



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΑ
ΦΑΡΜΑΚΑ



ΓΚΕΒΡΕΚΗΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- **Δρ. Δημήτριος Δ. Λεωνίδας**

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά**

Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

- **Δρ. Μαρία Κοντού**

Επίκουρος Καθηγητής Πρωτεϊνικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, που με δέχτηκε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία υπό την επίβλεψη του. Η προθυμία του να μοιραστεί τις γνώσεις του και την εμπειρία του, καθώς και η συνεχής καθοδήγηση και υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος υπήρξαν πολύτιμες. Επιπροσθέτως, ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία και στην Δρ, Κοντού Μαρία για την άριστη συνεργασία.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Αναστασία Καντσάδη η οποία παρά τις υποχρεώσεις της στο εργαστήριο, μου προσέφερε την πολύτιμη βοήθεια της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς και όλους όσους συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση αυτής της εργασίας.

Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές και εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δε διατηρούνται σταθερά. Με σκοπό τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, τα διάφορα ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για τον κατευθυνόμενο σχεδιασμό ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για κάποιο κέντρο σύνδεσης με απώτερο σκοπό την χρησιμοποίησή τους ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Προς αυτήν την κατεύθυνση, το ένζυμο της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση ενός αναλόγου της 3' φθοροπυριμιδίνης της γλυκοπυρανόζης που είχε μία αμινομάδα στη θέση 3' του γλυκοπυρανοζολικού δακτυλίου στη δραστηριότητα της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μυς κουνελιού. Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι η ένωση αυτή είναι αναστολέας μέτριας ισχύος του ενζύμου με σταθερά αναστολής, $IC_{50} 1,14 \pm 0,11 \text{ mM}$.

Abstract

Diabetes mellitus, one of the more serious hormonal imbalance diseases is characterised by elevated blood glucose levels. With the aim of treating this pathological state, enzymes and substrates involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets for the rational structure-based design of potential hypoglycaemic drugs. Previous studies have shown that hepatic glycogen phosphorylase represents an important molecular target for the design of new hypoglycaemic drugs.

In the present study, glycogen phosphorylase b from rabbit muscle has been employed as molecular target for the kinetic studies of 1 new glucose analogue with different substitutions at the 3' position of the glucopyranose ring targeting the catalytic site of the enzyme. The kinetic experiments, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that the analogue is a medium potency inhibitor of the enzyme with an IC_{50} value of 1.14 ± 0.11 mM.

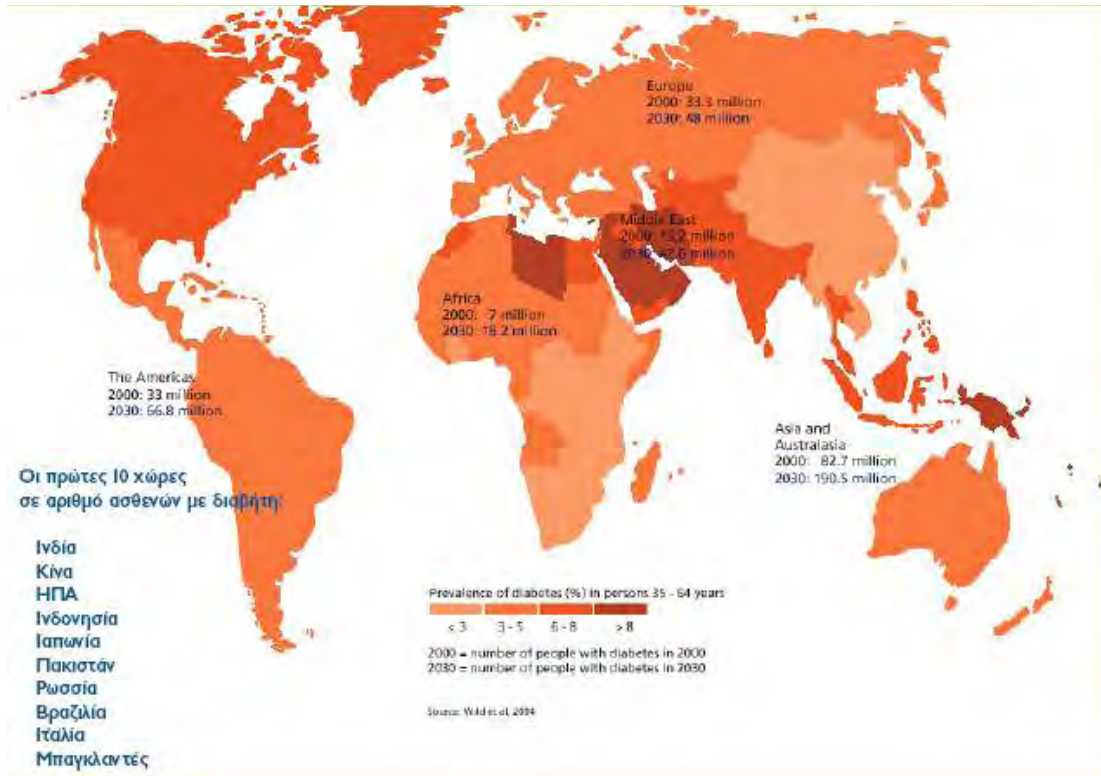
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), είναι μια χρόνια ασθένεια που προκύπτει είτε επειδή το πάγκρεας αδυνατεί να παράγει αρκετή ινσουλίνη, είτε επειδή ο οργανισμός δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει αποτελεσματικά την ινσουλίνη που παράγεται. Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη που ρυθμίζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και παράγεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Στο ΣΔ, το πάγκρεας παράγει ελάχιστη ή καθόλου ινσουλίνη (διαβήτης τύπου 1), ή η ινσουλίνη που παράγεται δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό (διαβήτης τύπου 2) οδηγώντας έτσι σε υπεργλυκαιμία. Ο διαβήτης τύπου 1 ή νεανικός διαβήτης πλήττει κυρίως άτομα νεαρής ηλικίας και οφείλεται στην καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που εκκρίνουν ινσουλίνη. Ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται και ως διαβήτης των ενηλίκων και κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως πάντως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 χρονών και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών.

Παρά τις προσπάθειες για εύρεση ικανοποιητικής θεραπείας έναντι του διαβήτη, η μεταβολική τούτη νόσος συνεχίζει να μαστίζει στις μέρες μας περισσότερο από κάθε άλλη φορά, καθώς τα ποσοστά στα οποία απαντάται της επιτρέπουν να θεωρείται ως «η επιδημία της εποχής μας». Ο διαβήτης είναι η τέταρτη αιτία θανάτου στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες. Πρόσφατα στοιχεία από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας υποδηλώνουν ότι 3,2 εκατ. θάνατοι κάθε χρόνο οφείλονται στον διαβήτη, δηλαδή 6 θάνατοι το λεπτό. Στην Ευρώπη αντίστοιχα 609.000 θάνατοι οφείλονταν στον διαβήτη. Στους θανάτους αυτούς συνυπολογίζονται και αυτοί στους οποίους ο διαβήτης είχε αναφερθεί ως επιβαρυντικός παράγοντας στην αιτία θανάτου. <http://www.ifet.gr/diabetes2005IFET.pdf> Η εικόνα δεν αλλάζει ούτε εντός συνόρων αφού πάνω από το 10% του ελληνικού πληθυσμού, δηλαδή 1,2 εκατ. άνθρωποι, πάσχουν από τη νόσο και πολλοί από αυτούς δεν το γνωρίζουν. Ο

αριθμός έχει αυξηθεί κατά τέσσερις φορές την τελευταία 30ετία, με την ασθένεια να πλήττει κυρίως τον πληθυσμό των παχύσαρκων.



Εικόνα 1: Η διασπορά των ασθενών με διαβήτη παγκοσμίως και ο προβλεπόμενος αριθμός πασχόντων το 2030.

[*Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας*] <http://www.ifet.gr/diabetes2005IFET.pdf> .

Ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί σε άτομα με γενετική προδιάθεση ωστόσο δεν θεωρείται ούτε κληρονομικός, ούτε μεταδοτικός αν και στις περισσότερες περιπτώσεις το γενετικό υπόβαθρο μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο. Ο διαβήτης τύπου 2 έχει στενή σχέση με την παχυσαρκία και συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιαγγειακών επεισοδίων, νεφρικής ανεπάρκειας, νευροπάθειας, μόνιμων βλαβών του αμφιβληστροειδούς και άλλων σοβαρών επιπλοκών. Μια σειρά παραγόντων, όπως το κάπνισμα, τα αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης, η παχυσαρκία, η αρτηριακή υπέρταση και η καθιστική ζωή, επιταχύνουν την ανάπτυξη επιπλοκών. Οι επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες. Οι οξείες είναι η διαβητική κετοξέωση και το διαβητικό κώμα, το υπερωσμωτικό μη κετωτικό κώμα και η υπογλυκαιμία (επιπλοκή της θεραπείας). Οι χρόνιες είναι η διαβητική μικροαγγειοπάθεια

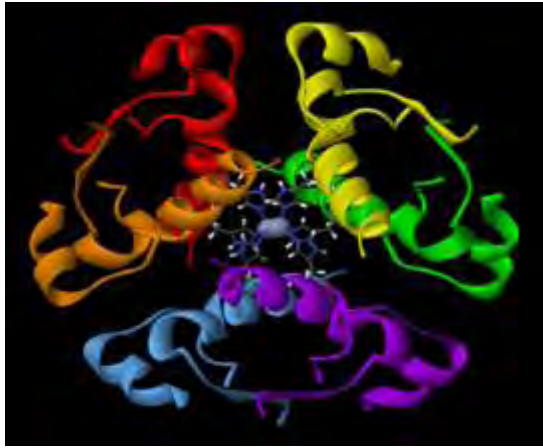
και η διαβητική μακροαγγειοπάθεια (αρτηριοσκλήρυνση, στεφανιαία νόσος). Η πιθανότητα ανάπτυξης επιπλοκών λόγω του σακχαρώδους διαβήτη μειώνεται όσο καλύτερα ρυθμίζονται οι τιμές του σακχάρου στο αίμα.

2 Ο φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα γίνεται με την δράση της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Η **ινσουλίνη** και η **γλυκαγόνη**, δύο πρωτεϊνικής φύσεως ορμόνες με αντίθετη δράση, εκκρίνονται για να διατηρήσουν τη συγκέντρωση της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα (70 mg/dL έως 110 mg/dL).

