5:0,05
<i>rmGPb</i> $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8.6 μL	<i>rmGPb</i> 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
dH2O 195.4 μL	
V_{τελ}=240 μL	

Αφού παρασκευαστεί το ενζυμικό διάλυμα αφήνεται στο υδατόλουτρο για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 30 °C. Με τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται σύνδεση του ενζύμου με το γλυκογόνο.

2.8. Υποστρώματα

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στην παρούσα πτυχιακή μελετάται η αντίστροφη πορεία που καταλύεται από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου στην οποία το ένζυμο χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα την α -D-1-φωσφορική γλυκόζη.

Πρώτον παρασκευάζεται διάλυμα Assay Buffer 1 το οποίο περιέχει:

400 mM *KCl*

200 mM ιμιδαζόλιο

4 mM *DTT*

4 Mm *EDTA*

Από το Assay Buffer 1 μέσω αραιώσης προκύπτει το Assay Buffer 2 στο οποίο βρίσκονται οι διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος που θα χρησιμοποιηθούν κατά το πείραμα και περιέχει:

270 mM *KCl*

135 mM ιμιδαζόλιο

2,7 mM *DTT*

2,7 mM *EDTA*

Για την αντίδραση χρησιμοποιούνται υποστρώματα της 1- φωσφορικής γλυκόζης με διαφορετικές συγκεντρώσεις τα οποία προκύπτουν από πολλά αρχικά πυκνά υδατικά διαλύματα 1-φωσφορικής γλυκόζης με συγκέντρωση 400 mM, όγκο 500 μ L και $pH=6.8$ τα οποία συντηρούνται στους -20° C. Από το stock των 400 mM παρασκευάζουμε διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης με συγκέντρωση 90 mM το οποίο είναι διαλυμένο σε Assay buffer 2.

Ύστερα από το διάλυμα με συγκέντρωση 90 mM που προκύπτει με την κατάλληλη αραιώση κάθε φορά παρασκευάζονται διαλύματα 1-φωσφορικής γλυκόζης με συγκεντρώσεις 9 mM, 13.5 mM, 18 mM, 27 mM και 45 mM. Η αραιώση των διαλυμάτων διεξάγεται κάθε φορά με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας Assay Buffer 2. Στα υποστρώματα που θα χρησιμοποιηθούν κατά την αντίδραση, η 1 φωσφορική γλυκόζη θα βρίσκεται σε συγκεντρώσει 2, 3, 4, 6, και 10

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	Συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στα 180 μ L της αντίδρασης
1-φωσφορική γλυκόζη 90 mM	1-φωσφορική γλυκόζη 45 mM	1-φωσφορική γλυκόζη 10 mM
1-φωσφορική γλυκόζη 90 mM	1-φωσφορική γλυκόζη 27 mM	1-φωσφορική γλυκόζη 6 mM
1-φωσφορική γλυκόζη 90 mM	1-φωσφορική γλυκόζη 18 mM	1-φωσφορική γλυκόζη 4 mM
1-φωσφορική γλυκόζη	1-φωσφορική γλυκόζη	1-φωσφορική γλυκόζη 3

90 mM	13.5 mM	mM
1-φωσφορική γλυκόζη 90 mM	1-φωσφορική γλυκόζη 9 mM	1-φωσφορική γλυκόζη 2 mM

Αφού παρασκευαστούν τα υποστρώματα, επωάζονται για 3 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 30 °C.

2.9. Προσδιορισμός K_m

Προκειμένου να προσδιοριστεί η K_m ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Από το ενζυμικό διάλυμα αφαιρέθηκαν 36 μL και προστέθηκαν στο πρώτο υπόστρωμα 1-φωσφορικής γλυκόζης το οποίο είχε όγκο 180 μL . Αυτή η χρονική στιγμή ορίζεται ως $t=0$ και θεωρείται ότι στο πρώτο υπόστρωμα το οποίο πλέον έχει όγκο 180 μL έχει ξεκινήσει η ενζυμική αντίδραση. Ύστερα από το μίγμα της αντίδρασης αφαιρέθηκαν 40 μL στις χρονικές στιγμές $t=1, t=2, t=3, t=4 \text{ min}$ δηλαδή ανά 1 λεπτό και κάθε φορά προσθέτονταν σε 10 μL SDS 1% (w/v) προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση και ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση με vortex. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα υπόλοιπα υποστρώματα. Με το πέρας αυτής της διαδικασίας, τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να φωτομετρηθούν έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των φωσφορικών ιόντων. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν και τα τυφλά:

Τυφλό H₂O	10 μL SDS 1% (w/v) + 40 μL dH ₂ O
Τυφλό ενζυμικού διαλύματος	10 μL SDS 1% (w/v) + 32 μL dH ₂ O + 8 μL ενζυμικού διαλύματος
Τυφλό 1-φωσφορικής γλυκόζης	10 μL SDS 1% (w/v) + 31.1 μL dH ₂ O + 8.9 μL διαλύματος 1φωσφορικής γλυκόζης με συγκέντρωση 45 mM
Τυφλό φωσφορικών ιόντων	10 μL SDS 1% (w/v) + 30 μL dH ₂ O + 10 μL διαλύματος Pi συγκέντρωσης 1 mM

Επίσης, πραγματοποιήθηκε και ο προσδιορισμός της K_a ως προς την AMP. Στην προκειμένη περίπτωση όμως χρησιμοποιήθηκε ένα υπόστρωμα 1-φωσφορικής γλυκόζης το οποίο είχε συγκέντρωση 45 mM και στην αντίδραση μετά την προσθήκη 40 μL ενζυμικού διαλύματος είχε τελική συγκέντρωση 10 mM, ενώ χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις AMP οι οποίες παρασκευάστηκαν από ένα αρχικό διάλυμα AMP με συγκέντρωση 100 mM. Από το αρχικό διάλυμα προκύπτουν 6 διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις AMP από τα οποία αν προστεθούν 7,2 μL στον όγκο αντίδρασης (180 μL) να προκύψουν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις.

Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	[AMP] στην αντίδραση
Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 25 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 1000 μ M
Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 5 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 200 μ M
Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 2.5 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 μ M
Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 1.25 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 50 μ M
Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 0.75 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 30 μ M
Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 100 mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 0.5mM	Διάλυμα AMP συγκέντρωσης 20 μ M

Ακόμη στα υποστρώματα προστίθεται και 3,6 μ L DMSO προκειμένου στην αντίδραση τελικά να έχει συγκέντρωση 2% v/v. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω.

2.10. Προσδιορισμός της K_a^{app}

Και σε αυτή την περίπτωση ακολουθείται η ίδια ακριβώς διαδικασία με τον προσδιορισμό της K_a ως προς AMP αλλά αυτή τη φορά έγινε με την προσθήκη του αναστολέα B02 ο οποίος ήταν διαλυμένος σε DMSO. Η K_a^{app} προσδιορίστηκε για τις συγκεντρώσεις αναστολέα 10,20, 40, 60 και 70 μ M και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Υποστρώματα	A	B	Γ	Δ	E	ΣΤ
G1P (45mM)	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L
dH2O	93.2 μ L	93.2 μ L	93.2 μ L	93.2 μ L	93.2 μ L	93.2 μ L
Αναστολέας (DMSO)	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L
AMP (από stock mM)	7.2 μ L (25 mM)	7.2 μ L (5 mM)	7.2 μ L (2.5 mM)	7.2 μ L (1.25 mM)	7.2 μ L (0.75 mM)	7.2 μ L (0.5 mM)
τελικό	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L	144 μ L

2.11. Προσδιορισμός K_i

Για τον προσδιορισμό της K_i χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα της K_a^{app} για τις ίδιες συγκεντρώσεις αναστολέα: 10,20, 40, 60 και 70 μ M.

2.12. Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Με βάση το υπολογιστικό πρόγραμμα *GraFit* έγινε η ανάλυση των κινητικών δεδομένων καθώς και η δημιουργία των απαραίτητων διαγραμμάτων, έτσι ώστε να προσδιοριστούν οι κινητικές παράμετροι K_m , V_{max} και K_i . Αρχικά, υπολογίστηκε η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ως προς τις συγκεντρώσεις υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή υπολογίστηκαν πόσα $\mu moles$ υποστρώματος καταναλώνονται ή αντίστοιχα πόσα $\mu moles$ προϊόντος παράγονται στη μονάδα του χρόνου για κάθε mg ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε. Η ειδική δραστηριότητα έχει μονάδες μέτρησης $\mu mol/min/mg$. Ο υπολογισμός αυτός έγινε με βάση την ποσότητα φωσφορικών ιόντων σε μmol που παράγονταν σε κάθε ενζυμική αντίδραση. Για περαιτέρω διευκόλυνση του υπολογισμού αυτού, παρασκευάστηκε ένα πρότυπο «τυφλό» διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης $0,25 mM$ που αντιστοιχεί σε $0,01 \mu moles$ φωσφορικών ιόντων, καθώς το διάλυμα είχε όγκο $40 \mu L$.

Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση των φωσφορικών σε κάθε δείγμα εφαρμόστηκε η εξής σχέση:

$$A - Abs^1 - Abs^2 = Abs^3$$

Όπου:

A: απορρόφηση δείγματος

Abs1: απορρόφηση τυφλού ενζυμικού διαλύματος

Abs2: απορρόφηση τυφλού 1-φωσφορικής γλυκόζης

Abs3: απορρόφηση φωσφορικών του δείγματος

Έστω ότι η απορρόφηση του τυφλού διαλύματος των φωσφορικών δίνει απορρόφηση B τότε η ποσότητα των φωσφορικών στο δείγμα υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\frac{A}{B \times 100}$$

Η ειδική δραστηριότητα υπολογίζεται βάση μιας μη γραμμικής εξίσωσης που εξαρτάται από το ανώτατο όριο υδρόλυσης και τον συντελεστή f . Πιο συγκεκριμένα:

$$\text{Ανώτατο όριο υδρόλυσης} = 0,78 * [1\text{-φωσφορικής γλυκόζης}] * \text{assay volume}$$

Όπου $0,78$ δηλώνει ότι το 78% της 1-φωσφορικής γλυκόζης έχει καταναλωθεί όταν η αντίδραση έχει φτάσει σε ισορροπία και οδηγεί στην παραγωγή των φωσφορικών ιόντων και ο όρος *assay volume* αντιπροσωπεύει τον όγκο που χρησιμοποιήθηκε για να σταματήσει η αντίδραση. Στην προκειμένη περίπτωση αντιστοιχεί σε $40 \mu L$.

Ο συντελεστής f ορίζεται ως:

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

Όπου c είναι η συγκέντρωση του ενζύμου που ισούται με $3 \mu g/ml$.

Ακόμη, οι σταθερές K_m και K_a^{app} υπολογίστηκαν ως εξής:

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

Όπου:

v : η ταχύτητα

V_{max} : η μέγιστη ταχύτητα

$[S]$: η συγκέντρωση του υποστρώματος

K_m : η σταθερά *Michaelis-Menten*

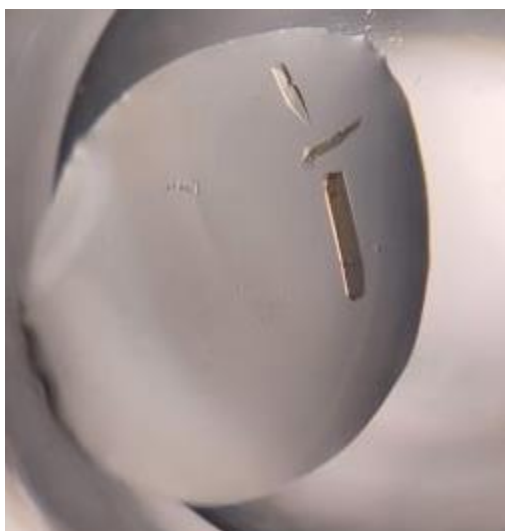
Επίσης, για τον υπολογισμό των σταθερών των K_m και K_a^{app} δημιουργήθηκε το