Η **ινσουλίνη** είναι ένα πολυπεπίδιο, το οποίο παράγεται από τα β-κύτταρα της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος και διαδραματίζει έναν πολύπλευρο ρόλο στον μεταβολισμό. Στις σημαντικότερες λειτουργίες της, περιλαμβάνονται η αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης από τους μυς, το λιπώδη ιστό και το ήπαρ. Αυξάνει το ρυθμό γλυκογονογένεσης και μειώνει τους ρυθμούς της γλυκονογένεσης και γλυκογονόλυσης. Επίσης επιδρά άμεσα στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, καθώς αυξάνει τη δίοδο των περισσότερων αμινοξέων από την κυτταρική μεμβράνη και τη σύνθεση RNA, ενώ η έμμεση επίδραση της έγκειται στο γεγονός ότι αυξάνει τη χρησιμοποίηση γλυκόζης από τα κύτταρα για την παραγωγή ενέργειας, κι έτσι εξοικονομούνται πρωτεΐνες. Ακόμα η ινσουλίνη επηρεάζει και τον μεταβολισμό των λιπιδίων, καθώς αυξάνει την αποθήκευση λίπους και παρεμποδίζει την κινητοποίηση και την οξείδωση των λιπαρών οξέων.

Γενικά τα όργανα ή οι ιστοί που θεωρούνται «στόχοι» της ινσουλίνης είναι το ήπαρ, οι μύες, ο λιπώδης ιστός, ο μαστός, το ενδοθήλιο των αγγείων, τα περιφερικά νεύρα κ.α (Σμοκοβίτης 2004).

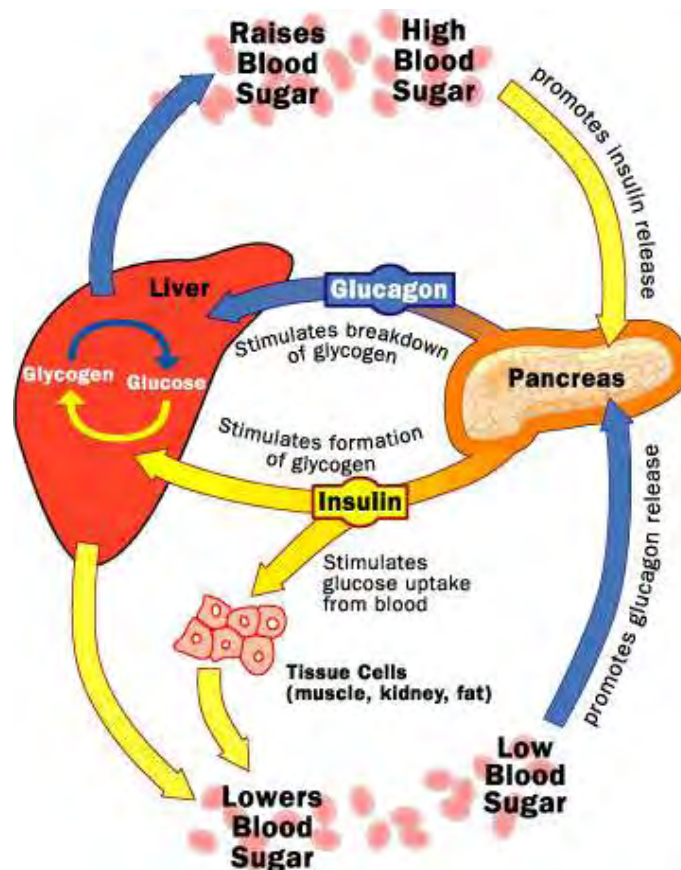


Εικόνα 1: Τρισδιάστατη μορφή ινσουλίνης

Οι δράσεις της ινσουλίνης στο μεταβολισμό είναι: (1) Έλεγχος της πρόσληψης ορισμένων ουσιών και κυρίως της γλυκόζης από τους μυϊκούς και τους λιπώδεις ιστούς. (2) Ενίσχυση των μηχανισμών αντιγραφής του DNA και της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω ελέγχου της πρόσληψης αμινοξέων. (3) Τροποποίηση της δραστηριότητας πολλών ενζύμων.

Η δράση της στα κύτταρα περιλαμβάνει: (1) Ενίσχυση του μηχανισμού σύνθεσης γλυκογόνου και αποθήκευσής του. (2) Ενίσχυση των μηχανισμών σύνθεσης λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων στα λιπαρά κύτταρα. (3) Περιορίζει τη διάσπαση των πρωτεϊνών. (4) Περιορίζει τον σχηματισμό γλυκόζης από μη υδατανθρακικά μόρια. (5) Περιορίζει τις βλάβες που υφίστανται οργανίδια των κυττάρων. (6) Βελτιώνει την πρόσληψη αμινοξέων. (7) Βοηθά στην πρόσληψη καλίου από τα κύτταρα και έτσι μειώνει τη συγκέντρωσή του στο αίμα. (8) Χαλαρώνει τον μυϊκό τόνο, αυξάνει τη ροή αίματος ιδιαίτερα μέσω των μικροαρτηριών. (9) Βοηθά στην έκκριση υδροχλωρικού οξέος από τα επιθηλιακά καλυπτήρια κύτταρα (parietal) του στομάχου.

Η **γλυκαγόνη** εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων και η δράση της είναι ξεκάθαρα καταβολική. Αντίθετα με την ινσουλίνη, η έκκρισή της διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης γλυκόζης του αίματος. Η έκκρισή της ενισχύεται από ορισμένα αμινοξέα και από τη μυϊκή δραστηριότητα. Η γλυκαγόνη αυξάνει τη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα επειδή διασπά το αποταμιευμένο στο ήπαρ (κυρίως) και στους μύες γλυκογόνο προς γλυκόζη. Επιπλέον, ενεργοποιεί τη λιπόλυση στους λιπώδεις ιστούς με αποτέλεσμα την αποδέσμευση λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία.



Εικόνα 2: Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Η αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, οδηγεί στην απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας προς στο ήπαρ. Η ινσουλίνη προκαλεί σύνθεση γλυκογόνου στο ήπαρ με επακόλουθο, τη μείωση της συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα. Η χαμηλή συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης που λαμβάνεται από το πάγκρεας. Στο ήπαρ η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης. Η γλυκόζη μεταφέρεται στο αίμα και αυξάνει την συγκέντρωση του σακχάρου.

3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ή ινσουλινο-εξαρτώμενος (IDDM)

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 προκαλείται από αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος. Η έναρξη της αυτοάνοσης προσβολής συμβαίνει πολλά χρόνια πριν την εμφανιζόμενη ανεπάρκεια στην έκκριση ινσουλίνης και μέχρι τη χρονική στιγμή που θα διαγνωσθεί ο σακχαρώδης διαβήτης, τα β-κύτταρα έχουν υποστεί ανεπανόρθωτη πλέον βλάβη. Το γεγονός αυτό παρατηρείται συνήθως σε ηλικία μικρότερη των 30 ετών, λόγος για τον οποίο του αποδόθηκε η παλαιότερη περιγραφή ως σακχαρώδης διαβήτης

«πρώιμης έναρξης». Το πρωτεύον εύρημα σε αυτό το διαβητικό σύνδρομο, αποτελεί η αδυναμία έκκρισης ακόμη και των μέτριων εκείνων ποσών ινσουλίνης, ικανών για καταστολή του σχηματισμού κετόνης, κατάσταση που προκαλεί επαναλαμβανόμενα επεισόδια κετοξέωσης. Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 1 συνήθως εμφανίζονται απότομα και εξελίσσονται γρήγορα. Συχνά η πρώτη εκδήλωσή του μπορεί να είναι η ανάπτυξη διαβητικής κετοξέωσης, με ναυτία,εμετούς, διάχυτο κοιλιακό άλγος και απώλεια συνείδησης.

4 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 ή μη ινσουλινο-εξαρτώμενος (NIDDM)

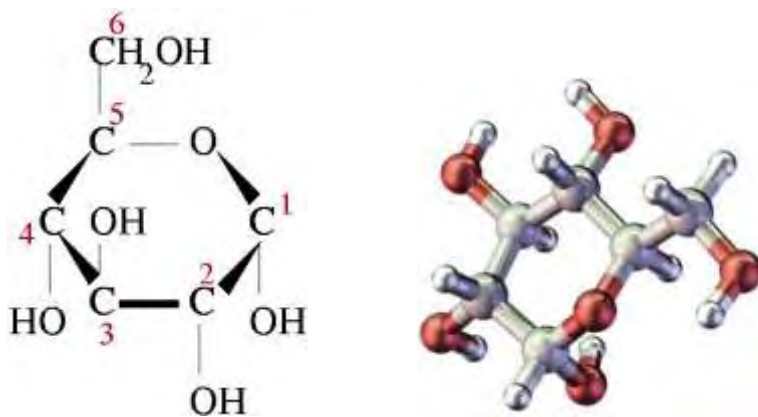
Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 συνιστά τη δεύτερη κύρια μορφή του σακχαρώδη διαβήτη. Οι πάσχοντες από διαβήτη τύπου 2 αποτελούν το 90-95% του πληθυσμού των διαβητικών. Κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγάλη ηλικία και εκτιμάται ότι από διαβήτη τύπου 2 πάσχει το περίπου το 20% των ατόμων με ηλικία 65 χρονών ή μεγαλύτερη (στη Βόρεια Αμερική). Σε αυτή την περίπτωση εκκρίνεται ινσουλίνη, αλλά εμφανίζεται αναποτελεσματική στην αποκατάσταση των επιπέδων γλυκόζης στο πλάσμα. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις ινσουλίνης στην κυκλοφορία είναι επαρκείς (για την καταστολή του σχηματισμού κετόνης) στις περισσότερες περιπτώσεις, γεγονός που προφυλάσσει τους ασθενείς από την εκδήλωση υποτροπιάζουσων κρίσεων διαβητικής κετοξέωσης. Αν και θεραπευτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ινσουλίνη, σε ασθενείς με NIDDM η αποφυγή της κετοξέωσης δεν εξαρτάται από τη συγκεκριμένη αγωγή. Κύριο εύρημα αποτελεί η παρατήρηση ότι αύξηση της τιμής ινσουλίνης πλάσματος δεν συνοδεύεται από την αναμενόμενη αύξηση στη διακίνηση γλυκόζης. Το φαινόμενο αυτό καλείται «αντίσταση στην ινσουλίνη». Σε κάποιους ασθενείς το πρόβλημα εντοπίζεται στους κυτταρικούς υποδοχείς ινσουλίνης, σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζεται κάποιο πρόβλημα στη διάδοση του (χημικού) σήματος της ινσουλίνης ενώ σε άλλες ο οργανισμός δεν παράγει ινσουλίνη. Η ασθένεια συνήθως ελέγχεται με κατάλληλη διαίτα, σωματική άσκηση και υπογλυκαιμικά σκευάσματα (σουλφοναμίδια, θειαζολιδινοδιόνες, διγουανίδια, αναστολείς α-γλυκοσιδάσης). Στο διαβήτη τύπου 2 τα συμπτώματα εμφανίζονται, συνήθως, σταδιακά και είναι βαθμιαία. Συχνά τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 2 λείπουν τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής.