διάγραμμα διπλού αντιστρόφου Lineweaver-Burk καθώς και η καμπύλη (*no linear fit*) $V=f([S])$. Έπειτα ακολούθησε ο υπολογισμός της σταθεράς K_i η οποία έγινε από το διάγραμμα που στον yy' άξονα είχε τις τιμές των K_a^{app} ενώ στον xx' είχε τις συγκεντρώσεις του αναστολέα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις κινητικές μελέτες και με τη χρήση της γραμμικής εξίσωσης (*linear fit*). Πιο συγκεκριμένα, η σταθερά K_i υπολογίστηκε από το σημείο τομής του άξονα xx' με την ευθεία η οποία ήταν της μορφής $y=ax+b$. Το σημείο αυτό αντιπροσωπεύει την τιμή $-K_i$.

2.13. Κρυσταλλογραφικές Μελέτες

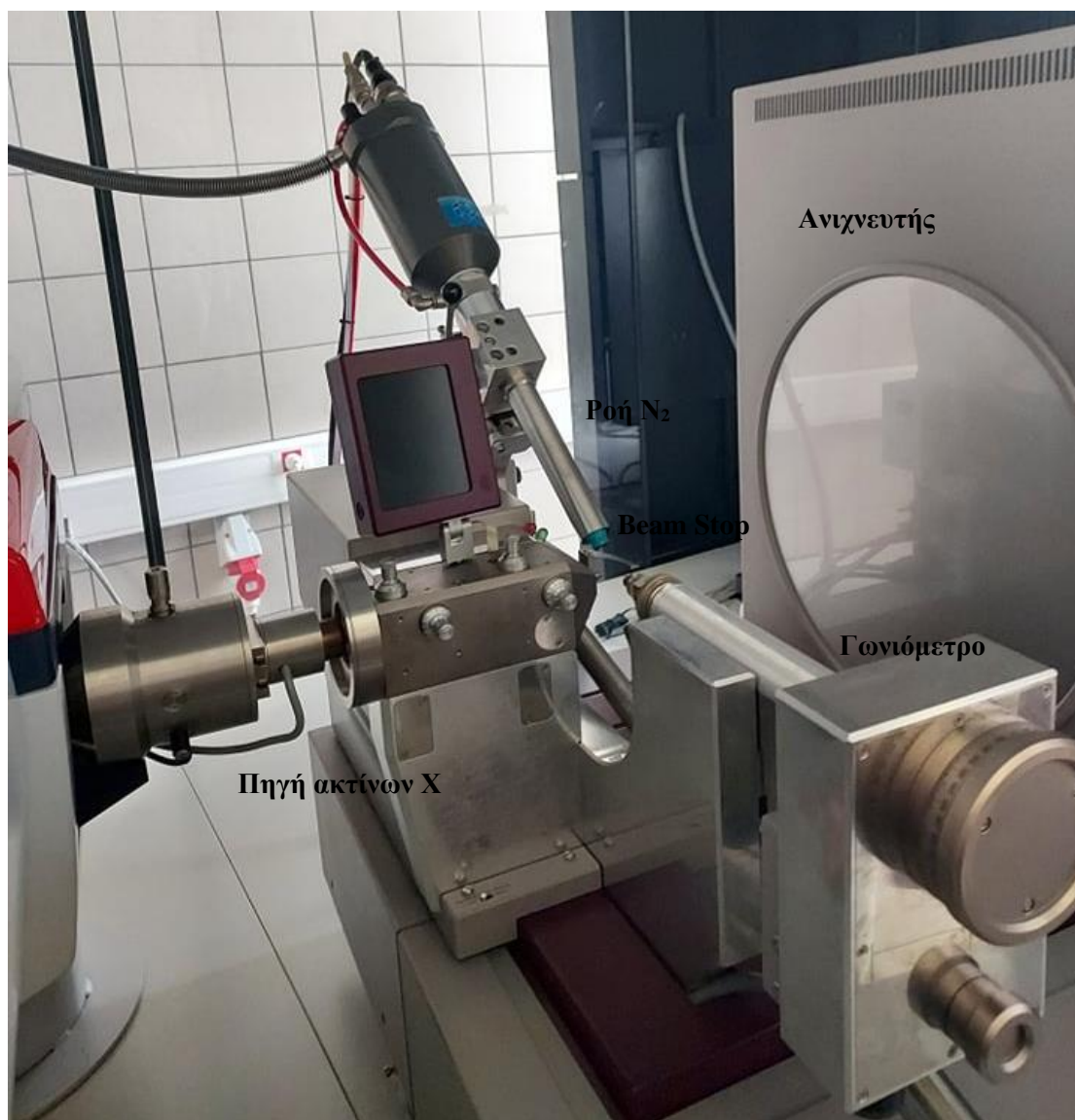
2.13.1. Συλλογή και ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η ανάλυση του τρόπου σύνδεσης των αναστολέων έγινε με τη χρήση των κρυστάλλων που αναπτύχθηκαν στους οποίους η φωσφορυλάση του γλυκογόνου βρισκόταν στην κατάσταση T και στην ισομορφή β. Πιο συγκεκριμένα, οι κρύσταλλοι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα το οποίο περιείχε 10 mM BES (pH=6,7), 30% (v/v) DMSO και τον αναστολέα B02 σε συγκέντρωση 15 mM. Η διαδικασία διήρκησε 3 ημέρες και πραγματοποιήθηκε στους 16 °C.



Εικόνα 15 Κρύσταλλοι της φωσφορύλασης τους γλυκογόνου (tmGPb)

Αφού αναπτύχθηκαν οι κρύσταλλοι, προκειμένου να προσδιοριστεί η θέση πρόσδεσης και ο τρόπος σύνδεσης του αναστολέα ακολούθησε η κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Αρχικά, ο κρύσταλλος που επρόκειτο να μελετηθεί, τοποθετήθηκε σε βρόχο και έπειτα σε γωνιόμετρο προκειμένου στη συνέχεια να μεταφερθεί σε μια κατάλληλη εσοχή η οποία βρισκόταν ανάμεσα στην πηγή της ακτινοβολίας και στον ανιχνευτή. Ακολούθησε η ευθυγράμμιση του κρυστάλλου με τη διεύθυνση της δέσμης της ακτινοβολίας η οποία έγινε μέσω της ρύθμισης του γωνιομέτρου έτσι ώστε να εξασφαλισθεί ότι οι ακτίνες X προσπίπτουν στον κρύσταλλο. Μέσω του ανιχνευτή γίνεται ο προσδιορισμός της έντασης της περιθλώμενης ακτινοβολίας και έτσι είναι δυνατή η δημιουργία του διαγράμματος περίθλασης. Επειδή όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 100K με τη χρήση αερίου αζώτου ήταν απαραίτητη η χρήση κρυπροστατευτικού διαλύματος, έτσι ώστε ο κρύσταλλος να μην καταστραφεί. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας μέσω κατάλληλων λογισμικών προγραμμάτων που επεξεργάζονται τα δεδομένα από το διάγραμμα περίθλασης [27].



Εικόνα 16 Διάταξη συστήματος συλλογής κρυσταλλογραφικών δεδομένων

2.13.2. Βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου

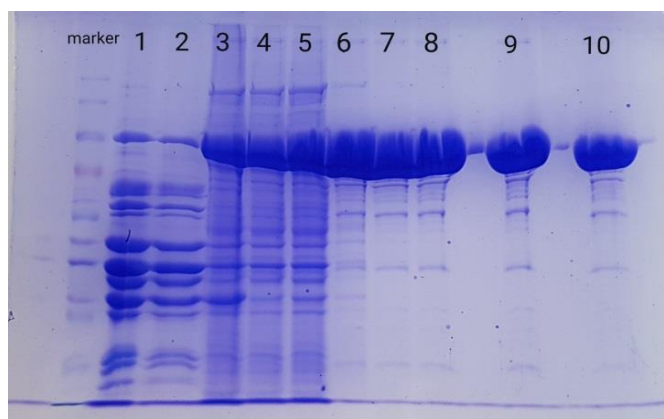
Για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και του προσδεδεμένου αναστολέα, χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο η φυσική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (κατάσταση T) (PDB id 7P7D), και το πρόγραμμα *REFMAC* [28,29] το οποίο αποτελεί ένα πρόγραμμα που βρίσκεται στη λίστα προγραμμάτων *CCP4* [30]. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε πολλούς αριθμούς επαναλήψεων χειροκίνητης διόρθωσης με το πρόγραμμα *COOT* [31,32] και βελτιστοποίησης με το πρόγραμμα *REFMAC* [28,29] προκειμένου να διορθωθεί το προτεινόμενο μοντέλο καθώς και να γίνει η προσθήκη μορίων ύδατος τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο καθώς δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με την πρωτεΐνη. Ακόμη προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η δομή έγινε κατασκευή της τρισδιάστατης δομής του μοντέλου του αναστολέα με τη βοήθεια του προγράμματος *Ligand builder* μέσω του προγράμματος *COOT*, καθώς και η βελτιστοποίηση των

ισοτροπικών παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων. Η θέση πρόσδεσης του αναστολέα γίνεται μέσω του υπολογισμού των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας $F_{obs}-F_{calc}$ και $2F_{obs}-F_{calc}$ και στο μοντέλο που προκύπτει στο οποίο φαίνεται και η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του αναστολέα, γίνεται επιπλέον βελτιστοποίηση μέσω των προγραμμάτων του CCP4. Στην δομή που προκύπτει, με τη χρήση του προγράμματος CONTACT που εντοπίζεται στη λίστα προγραμμάτων του CCP4 προσδιορίζονται οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals (έως 4 Å) και οι δεσμοί υδρογόνου (έως 3,35 Å) οι οποίοι δημιουργούνται μεταξύ του αναστολέα και των αμινοξέων της δομής. Η απεικόνιση των τρισδιάστατων εικόνων έγινε μέσω της χρήσης του προγράμματος CCP4 Molecular Graphics (mg) [33].

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Απομόνωση και καθαρισμός της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κόνικλους

Για την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου χρειάστηκαν 3 κόνικλοι. Η καθαρότητα και η ποσότητα που απομονώθηκε σε κάθε στάδιο της μεθόδου που ακολουθήθηκε, αναλύθηκε με βάση την πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10% (w/v) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η πηκτή αυτή παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα. Η συνολική απόδοση είναι 1,125 mg φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ανά 2,7 kg σκελετικού μυός ή 0,417 mg ανά 1 kg σκελετικού μυός.