Ωστόσο οι θεραπείες αυτές έχουν αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών αποδεικνύονται και ανεπαρκείς. Τα προβλήματα αυτά

οδήγησαν στην διερεύνηση άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως για παράδειγμα ανταγωνιστές των υποδοχέων γλυκογόνου, αναστολείς της ηπατικής παραγωγής ινσουλίνης καθώς και συνδυαστικές θεραπείες (Morral 2003). Υπάρχει λοιπόν ένα σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών μέσων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου [Oikonomakos *et al.*, 2001].

5 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη. [Stryer,1997].



Εικόνα 4: Απλή και τρισδιάστατη απεικόνιση ενός μορίου γλυκόζης.

Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων [McArdle *et al.*, 2000]. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς, αφού ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό, ενώ

τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν ως καύσιμο μόνο τη γλυκόζη. Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη [Stryer,1997]. Εάν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα μειωθεί πολύ, τότε μειώνεται αντίστοιχα και η λειτουργία του εγκεφάλου [Γεωργάτσου, 1989].

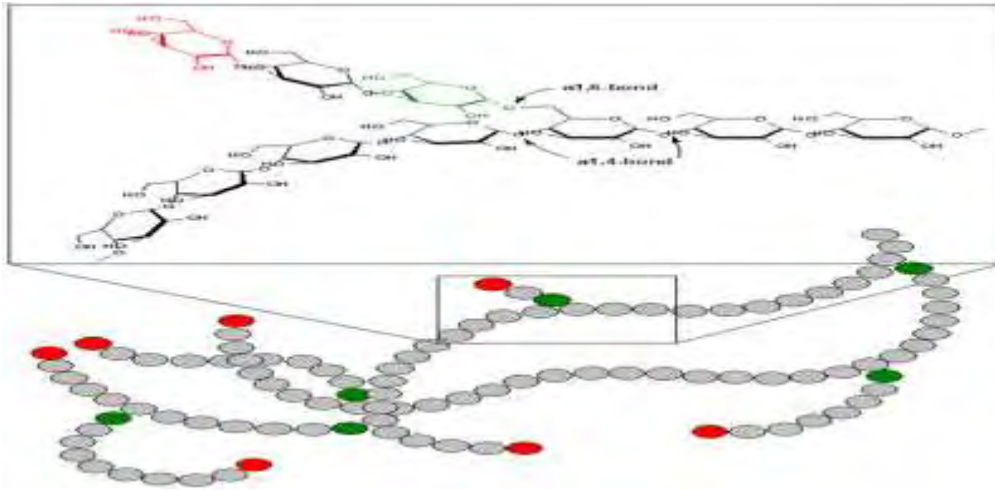
Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι, το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης [McArdle *et al.*, 2000].

Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης (McArdle *et al.*, 2000).

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο GP διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη (Martin *et al.*, 1998). Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και την διαιτητική κατάσταση του οργανισμού (McArdle *et al.*, 2000).

6.1 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές το οποίο αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης. Αποτελεί την κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα κατάλοιπα γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις που απαντούν περίπου σε κάθε δέκατο κατάλοιπο σχηματίζονται από α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς.



Εικόνα 5 : Δομή γλυκογόνου.

Το γλυκογόνο είναι ένα σημαντικό απόθεμα καύσιμων μορίων για διάφορους λόγους. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Ο ρόλος αυτός του γλυκογόνου είναι ιδιαίτερα σημαντικός, διότι η γλυκόζη ουσιαστικά είναι το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι γραμμωτοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ότι στους μύες, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο.

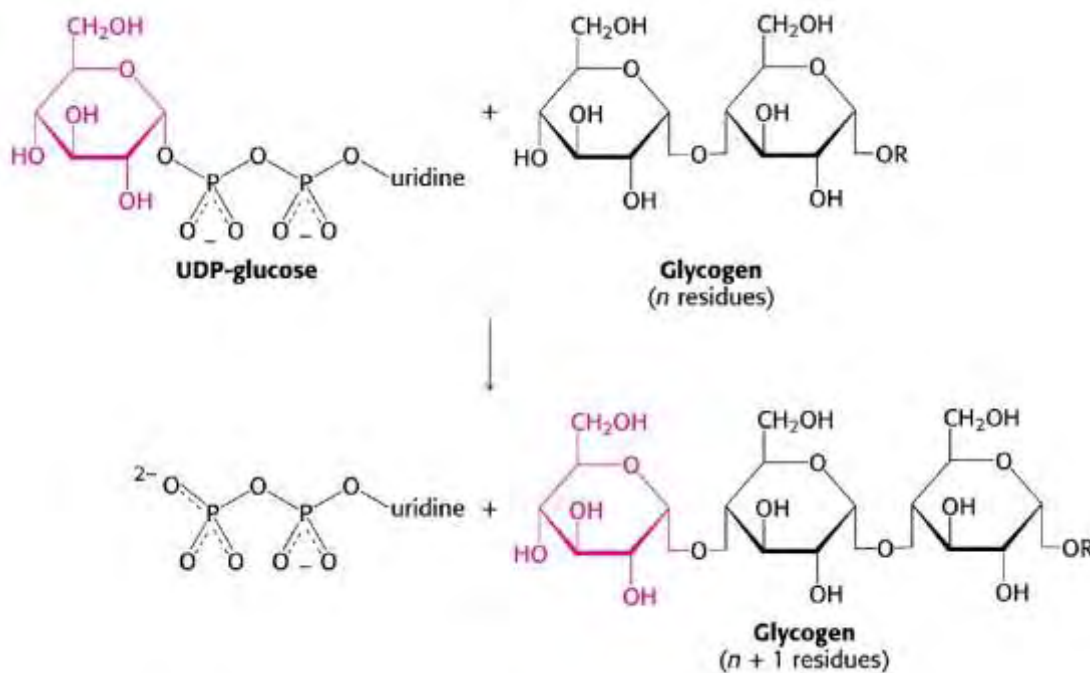
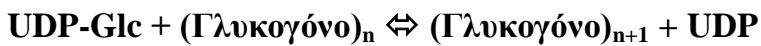
Στο ήπαρ η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως σύνολο. Αντίθετα στους μύες οι διαδικασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών μόνο. (Stryer 1997).

Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζονται αντίρροπα από τον καταρράκτη της κυκλικής AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη) που διεγείρεται από μια ορμόνη και δρα μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A. Αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης εμποδίζει την σύνθεση του γλυκογόνου ταυτόχρονα με την αποικοδόμηση του.

6.2 Σύνθεση γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου απαιτεί ένα μόριο *εκκινητή*, ένα εναρκτήριο μόριο (τουλάχιστον τεσσάρων καταλοίπων) πάνω στο οποίο προστίθενται αλυσίδες ολιγοσακχαριτών με την δράση της συνθάσης του γλυκογόνου (GS). Αυτή η εναρκτήρια λειτουργία εξασφαλίζεται από τη γλυκογονίνη, μια πρωτεΐνη που περιλαμβάνει έναν ολιγοσακχαρίτη, αποτελούμενο από α-1,4-γλυκόζες, συνδεδεμένο με το φαινολικό άτομο οξυγόνου ενός καταλοίπου τυροσίνης. Αυτός είναι ο λόγος που πάντα όταν απομονώνεται γλυκογόνο αυτό περιέχει και πρωτεΐνες.

Η αντίδραση της σύνθεσης του γλυκογόνου καταλύεται από τη GS σύμφωνα με την παρακάτω πορεία:



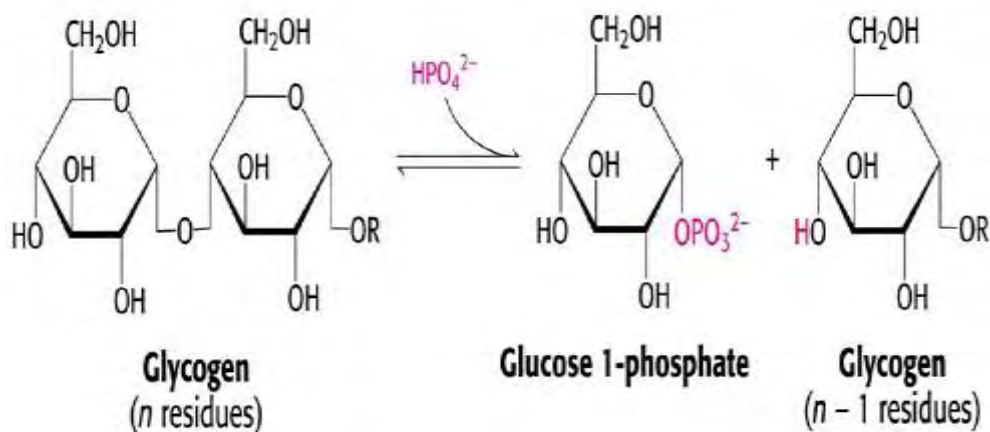
Εικόνα 6 : Συνθετική πορεία του γλυκογόνου

Η GS καταλύει τη μεταφορά της ενεργοποιημένης γλυκοζυλικής μονάδας από την ουριδινοφωσφορική γλυκόζη (UDP) στο υδροξύλιο του C-4 ενός άκρου του γλυκογόνου προς τον σχηματισμό ενός γλυκοζιτικού δεσμού α-1,4. Κατά την επιμήκυνση, η UDP αντικαθίσταται από την τελική υδροξυλική ομάδα του αυξανόμενου μορίου του γλυκογόνου. (Stryer 1997)

6.3 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η γλυκογονόλυση μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936. Το ζεύγος Cori στη συνέχεια απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), το οποίο είναι ένα πάρα πολύ σημαντικό ένζυμο στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης [Cori & Cori, 1936]. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1- φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού ιόντος αναφέρεται ως φωσφορόλυση. Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται [Stryer, 1997].

Γλυκογόνο (n κατάλοιπα) + Pi → 1-φωσφορική-γλυκόζη + γλυκογόνο (n - 1 κατάλοιπα)



Εικόνα 7: Αποικοδόμηση γλυκογόνου

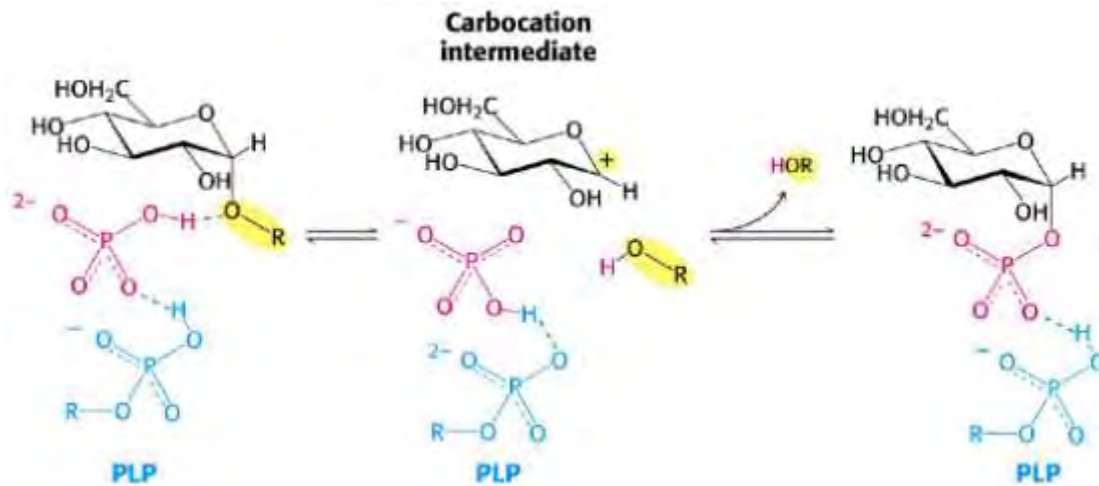
Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3,6. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου μπορεί να καταλύσει την απομάκρυνση μορίων γλυκόζης μέχρι 4 μόρια πριν από τη διακλάδωση. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η α -1,6 γλυκοζιδάση, καθώς και μια μεταφοράση.