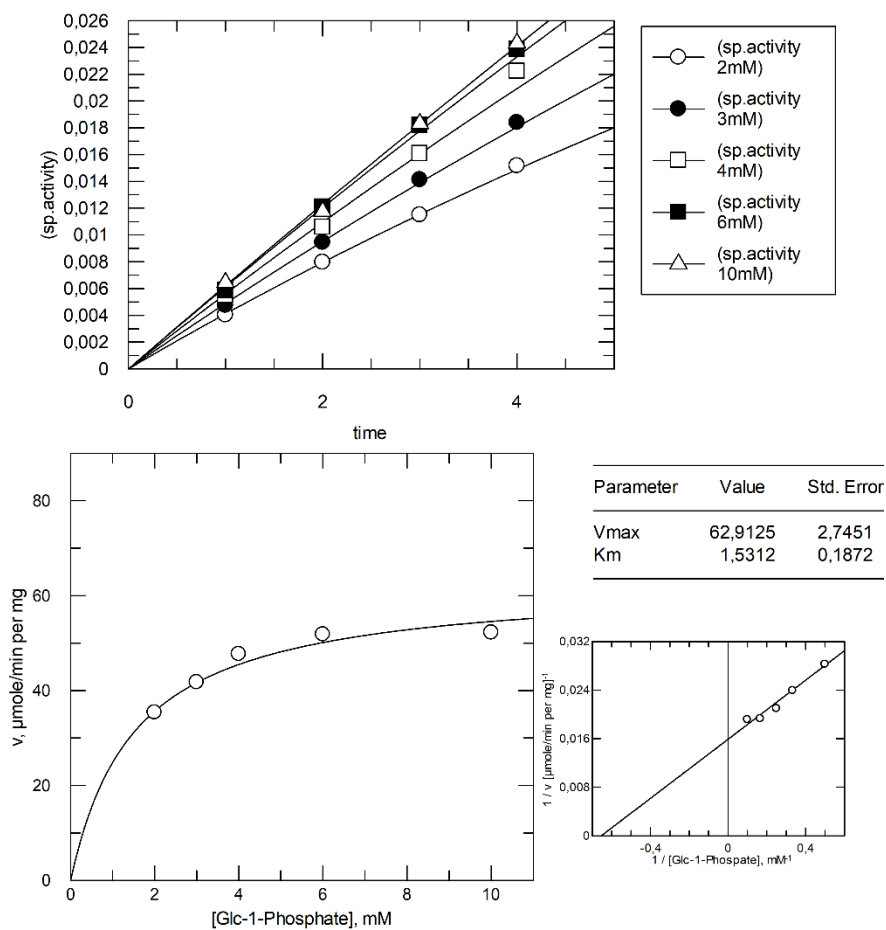


Εικόνα 17 Η πρώτη στήλη αντιστοιχεί στο δείγμα που απομονώθηκε πριν την προσθήκη αμμωνίου μετά την καταβύθιση σε όξινο περιβάλλον και πριν τη ρύθμιση του pH. Η δεύτερη στήλη αντιστοιχεί στο δείγμα μετά την προσθήκη θειικού αμμωνίου ενώ η τρίτη μετά τη διαπίδυση mM Tris-HCl (pH=7.5). Το δείγμα μετά την διαύγαση αντιστοιχεί στη 4^η στήλη και η 5^η στήλη αντιπροσωπεύει το δείγμα μετά την 1^η κρυστάλλωση. Οι στήλες 6 έως 10 αντιστοιχούν στις ανακρυσταλλώσεις 1 έως 5.

3.2. Κινητικές μελέτες

3.2.1. Προσδιορισμός της K_m της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς τη συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης.

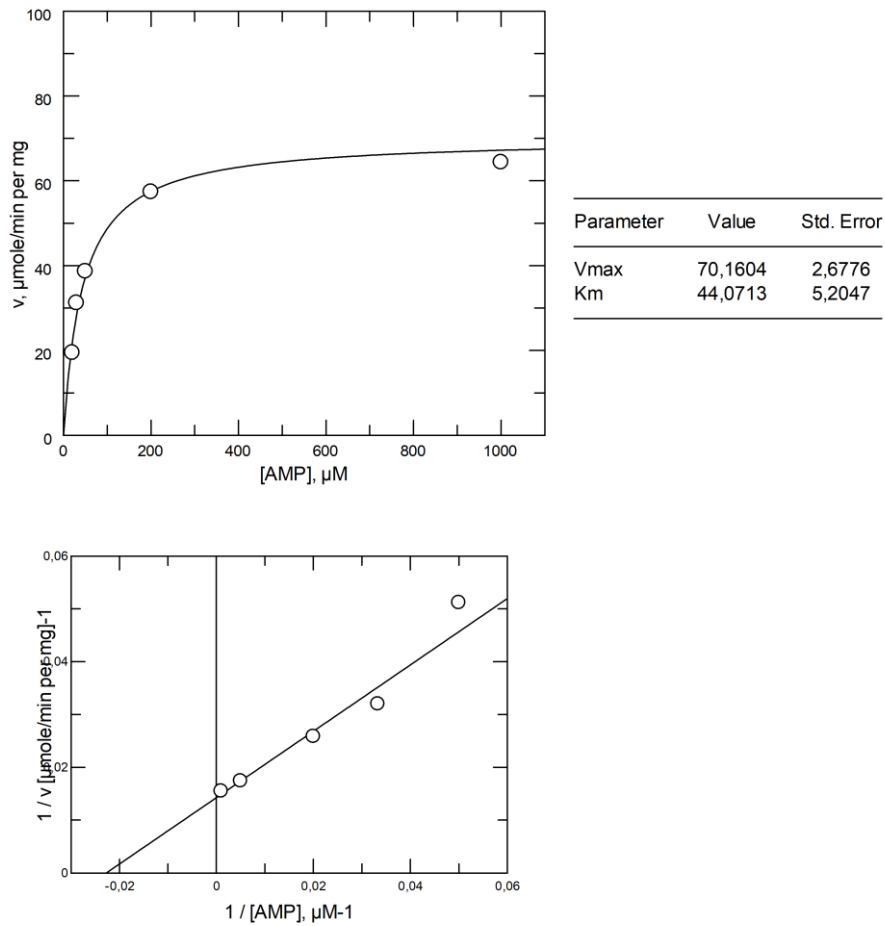
Η K_m της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς τη συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης είναι $1,53 \text{ mM} \pm 0,19$ όπως φαίνεται και στα παρακάτω διαγράμματα.



Εικόνα 18 Διαγράμματα Michaelis Menten, Lineweaver-Burk και specific activity για τον προσδιορισμό της K_m ως προς τη συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης.

3.2.2. Προσδιορισμός της K_a της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς τη συγκέντρωση AMP

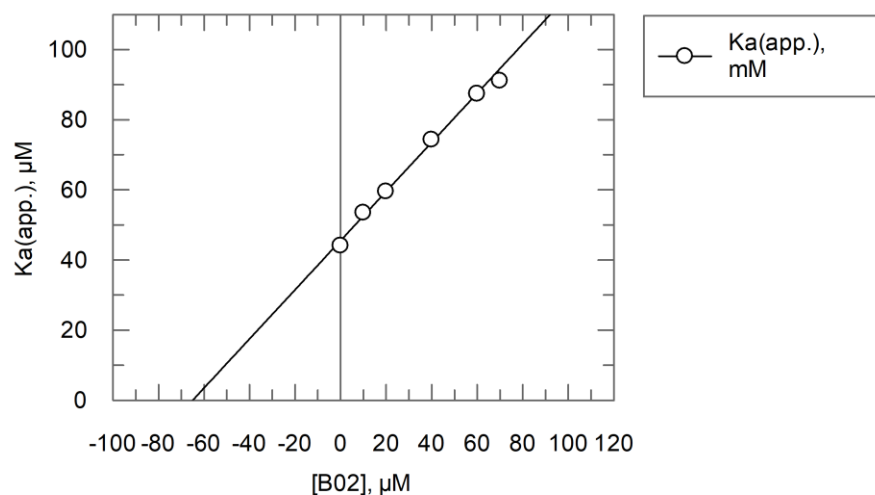
Η K_a της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως προς τη συγκέντρωση της AMP είναι $44,07 \text{ mM} \pm 5,20$ όπως φαίνεται και στα παρακάτω διαγράμματα.



Εικόνα 19 Διαγράμματα Michaelis Menten και Lineweaver-Burk για τον προσδιορισμό της K_m ως προς τη συγκέντρωση της AMP.

3.2.3. Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα B02

Η K_i του αναστολέα B02 είναι $65.02 \pm 2,39 \mu\text{M}$.



Εικόνα 20 Διάγραμμα υπολογισμού K_i

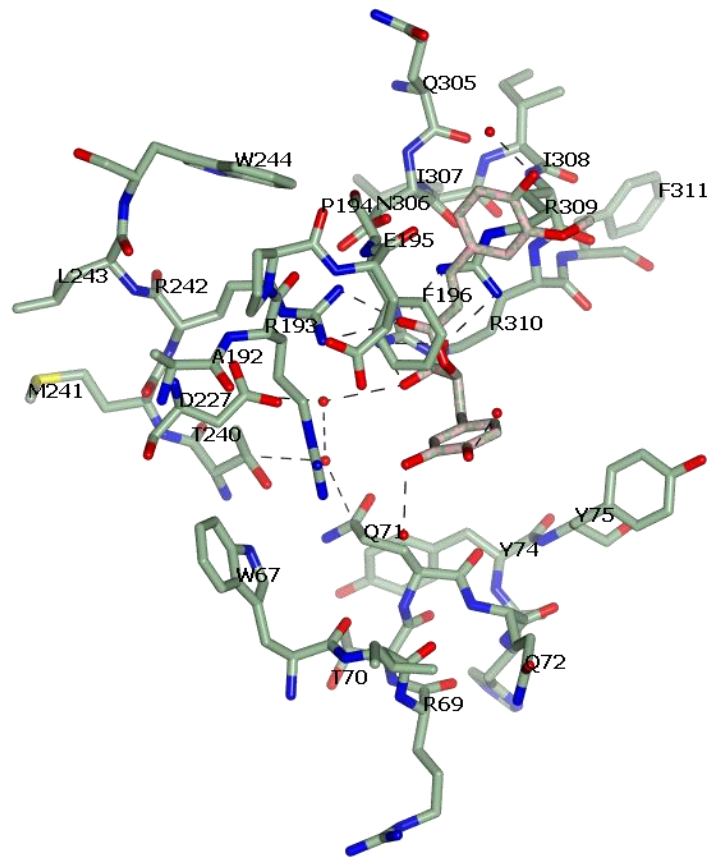
3.3. Δομικά αποτελέσματα

Στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 3.1) φαίνεται το σύνολο των δεσμών υδρογόνων και των αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* που σχηματίζονται μεταξύ των μορίων νερού, των αμινοξέων του ενζύμου και των μορίων *DMSO*.

<i>Inhibitor atom</i>	<i>Protein Residues (atoms)</i>	
	<i>Hydrogen bonds (-3.35 Å)</i>	<i>Van der Waals Interactions (-4.0 Å)</i>
01		<i>DMS7 (O)</i>
02	<i>WATER192: 2.75</i>	
03	<i>ARG242 (NH1): 2.86</i> <i>ARG242 (NH2): 3.07</i> <i>ARG309 (NH2): 3.25</i>	<i>PHE196 (CE2, CG, CD2)</i> <i>ARG242 (CZ)</i> <i>ARG309 (CZ)</i> <i>WATER163</i>
04		<i>PHE196 (CZ, CE2)</i> <i>ARG309 (NH1)</i>
05	<i>ARG310 (NH2): 2.86</i> <i>WATER414: 3.16</i>	<i>ARG310 (NE, CZ)</i>
06	<i>ARG310 (NE): 2.63</i> <i>ARG310 (NH2): 2.85</i> <i>ARG309 (NH1): 3.04</i> <i>ARG309 (NH2): 3.03</i>	<i>ARG310 (CG, CD, CZ)</i> <i>ARG309 (CZ)</i>
07	<i>WATER266: 2.38</i>	<i>PHE196 (CZ)</i>