Σημαντικό είναι πως η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη [Stryer, 1997].

6.4 Συμμετοχή φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου

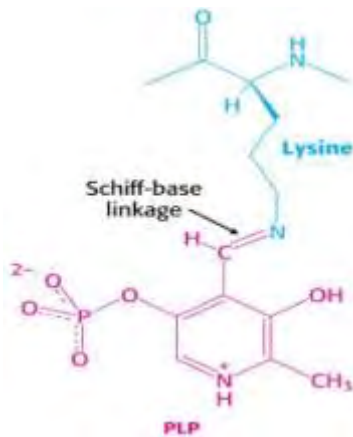
Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο. (Stryer 1997) Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β , δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη [Stryer, 1997].

Ενδιάμεσο καρβοκατιόντος



Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα HPO_4^{2-} (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζυτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται από τη μεταφορά ενός πρωτονίου από τη πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης.

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου (εικόνα 9). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό ανιόν, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό ιόν δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης (Stryer, 1997).



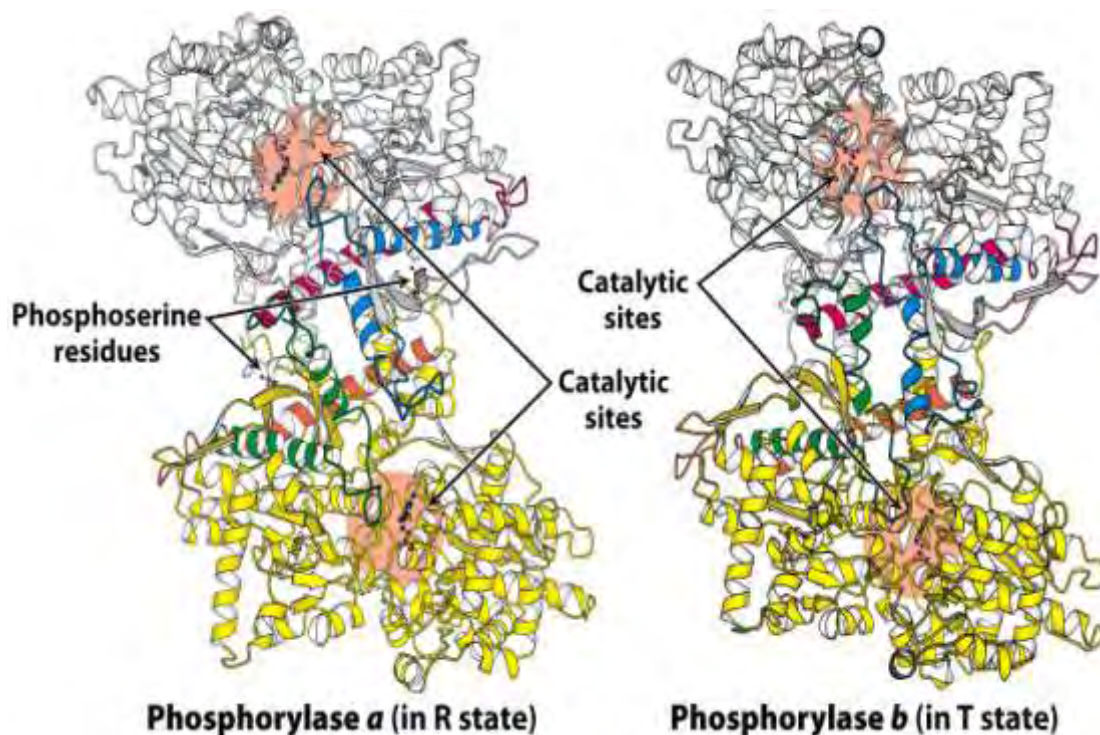
Εικόνα 9: Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η φωσφορική πυριδοξάλη (κόκκινο) σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης(μπλε) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης.

7.1 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του, απελευθερώνοντας 1- φωσφορική γλυκόζη. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ανήκει στην τάξη των τρανσφερασών, στην υπόταξη των γλυκοζυλοτρανσφερασών και στην υπο-υποτάξη των εξοζυλοτρανσφερασών σύμφωνα με την IBU και IUPAC όσον αφορά την φύση της αντίδρασης που καταλύει και έχει συστηματική ονομασία 1,4-α-D-γλυκο,φωσφορικό α-D γλυκοτρανσφεράση [Barman, T.E. 1969]. Δομικά αποτελεί μια ομοδιμερή πρωτεΐνη, που αποτελείται από δύο υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kDa και χρησιμοποιεί ως προσθετική ομάδα για τη κατάλυση τη φωσφορική πυριδοξάλη. Η κάθε υπομονάδα αποτελείται από χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου. Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μύες ενώ η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό και στους ιστούς απουσιάζει το ένζυμο υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6- φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει

ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση της γλυκόζης (Stryer 1997).

Τα τελευταία χρόνια η GP αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για το σχεδιασμό αναστολέων με φαρμακευτικές εφαρμογές στη βελτιστοποίηση του ελέγχου του σακχάρου σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Το ένζυμο εμφανίζεται σε δύο μορφές : την αποφωσφορυλιωμένη μορφή, GPb και στη φωσφορυλιωμένη μορφή, GPa. Σε ξεκούραστους μυς το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργή μορφή του (GPb), που μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε με τη μη ομοιοπολική σύνδεση συνεργειακή σύνδεση του AMP (ή του IMP) είτε με ομοιοπολική φωσφορυλίωση στη μορφή GPa. (Oikonomakos, 2001)

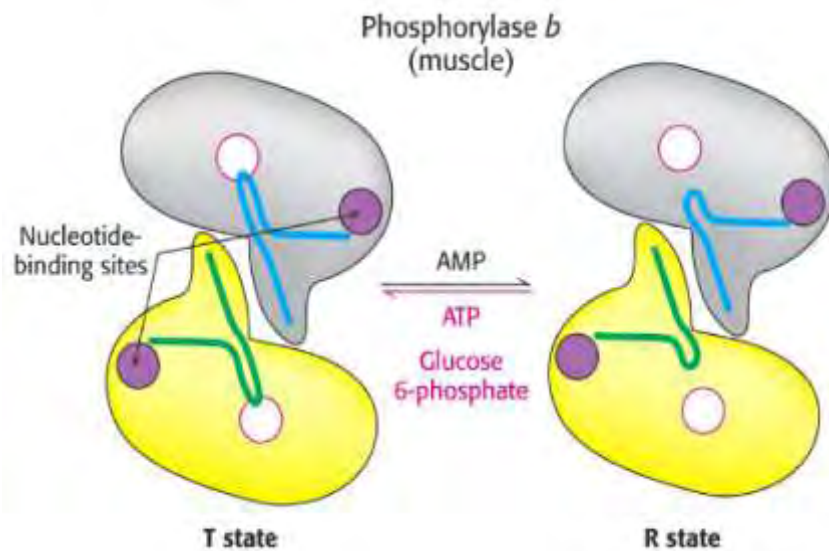


Εικόνα 10: Οι δομές της φωσφορυλάσης *a* και *b*. Η φωσφορυλάση *a* είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή R διαμόρφωση. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν είναι φωσφορυλιωμένη και απαντάται κυρίως στην T διαμόρφωση.

Φυσιολογικά η δραστηριότητά της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό

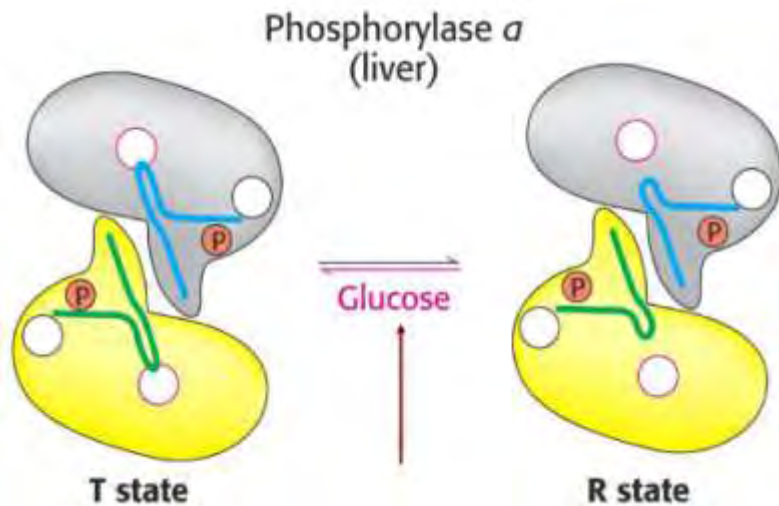
καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση (PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP). (Rath et al.2000)

Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση a) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α- έλικες, οι οποίες μετακινούν ένα βρόχο έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμησης για το ορθοφωσφορικό ιόν είναι καλά οργανωμένη. Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμησης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Το ATP δρα ως αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος το AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου (Stryer 1997). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP και ATP. Η απουσία της φωσφατάσης της 6- φωσφορικής γλυκόζης στους μύες εξασφαλίζει την παραμονή της 6- φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια.



Εικόνα 11: Αλλοστερική ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης : Ένα χαμηλό ενεργειακό φορτίο που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP, ευνοεί την μετάβαση στη μορφή R. (Stryer 1997)

Η ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοίωση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α, αλλά όχι η β παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. (Stryer 1997).



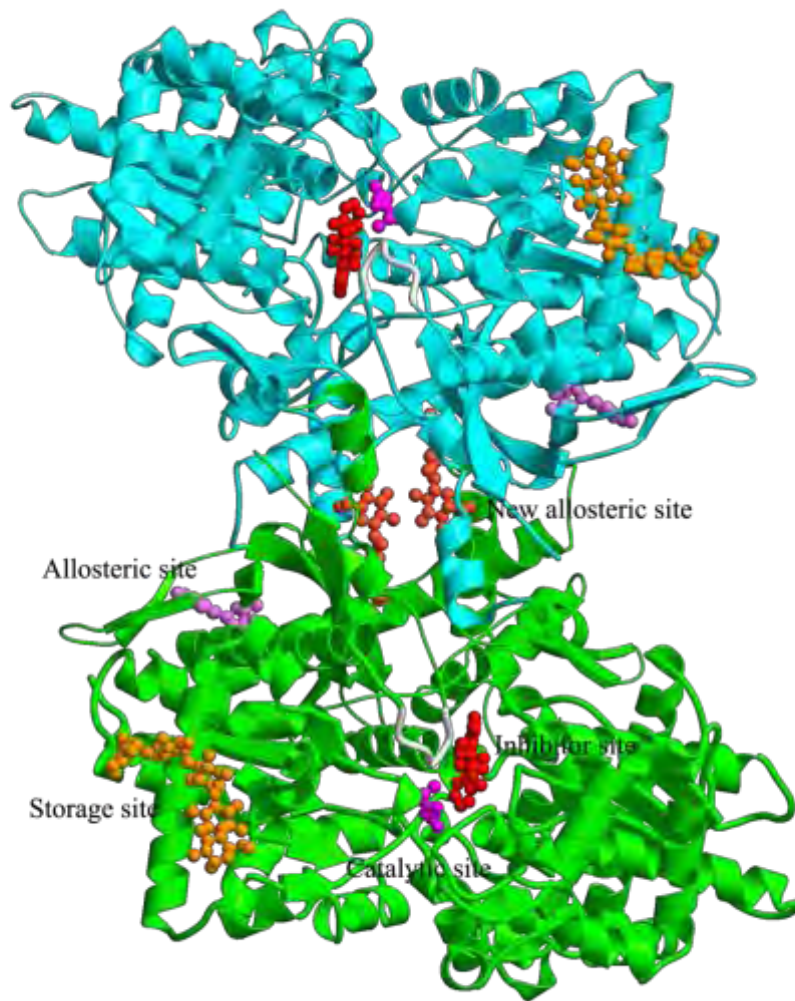
Εικόνα 12: Αλλοστερική ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης: Η πρόσδεση της γλυκόζης στη φωσφορυλάση α μετατοπίζει την ισορροπία προς την κατάσταση T και απενεργοποιεί το ένζυμο. Έτσι το γλυκογόνο δεν κινητοποιείται όταν η γλυκόζη είναι ήδη σε αφθονία

7.2 Κρυσταλλική δομή της GP

Οι κρυσταλλικές δομές της GP α και της GP β (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 από τους Barford και Johnson (Barford & Johnson, 1989). Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά νερού (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Αυτό συμβαίνει γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Μικρά μόρια έτσι μπορούν να διαχέονται μέσω των καναλιών αυτών στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους. [Barford & Johnson, 1989].

Κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη έξι κέντρων σύνδεσης (Σχήμα 13) :

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- Αλλοστερικό κέντρο (N)
- Καταλυτικό κέντρο
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του διμερούς μορίου της GPb όπου βλέπουμε τις θέσεις του καταλυτικού, του αλοστερικού, του κέντρου πρόσδεσης του αναστολέα και του νέου αλοστερικού κέντρου (CP320626).

Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60x60x55 Å. Η GP είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 3_{10} μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια π έλικα μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των

διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (cap) και πύργος (tower) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόγχος 280 (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18) (Oikonomakos *et al.*, 1992)

7.3 Κέντρα σύνδεσης της GP

Η GP έχει έξι κέντρα σύνδεσης:

1) Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14

Το κέντρο φωσφορυλίωσης είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή a στη μορφή b και σε αυτό βρίσκεται η σερίνη 14, η οποία έχει στρατηγική θέση στην διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η φωσφορυλίωση της σερίνης αυτής, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο. Στην GPb, τα αμινοξέα αυτά είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στην GPa έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των δύο υπομονάδων. (Stryer, 1997)

2) Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και περίπου 12 Å από τη Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει προσδιοριστεί και στις δυο διαμορφώσεις, T και R, της GPa και της GPb. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από τρία υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

- Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
- Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων (ριβόζης)
- Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρίνης)

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, GLC-1-P, Pi, SO₄²⁻), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων (Oikonomakos *et al.*, 1992).

3) Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (1-φωσφορική γλυκόζη, Glc-1-P και ανιόντα φωσφορικών, Pi) και αναλόγων τους (UDP-Glc). Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε απόσταση 15 Å από τη επιφάνεια περίπου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται κυρίως από τον βρόχο αμινοξικής ακολουθίας 282-285. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση T → R, ο βρόγχος 282-285 εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από την βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 συμβάλλει στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας (Oikonomakos *et al.*, 1992).

4) Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε ένα αβαθές αυλάκι που σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας (Johnson *et al.*, 1989).

Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης (Oikonomakos *et al.*, 1992).

5) Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής (ή νουκλεοζιτικό κέντρο) είναι ένα υδρόφοβο κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Το κέντρο αναστολής περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (αμινοξέα 13-484) καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (αμινοξέα 485-842). Στην T διαμόρφωση του ενζύμου, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχτεί πως πουρίνες (όπως η αδερίνη και η καφεΐνη), νουκλεοσίδια (όπως η αδενοσίνη και η ινοσίνη), νουκλεοτίδια (όπως το AMP, το IMP και το ATP), το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σώματα (όπως η ριβοφλαβίνη) δένονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GPα και GPβ, όχι όμως και στην ηπατική GPα, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα (Oikonomakos *et al.*, 2002). Στην T διαμόρφωση της GP, η Phe285 του βρόγχου 280s εντοπίζεται κοντά στην Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας (αμινοξέα 613-631) και μαζί, αυτά τα δυο υδροφοβικά μόρια, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η κατάληψη αυτού του κέντρου από ένα μόριο έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου καθώς επίσης και την φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP (Oikonomakos *et al.*, 2002).

Η σύνδεση των αναστολέων με την πρωτεΐνη δεν πραγματοποιείται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοιβάξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων (Sprang *et al.*, 1982).

6) Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPβ. Σε αυτό συνδέεται η ένωση P320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδια καθώς επίσης και η βενζούλο-N-β-D-

γλυκοκυρανοζυλουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GPb. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GPa (Oikonomakos *et al.*, 2002).

8 Αρχές ενζυμικής κινητικής.

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, όπως διατυπώθηκε κυρίως από τους Michaelis-Menten, ασχολείται με την μέτρηση χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου, V_{max} και K_M , και με την μέτρηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι: η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεων, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς), το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.

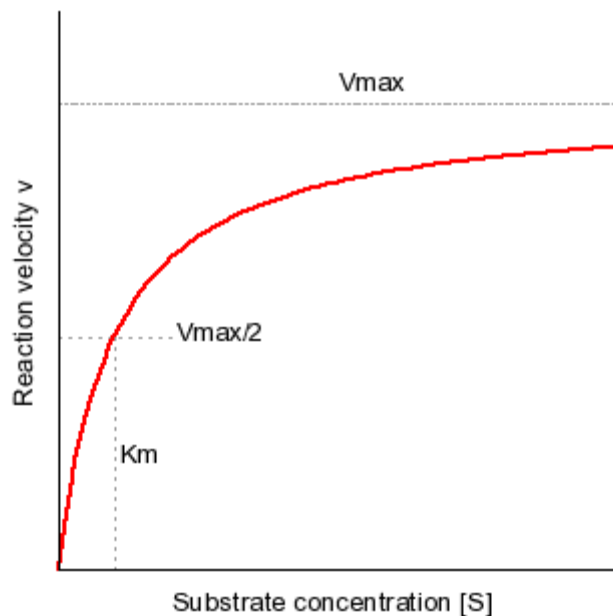
Η ενεργότητα ενός ενζύμου, E, εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, η ταχύτητα, V, ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος, S, που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων, P, που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου και υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{MAX} \left(\frac{[S]}{K_M + [S]} \right)$$

Όπου V_0 η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, $[S]$ η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{MAX} η μέγιστη ταχύτητα για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε και K_M η σταθερά Michaelis

Από την εξίσωση Michaelis-Menten προκύπτει ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας, V_0 , με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$, είναι μια ορθογώνια

υπερβολή. Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως, $V_0=k[S]$), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητικής μηδενικής τάξεως, $V_0=k$) και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας, V_{MAX} (Εικόνα XX). Η σταθερά Michaelis είναι η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία έχουμε το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Έτσι έχουμε μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα.

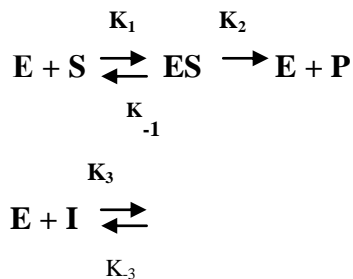


Εικόνα 14: Μία γραφική παράσταση της εξίσωσης Michaelis-Menten

Οι καταλυτικές σταθερές K_M και V_{MAX} είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή K_M είναι σταθερά για ένα ένζυμο με ένα ορισμένο υπόστρωμα κάτω από καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, εκφράζεται ως συγκέντρωση και συνήθως κυμαίνεται σε 10^{-1} με 10^{-7} M. Αντίθετα η V_{MAX} εξαρτάται από το ποσό του ενζύμου που χρησιμοποιείται και γι αυτό εκφράζεται ως ταχύτητα σχηματισμού P ανά μονάδες ενζύμου (π.χ. $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ πρωτεΐνης)

9 Συναγωνιστική αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων (competitive inhibition)

Όταν μια ουσία προκαλεί παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης ονομάζεται αναστολέας. Ένας αναστολέας μπορεί να είναι αντιστρεπτός ή μη αντιστρεπτός. Αντιστρεπτός είναι ο αναστολέας που μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα (με διαπίδυση λ.χ.) και όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά την δραστηριότητά του. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο του ενεργού κέντρου, και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος είτε εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Εάν ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση στο υπόστρωμα S, τότε τα I και S συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός. Το σχήμα των αντιδράσεων στο σύστημα θα έχει ως εξής:

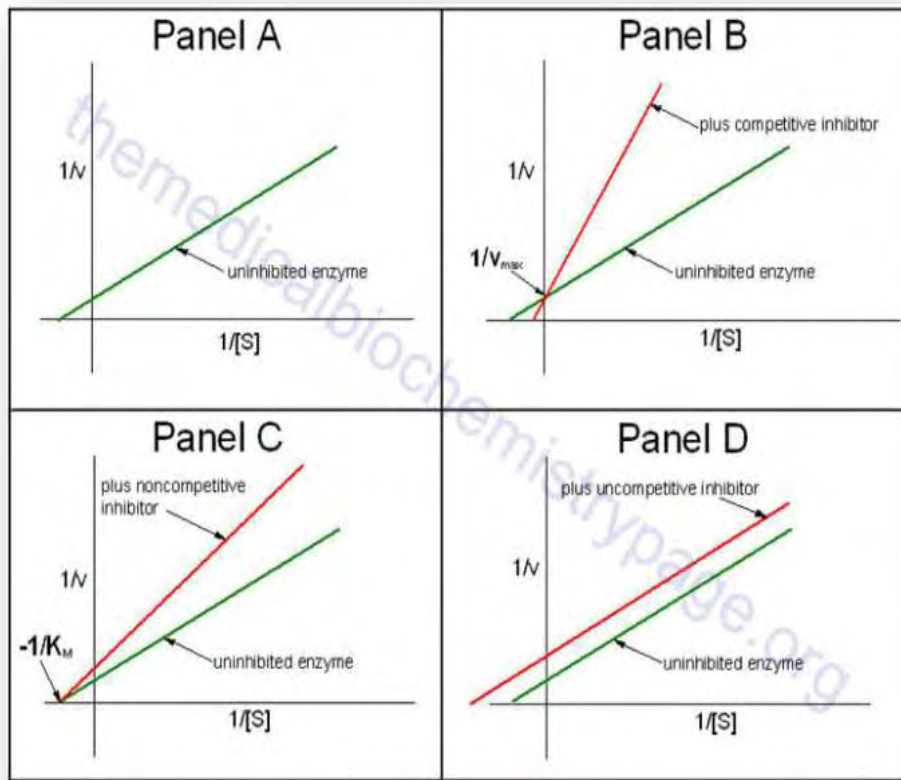


Εικόνα 14 : Τρόποι δράσης αναστολέων.