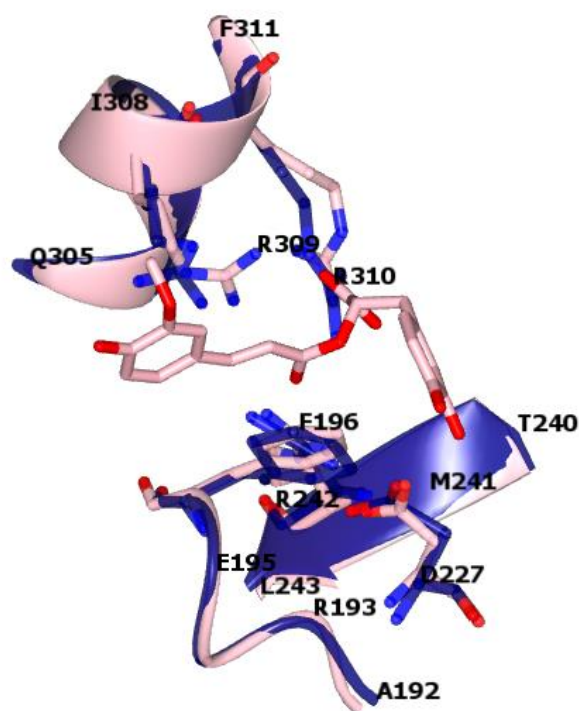
<i>O8</i>	<i>WATER304: 2.81</i>	<i>ARG193 (NH, NE, CZ) PHE196 (CZ, CE2) WATER137 DMS6 (C1)</i>
<i>C1</i>		<i>ARG309 (CD, NE) DMS7 (O)</i>
<i>C2</i>		<i>DMS7 (O)</i>
<i>C3</i>		<i>WATER192 DMS7 (O)</i>
<i>C4</i>		<i>WATER192</i>
<i>C5</i>		<i>PHE196 (CA) ARG309 (NE) WATER163 WATER164</i>
<i>C6</i>		<i>ARG309 (CZ, CD, NE) PHE196 (CD1) WATER163</i>
<i>C8</i>		<i>PHE196 (CG, CD1, CE1, CB) ARG309 (CZ, NH1, NH2, NE)</i>
<i>C9</i>		<i>PHE196 (CZ, CE2, CG, CD2, CD1, CE1) ARG309 (CZ, NH1, NH2, NE) WATER163</i>
<i>C10</i>		<i>PHE196 (CZ, CE2, CG, CD2) ARG309 (CZ, NH1, NH2)</i>
<i>C11</i>		<i>ARG309 (NH1)</i>
<i>C12</i>		<i>ARG309 (NH1, NH2) ARG310 (NE, CZ, NH2)</i>
<i>C13</i>		<i>WATER449</i>
<i>C14</i>		<i>WATER449</i>
<i>C15</i>		<i>PHE196 (CZ, CE2) WATER137 WATER304</i>
<i>C16</i>		<i>PHE196 (CZ, CE2) WATET304</i>
<i>C17</i>		<i>PHE196 (CZ) WATER266</i>
<i>C18</i>		<i>PHE 196 (CZ) WATER266</i>
<i>C19</i>		<i>WATER449</i>
<i>TOTAL</i>	<i>12</i>	<i>85</i>

Στην εικόνα που ακολουθεί, φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις που αναφέρονται και στον παραπάνω πίνακα, με τρισδιάστατη απεικόνιση.



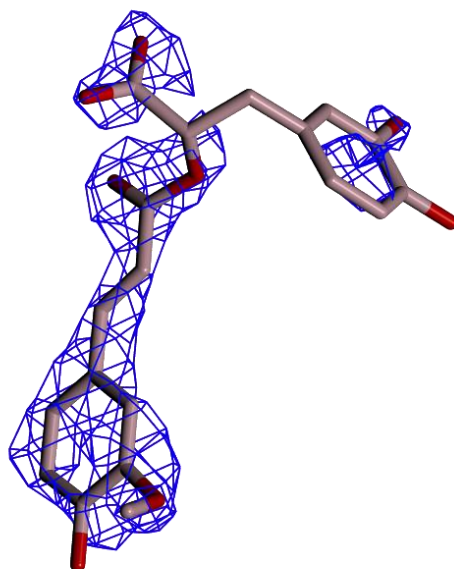
Εικόνα 21 Με διακεκομμένες γραμμές αναπαρίστανται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του αναστολέα (ροζ) και των αμινοξέων Arg242, Arg309, Arg310 και των μορίων νερού 162, 216, 304 και 414.

Ακόμη, προσδιορίστηκε και η αλλαγή που προκάλεσε η πρόσδεση του αναστολέα στην διαμόρφωση του ενζύμου και ειδικά στα γειτονικά αμινοξέα στο αλλοστερικό κέντρο στο οποίο προσδένεται ο αναστολέας B02.



Εικόνα 22 Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η native δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ενώ με ροζ η δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μαζί με τον αναστολέα B02. Στην εικόνα φαίνονται τα αμινοξέα τα οποία μετακινήθηκαν σε σημαντικό βαθμό ύστερα από την πρόσδεση του αναστολέα.

Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του αναστολέα ύστερα από τις βελτιστοποιήσεις που εφαρμόστηκαν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.



Εικόνα 23 Ηλεκτρονιακή πυκνότητα αναστολέα.

Συζήτηση

Η ανάπτυξη ανασταλτικών μορίων έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί πιθανή θεραπεία έναντι του σακχαρώδους διαβήτη καθώς έχουν ως ρόλο την μείωση του ρυθμού αποικοδόμησης του γλυκογόνου οδηγώντας έτσι στη μείωση των αυξημένων επιπέδων γλυκόζης που χαρακτηρίζουν την μεταβολική αυτή διαταραχή. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχει βρεθεί πως έχει 6 κέντρα πρόσδεσης τα οποία είναι: καταλυτικό, αλλοστερικό, νέο-αλλοστερικό, κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, ανασταλτικό κέντρο και το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης. Ως επί το πλείστον, οι περισσότεροι αναστολείς που σχεδιάζονται αποτελούν παράγωγα γλυκόζης τα οποία συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου χωρίς αυτό να συνεπάγεται ότι δεν σχεδιάζονται μόρια τα οποία προσδέονται σε άλλα κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου.