Από την σχέση $[E] = [E]_t - [ES]$ βλέπουμε ότι η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου (E) είναι ίση με τη συγκέντρωση του ολικού ενζύμου (E_t) μείον τη συγκέντρωση του ενζύμου που είναι δεσμευμένο με το υπόστρωμα (ES). Στην περίπτωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα θα αναγκαστούμε να ελαττώσουμε τη συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου και κατά το ποσό που είναι ενωμένο με τον αναστολέα I, δηλαδή

$$[E] = [E]_t - [ES] - [EI]$$

Η εξίσωση Michaelis - Menten στο σύστημα με συναγωνιστική αναστολή είναι της μορφής :



$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S]([I]K_i + 1)}$$

Εικόνα 15 :: Οι συναγωνιστικοί αναστολείς αυξάνουν την κλίση της καμπύλης σε υψηλότερες τιμές $1/v$ χωρίς όμως να μεταθέτουν το σημείο τομής στην τεταγμένη. Για αυτό η μεν V_{max} παραμένει σταθερή ενώ η K_m αυξάνεται.

Παρατηρούμε ότι η μέγιστη ταχύτητα V_{max} δεν μεταβάλλεται, ενώ η τιμή της σταθεράς Michaelis μεγαλώνει κατά το ποσό $([I]K_i + 1)$. Όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι μηδέν, ή όταν η σταθερά K_i , που ορίζεται ως η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI, είναι πολύ μικρή, δηλαδή υπάρχει μικρή αγχιστεία μεταξύ ενζύμου και αναστολέα, δεν φανερώνεται η αναστολή, με αποτέλεσμα η K_m να είναι φυσιολογική. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι τόσο μεγάλη, δηλαδή η $[S]$ πάει να πάρει την τιμή που μας δίνει η μέγιστη ταχύτητα, ώστε ο όρος K_i να γίνεται πάλι μηδαμινός, με αποτέλεσμα η φυσιολογική V_{max} να μη μεταβάλλεται. Λόγω λοιπόν της μορφής του παρονομαστή στην εξίσωση, η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα, δηλαδή η τιμή της $[I]$, είναι υψηλή ή όταν η τιμή της $[S]$ είναι χαμηλή. Αντίθετα, η αναστολή εξαφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι πολύ χαμηλή ή όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ υψηλή (Ι. Γ. Γεωργάτσος 2001).

Εκτός από την συναγωνιστική αναστολή υπάρχουν:

1. **Μη συναγωνιστική αναστολή (non-competitive inhibition)** στην οποία αντί ο αναστολέας να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ένζυμου, δηλαδή το ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή.

2. **Μικτή αναστολή (mixed inhibition)** σε αυτούς τους αναστολείς οι σταθερές διαστάσεως του S από το ES διαφέρουν με εκείνη του S από το EIS. Έτσι οι K_m και η V_{max} μεταβάλλονται.
3. **Ανταγωνιστική αναστολή (uncompetitive inhibition)** σε αυτή την περίπτωση αναστολής η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος.

10 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Καθώς οι ήδη υπάρχουσες θεραπευτικές αγωγές για το διαβήτη τύπου 2 δεν είναι ικανοποιητικές, τα τελευταία χρόνια έχει εκδηλωθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την εύρεση ενός άλλου δραστικού και ασφαλούς τρόπου ρύθμισης των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Μια μοριακή προσέγγιση στοχεύει στην μείωση παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ με αναστολή της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP). Καθώς η GP είναι ένα ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση της γλυκόζης, χρησιμοποιείται ως στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos, 2002].

Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP του οργανισμού (ηπατικής, μυϊκής, του εγκεφάλου), μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ (Oikonomakos et al., 2008). Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP και 100% στο ενεργό κέντρο) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιοριστεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιοριστεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1).

Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τα οποία αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με κρυσταλλογραφία ακτίνων X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων [Blundell et al., 2002]. Στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b από σκελετικούς μυς κουνελιού

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer & Krebs (1962) με μικρές μόνο τροποποιήσεις (π.χ. χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) [Melpidou & Oikonomakos, 1983].

Υλικά

- 3 κουνέλια
- Απιονισμένο H₂O
- Οξίνο ανθρακικό κάλιο, MB. 100.12 (Merck Chemicals, Germany)
- 2-μερκαπτοαιθανόλη, MB. 78.3 (Serva, Heidelber- Germany)
- EDTA, MB. 372.24 (Panreac, Barcelona-España)
- Οξικό οξύ 99-100%, MB. 60.05 (Chem-Lab, B-8210 Zedelgem)
- β-γλυκερινοφωσφορικό νάτριο 0.005M, MB. 306.12 (Merck KGaA, Germany)
- 5'-φωσφορική αδενοσίνη, MB. 367.2 (Sigma- Aldrich, Steinheim- Germany)
- Τρίς- (υδροξυμέθυλο)- αμινομεθένιο, MB. 121.1 (Serva, Heidelber, Germany)
- Οξικό μαγνήσιο, MB. 214.46 (Ferac, Berlin)
- Θεικό αμμώνιο, MB. 132.14 (Serva, Heidelber- Germany)
- C₃H₈O₃ - Γλυκερόλη 100% (Charlo Erba Reactifs- SDS)

- Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης (Serva Heidelberg, Germany) Πριν από τη χρήση τους υφίστανται κατεργασία με 1% Na₂CO₃ και 10mM EDTA στους 100°C (30 min) και συνεχείς εκπλύσεις με απεσταγμένο ύδωρ.

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου (50: 50: 1) β- γλυκερινοφωσφορικό νάτριο / 2-μερκαπτοαιθανόλη / EDTA, pH 6.8
- Κεκορεσμένο Διάλυμα KHCO₃
- Διάλυμα 2- μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH 7.0
- Διάλυμα CH₃COOH 1N
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 2M και 0.001M, pH 7.5
- Διάλυμα EDTA 0.1M pH 7.0
- Διάλυμα AMP 0.1M pH 7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1M pH 7.0
- Διάλυμα (NH₄)₂SO₂ 90% κορεσμού w/v

Όργανα

- Χειροκίνητη κρεατομηχανή
- Αναλυτικός ζυγός (Kern, Balingen- Germany)
- Αντλία Κενού Buchner (Pall, Live Sciences)
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή Vortex (IKA[®] Works, INC)
- Φασματοφωτόμετρο (Genesys 10uv – Spectronic Unicam)
- Οι φυγοκεντρήσεις μέχρι 45000 g έγιναν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Sorvall, RC5-C (Sorvall, USA) χρησιμοποιώντας την κεφαλή SS-34 (DuPont, Wilmington-USA).

- Η ρύθμιση του pH των διαλυμάτων έγινε με πεχάμετρο Metrohm 744 (Metrohm, Switzerland).
- Για την ογκομέτρηση μικρών όγκων κατά την διεξαγωγή των κινητικών πειραμάτων και των κρυσταλλώσεων χρησιμοποιήθηκαν αυτόματες πιπέτες Gilson P1000-P10 (Gilson, France).

Διαδικασία

Βήμα 1. Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από τρία κουνέλια. Οι μυς αλέθονται με χειροκίνητη μηχανή παραγωγής κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο νερού αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο νερού αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2. Οξίνη καταβύθιση άλλων πρωτεϊνών.

Το pH του ψυχρού εκχυλίσματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με την προσθήκη CH_3COOH 1N. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min, όπου και παρατηρείται η σταδιακή αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος (κατακρήμνιση πρωτεϊνών). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 30 min σε θερμοκρασία 0-4°C, το υπερκείμενο υγρό διηθείται με τη βοήθεια αντλίας κενού Buchner για την απομάκρυνση υπολειμμάτων και γίνεται ρύθμιση του pH στο 6.8 με κορεσμένο διάλυμα KHCO_3 .

Βήμα 3. Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταβυθίζεται σε 41% κορεσμό θειικού αμμωνίου με την προσθήκη διαλύματος θειικού αμμωνίου σε 90% κορεσμό όγκου ίσου με 0.837 για κάθε L

ενζυμικού διαλύματος. Το μίγμα αφήνεται στους 4 °C για 24 ώρες. Μετά από την προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου (με χρήση αντλίας), το ίζημα παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση στις 5500 rpm για 30min στους 4°C και διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου νερού και σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

Βήμα 4. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH.

Μετά την διαπίδυση του πρωτεϊνικού διαλύματος ακολουθεί διαύγαση με φυγοκέντρηση στις 5500 rpm για 30min στους 4 °C και στη συνέχεια προστίθενται τα ακόλουθα:

α) κατάλληλος όγκος ουδέτερου διαλύματος β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M έτσι ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 3×10^{-2} M

β) ουδέτερο διάλυμα EDTA 0.1M

γ) κατάλληλη ποσότητα αλκαλικού διαλύματος Tris 2.0M για τη ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά ακολουθεί επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH₃COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20°C και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται.

Βήμα 5. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση.

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1ml AMP 0.1M (pH 7.0) και (CH₃COO)₂Mg 1M (pH 7.0) ανά 100 mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, το AMP και το (CH₃COO)₂Mg διευκολύνουν την κρυστάλλωση προάγοντας τον τετραμερισμό της GP. Το μίγμα αφήνεται στους 4°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης (50 mM β-GP, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, pH 6.8). Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH₃COO)₂Mg, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στον ψυκτικό θάλαμο (4°C) για 3-4

ώρες. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP.

Βήμα 6. Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου.

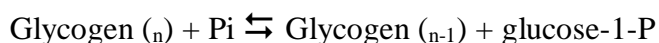
Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης b γλυκογόνου, μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή, διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης 100%. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20°C.

2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου. Ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen_(n)**, προς **Glycogen_(n-1)** και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**.



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται και λαμβάνεται το εναιώρημα

ένζυμου περιεκτικότητας ~500μg/mL. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25 μg /mL, γλυκογόνο 0.2 % (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται επίσης το υπόστρωμα για α-D-Glc-1-P 2.0 mM με προσθήκη 200 μL υποστρώματος α-D-Glc-1-P 9.0 mM, 20μL AMP 45 mM και 500 μL H₂O.

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση στους 30 °C επί 15 λεπτά και το υπόστρωμα επί 5 λεπτά. Μετά την επώαση, 180 μL από το ενζυμικό μείγμα προστίθενται στον σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε: 5.0 μg ένζυμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υπόστρωμα α-D-Glc-1-P 2.0 mM, 50 mM ιμιδαζολίου, 1 mM EDTA, 100 mM KCl και 1 mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30 °C και το pH 6.8. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1.0% (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται). Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της παρουσίας φωσφορικών).

2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α-D- Glc-1-P).

Πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 5% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα

υποστρωμάτων α -D- Glc-1-P 1.0 έως 20 mM, με προσθήκη 200 μ L από το αντίστοιχο υπόστρωμα α -D- Glc-1-P, 20 μ L AMP 45 mM και 500 μ L H₂O.

Το ενζυμικό μείγμα τοποθετείται για επώαση στους 30 °C επί 15 λεπτά και τα υποστρώματα επί 5 λεπτά. Στη συνέχεια, για την εκκίνηση της αντίδρασης σε όλους τους σωλήνες των υποστρωμάτων σταδιακά προστίθενται 180 μ L ενζυμικού μίγματος. Στις συνθήκες αυτές, στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, έχουμε: 5.0 μ g ένζυμο/mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.1% w/v, υπόστρωμα α -D- Glc-1-P 2.0-20 mM, ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM ιμιδαζολίου, 1 mM EDTA, 100 mM KCl και 1 mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1,2,3,4) λαμβάνονται δείγματα των 200 μ L από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μ L SDS 1.0% w/v.

Στα δείγματα γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α -D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών).

2.3 Προσδιορισμός IC₅₀ αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής (Segel, 1975).

Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου δρουν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή (fully competitive inhibition), αφού η σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος και κατ' επέκταση τη δράση του ενζύμου. Σύμφωνα με το μοντέλο της πλήρους συναγωνιστικής αναστολής, ο αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου «μιμούμενος» το υπόστρωμα και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Συνήθως οι ποσότητες των προς εξέταση ουσιών δεν είναι μεγάλες και αυτό περιορίζει την δυνατότητα για μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να καλύψουν την πιθανότητα για την εξαγωγή τόσο των κινητικών παραμέτρων για την ανίχνευση της επίδρασης του αναστολέα στο ένζυμο, όσο και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Σκοπός του ερευνητή είναι να μπορέσει να προσεγγίσει όσο το δυνατό

καλύτερα τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50%. Αυτή η συγκέντρωση ορίζεται ως IC_{50} . Έτσι, η σταθερά IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση Glc-1-P (1-φωσφορικής γλυκόζης).

Υλικά :

- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (α -D- Glc-1-P) 18mM
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β -φωσφογλυκερόλης (β -GP), 50 mM β -μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Γλυκογόνο 1 % (w/v)
- Διάλυμα SDS 1%

Ιμιδαζόλιο

χλωριούχο κάλιο, KCl, MB 74,56 g/mol (SIGMA) η μεγάλη συγκέντρωση του KCl είναι απαραίτητη για τη διατήρηση σταθερής ιοντικής ισχύς στα πειράματα

EDTA, $C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot Na_2 \cdot 2H_2O$, MB 372,5 g/mol (SERVA)

Διθειοθρεϊτόλη, DTT, $C_4H_{10}O_2S_2$, MB 154,25 g/mol (SIGMA), η DTT όπως και η μερκαπτοαιθανόλη δρα ως αναγωγικό μέσο για την αποφυγή φαινομένων όπως η μερική οξείδωση του ενζύμου ή μικροετερογένεια κατά την κρυστάλλωση.

- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8
- Διάλυμα του αναστολέα

Όργανα:

- Υδατόλουτρο (ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία στους 30° C.)
- Φασματοφωτόμετρο
- Δοκιμαστικούς σωλήνες
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Συσκευή vortex
- pHμετρο
- Χρονόμετρο

Πορεία :

2.3.1 Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε γλυκερόλη παίρνουμε 10 μl και το αραιώνουμε με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM β-γλυκερινοφωσφορικού νατρίου 50 mM 2-μερκαπτοαιθανολης, 1mM EDTA. Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκεντρώσεως της GPb, με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1cm.

Εν συνεχεία παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα το οποίο περιέχει 25μg/mL GPb, γλυκογόνο 5% w/v, και ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM β-γλυκερινοφωσφορικού νατρίου 50 mM 2-μερκαπτοαιθανολης, 1mM EDTA, έτσι ώστε με την προσθήκη του διαλύματος με το υπόστρωμα η αντίδραση να λαμβάνει χώρα στις εξής συνθήκες: ένζυμο 5.0 μg/ mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2 % w/v και υπόστρωμα α-D-Glc-1-P σταθερής συγκέντρωσης και αναστολέα μεταβαλλόμενης. Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση 15 min σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 30° C.

2.3.2 Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος

Παρασκευή διαλυμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις Glc-1-P

Από το πυκνό διάλυμα της Glc-1-P (400mM) και το ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (200 mM), KCl (400 mM), EDTA (4 mM), DTT (4 mM) αναμιγνύονται κατάλληλοι όγκοι ώστε να προκύψει διάλυμα Glc-1-P (90mM), ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) και με pH 6.8.

Εν συνεχεία, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) και pH 6.8 με αραίωση του ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου (200 mM), KCl (400 mM), EDTA (4 mM), DTT (4 mM).

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της Glc-1-P προκύπτουν με αραιώσεις του διαλύματος Glc-1-P 90mM με το ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM). Έτσι προκύπτουν συνολικά τα παρακάτω διαλύματα:

- Glc-1-P 90mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 67.5mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 45mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 40.5mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 27mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 18mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 9mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8

Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C για να αποφευχθεί υδρόλυση της Glc-1-P.

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC₅₀, σε σταθερή συγκέντρωση α-D- Glc-1-P 9mM και AMP 50mM ώστε μετά την

προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180μl) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P να είναι 2 mM και της AMP 1mM. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720 μL. Τέλος παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D- Glc-1-P	200 μL	200 μL
AMP (50mM)	18 μL	18 μL
Αναστολέας	-	X μL
H ₂ O	502 μL	720-(200+18+X) μL
Τελικός όγκος	720 μL	720 μL

Τα διαλύματα υποστρώματος τοποθετούνται πριν την εκτέλεση του πειράματος στο υδατόλουτρο ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ενζυμικό διάλυμα.

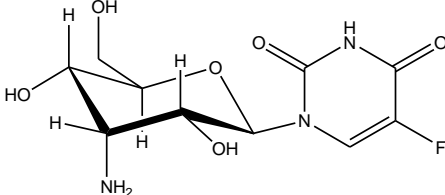
2.3.3 Εκτέλεση του πειράματος

Μετά την επώαση, του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 180 μl από το ενζυμικό μίγμα στον χρόνο 0 σε κάθε διάλυμα υποστρώματος όγκου 720 μL, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ακολούθως, ανά 1 λεπτό (σε χρόνους 1, 2, 3, και 4 min), λαμβάνονται 200 μL και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1% w/v. Έτσι σταματά η ενζυμική αντίδραση, αφού παρουσία του απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μια διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 2.5 ml διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου (βλ. Πειραματικό μέρος §2.4) σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15min και ακολουθεί φωτομέτρηση τους σε μήκος κύματος 850nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των μmol Pi που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit (βλ. Πειραματικό μέρος §2.6), προκειμένου να προσδιοριστεί η IC₅₀. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά α-D- Glc-1-P, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της, αλλά και του ενζυμικού διαλύματος, λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.

Ακολουθεί η λίστα με τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν των για τον προσδιορισμό της IC₅₀. Οι συνθήκες κάθε σειράς πειραμάτων ήταν :

▪ α-D- Glc-1-P: 4mM ▪ AMP: 1mM ▪ Γλυκογόνο: 0,2% w/v

Όνομα	Ένωση	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (mM)
11MS022		1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.5

Πίνακας 1 : Αναστολέας και συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν στα κινητικά πειράματα

2.4 Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στη βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστηριότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου. Η χρησιμότητα του προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου οδήγησε σε μια συνεχή τροποποίηση και βελτιστοποίηση της αρχικής μεθόδου που προτάθηκε από τους Fiske και Subbarow (1925).

Μέθοδος ασκορβικού οξέος [Saheki et al, 1985]

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε ορθοφωσφορικά ιόντα πρέπει να είναι μεταξύ 0.05 και 0.4 μM προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

Υλικά:

- Διάλυμα μολυβδαινίου, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με ατμίζων HCl 1N.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N. Ανάμιξη 4:1 όγκους αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος.

Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από 15 min μετά την παρασκευή του και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

Πορεία:

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2.5 mL από το αντιδραστήριο χρώσης. Μετά από ισχυρή ανάμιξη οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15 min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Επίσης γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών.

2.5 Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC₅₀ βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb. Γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να διορθωθούν οι απορροφήσεις λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά :

- Τυφλό νερού για την ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α -D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της.
- Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.
- Παρασκευάζονται από δυο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός του νερού, και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους. Επίσης, παρασκευάζεται γνωστό πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του οποίου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$.

2.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της α -D- Glc-1-P και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό μείγμα) μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity) αποτελεί έκφραση της ποσότητας αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου και ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή $1\mu\text{mol}$ υποστρώματος ή παραγωγή $1\mu\text{mol}$ προϊόντος ανά λεπτό κάτω από ορισμένες συνθήκες. Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit (Leatherbarrow, 1992) εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα ‘simple weighting’) (Leatherbarrow, 1990). Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων είναι η εξής:

$$v = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{\text{όριο}}{\text{όριο} - \mu\text{molP}_i} \right) \text{όριο} / \text{mg}_{\text{ενζύμου}}$$

όπου k : είναι η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης

t : ο χρόνος της αντίδρασης

όριο: προκύπτει από το γινόμενο της συγκέντρωσης της Glc-1-P που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος επί τον όγκο του δείγματος επί την μέγιστη υδρόλυση της Glc-1-P στην ισορροπία της αντίδρασης (78%).

Οι αρχικές ταχύτητες που προκύπτουν από την παραπάνω εξίσωση επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων (ετεροσκεδαστικότητα 'explicit weighting'). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους V_{\max} και K_m και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten με την προϋπόθεση σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος:

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



Όπου : v : Η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης.