Στην πτυχιακή αυτή εργασία, διεξάχθηκαν κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων Χ προκειμένου να διαπιστωθεί η ανασταλτική δράση ενός πιθανού αναστολέα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ο οποίος προβλεπόταν να προσδέεται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου. Οι μελέτες αυτές έγιναν στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία απομονώθηκε από σκελετικούς μύες κονίκλων και παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την ανθρώπινη ισομορφή. Βρέθηκε λοιπόν ότι η αναστολή του μορίου αυτού είναι αρκετά ισχυρή καθώς η σταθερά ανατολής K_i ισούται με $65.02 \mu M \pm 2,39$.

Όσον αφορά τις κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων Χ, επιβεβαιώθηκε ότι η θέση πρόσδεσης του αναστολέα είναι όντως το αλλοστερικό κέντρο καθώς προσδιορίστηκαν οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* που αναπτύσσονται μεταξύ των αμινοξέων του ενζύμου, του αναστολέα, των μορίων νερού και των μορίων *DMSO*. Πιο συγκεκριμένα η πρόσδεση του αναστολέα στο αλλοστερικό κέντρο δεν επιτρέπει την πρόσδεση της *AMP* που αποτελεί τον φυσιολογικό προσδέτη-ενεργοποιητή του αλλοστερικού κέντρου και πιθανότατα εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος 1-φωσφορική γλυκόζη.

Συμπερασματικά, ο αναστολέας αυτός πιθανότατα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φαρμακευτικό σκεύασμα ενάντια στον σακχαρώδη διαβήτη. Φυσικά, έχουν πραγματοποιηθεί και άλλες δοκιμές για την μελέτη της πρόσδεσης άλλων μορίων που προσδέονται στα διάφορα κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο προσδέτης *W1807* ο οποίος έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μέσω της πρόσδεσής του στο αλλοστερικό κέντρο. Πιο συγκεκριμένα για το μόριο αυτό έχει προσδιοριστεί η $K_i = 1.6 nM$ καθώς και ο αριθμός δεσμών υδρογόνου (9) και δεσμών *Van der Waals* (67) οι οποίοι σχηματίζονται μεταξύ των αμινοξέων του ενζύμου και των μορίων νερού.

Βιβλιογραφία

1. Guthrie RA, Guthrie DW. Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Critical Care Nursing Quarterly*. 2004 Jun;27(2):113–25. doi: 10.1097/00002727-200404000-00003
2. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2013 Jan;36(Suppl 1):S67–74. doi: 10.2337/dc13-S067
3. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 30;21(17):6275. doi: 10.3390/ijms21176275
4. Cheng Z, Tseng Y, White MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Oct;21(10):589–98. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.06.005>
5. Thevis M, Thomas A, Schänzer W. Insulin. In: Thieme D, Hemmersbach P, editors. *Doping in Sports: Biochemical Principles, Effects and Analysis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010 [cited 2021 Jun 21]. p. 209–26. (Handbook of Experimental Pharmacology). https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4_10
6. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006]Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006
7. Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J*. 2012 Feb 1;441(3):763–87. doi: 10.1042/BJ20111416
8. Agius L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*. 2015 Dec 1;46:34–45. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.09.002>
9. 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>
10. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2012.
11. Johnson LN, Hu S-H, Barford D. Catalytic mechanism of glycogen phosphorylase. *Faraday Discuss*. 1992 Jan 1;93(0):131–42. <https://doi.org/10.1039/FD9929300131>
12. 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>
13. Baker DJ, Timmons JA, Greenhaff PL. Glycogen Phosphorylase Inhibition in Type 2 Diabetes Therapy: A Systematic Evaluation of Metabolic and Functional Effects in Rat Skeletal Muscle. *Diabetes*. 2005 Aug 1;54(8):2453–9. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2453>
14. Martin JL, Veluraja K, Ross K, Johnson LN, Fleet GW, Ramsden NG, et al. Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: the design of

- potential drugs for diabetes. *Biochemistry*. 1991 Oct 22;30(42):10101–16.
<https://doi.org/10.1021/bi00106a006>
15. Johnson LN. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *The FASEB Journal*. 1992;6(6):2274–82.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.6.6.1544539>
 16. 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
 17. 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.
 doi:<https://doi.org/10.1007/s11101-014-9360-6>
 18. Sprang SR, Goldsmith EJ, Fletterick RJ, Withers SG, Madsen NB. Catalytic site of glycogen phosphorylase: structure of the T state and specificity for α -D-glucose. *Biochemistry*. 1982 Oct 12;21(21):5364–71.
<https://doi.org/10.1021/bi00264a038>
 19. Braden C, Tooze J. Introduction to protein structure. 19 Union Square West. New York. Garland Publishing, Inc. 1999
 20. McPherson A, Gavira JA. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2013 Dec 24;70(Pt 1):2–20. doi: 10.1107/S2053230X13033141
 21. Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. Principles of physical biochemistry. 2nd ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall; 2006.
 22. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger's Βασικές Αρχές Βιοχημείας*, 7η Αγγλική έκδοση, 2η ελληνική έκδοση Broken Hill 2018.
 23. Witters LA, Avruch J. Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase. *Biochemistry*. 1978 Feb 7;17(3):406–10.
<https://doi.org/10.1021/bi00596a004>
 24. Στραβοπόδης Δ. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ. :7.
 25. Tsirkone VG, Tsoukala E, Lamprakos C, Manta S, Hayes JM, Skamnaki VT, et al. 1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. *BioorgMed Chem* 2010
 26. 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 27.
 27. Rhodes G. Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press; 2006
 28. Murshudov GN, Skubak P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011;67:355-67

29. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1997;53:240-55.
30. COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994;50:760-3.
31. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004;60:2126-32
32. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010;66:486-501.
33. McNicholas S, Potterton E, Wilson KS, Noble ME. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011;67:386-94