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

$[S]$: Η συγκέντρωση του υποστρώματος.

E : Το ένζυμο

S : Το υπόστρωμα

ES : Το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος

P : Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η

εξίσωση Michaelis-Menten, $v=V_{\max}[S]/K_m + [S]$ (οπού v : ταχύτητα, V_{\max} : μέγιστη ταχύτητα, $[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος, K_m : σταθερά Michaelis-Menten). Γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{\max} .

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{s.a._{\text{control}} - s.a._i}{s.a._{\text{control}}} \times 100\%$$

Όπου: $s.a._{\text{control}}$: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

$s.a._i$: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία i συγκεντρώσεως αναστολέα

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC_{50} θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμή της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC_{50} προκύπτει από το διάγραμμα $\% \text{αναστολή}=f([I])$. Από την τιμή της IC_{50} προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής K_i που αποτελεί όπως και η K_m έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

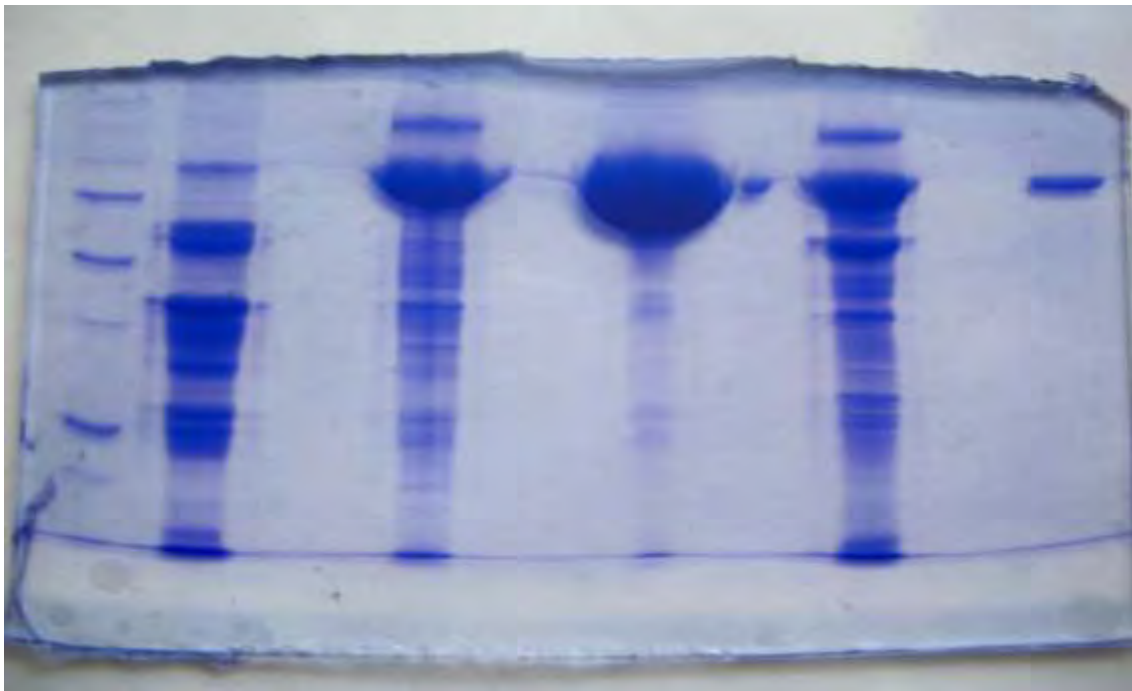
Όπου $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος ως προς το οποίο εξετάζεται η GPb, δηλαδή η συγκέντρωση της Glc-1-P

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Ηλεκτροφόρηση πηκτής κατά την απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Κατά την απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε της βήμα.

Μάρτυρας Διαδρομή 1 Διαδρομή 2 Διαδρομή 3 Διαδρομή 4 Διαδρομή 5

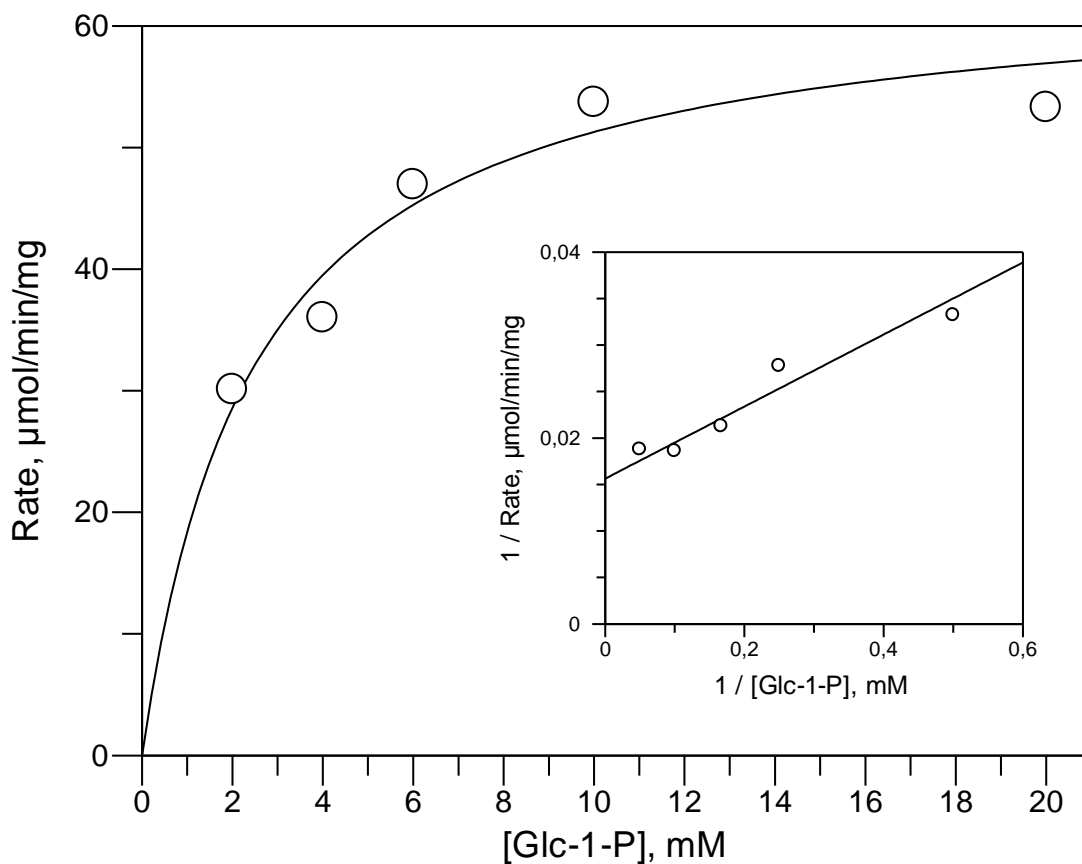


***Εικόνα 16:** Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, στα διάφορα στάδια απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά από όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την τη θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά και την τελευταία ανακρυστάλλωση, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.*

2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (G-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}) [Γεωργάτσος, 2001]. Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m .

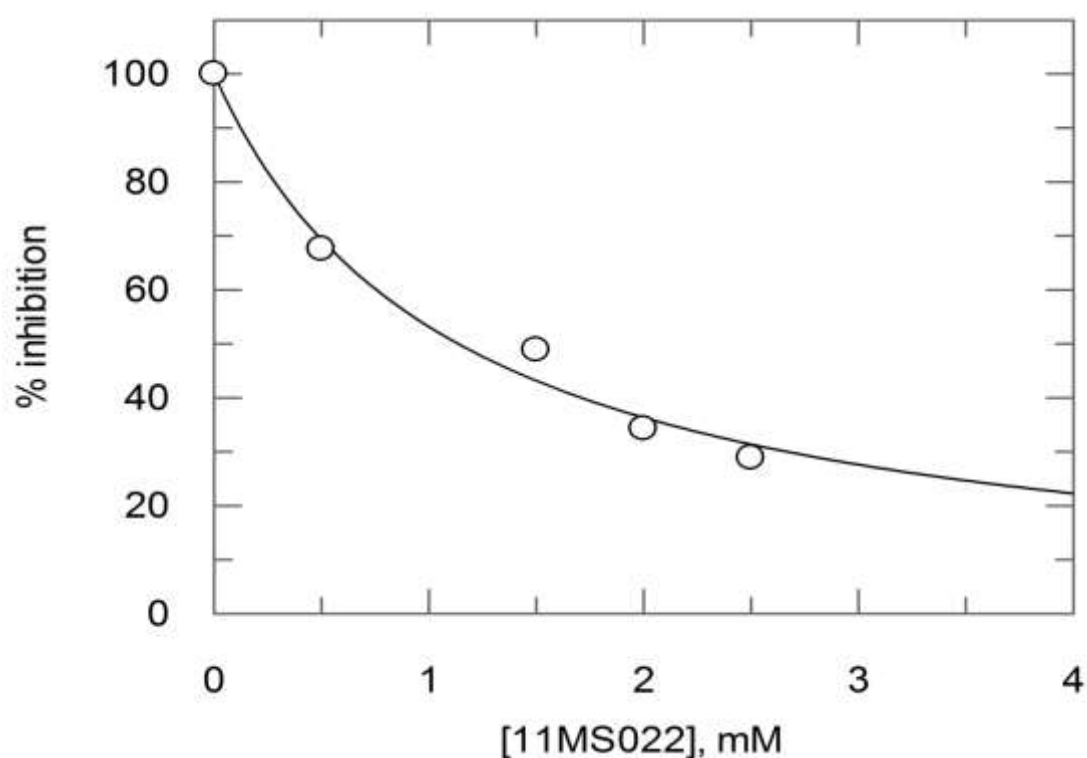
Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=2.48 \pm 0.84$ mM και $V_{max}=63.99 \pm 6.17$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. Στο σχήμα παρουσιάζεται η καμπύλη της ειδικής δραστηριότητας, (specific activity, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (Glc-1-P).



Εικόνα 17: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου β σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο ένθετο παρουσιάζεται το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk από το οποίο υπολογίζονται οι σταθερές K_m και V_{max} .

2.2 Κινητική μελέτη ένωσης 11MS022

Για το σκοπό της εργασίας, μετά την απομόνωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου μελετήθηκε η ένωση 11MS022 ως προς την ικανότητά της να αναστέλλει τη δράση του ενζύμου. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και η γραφική παράσταση που προέκυψε από το πρόγραμμα Grafit (Leatherberrow,1997) από όπου υπολογίστηκε η σταθερά $IC_{50} = 1.1372 \pm 0.1061$ mM.



Εικόνα 18: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του 11MS022 και υπολογισμός της IC_{50} .

Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε με κινητικές μελέτες ο ρόλος του υδροξυλίου στην 3' θέση του γλυκοπυρανοζυλικού δακτυλίου. Έτσι το υδροξύλιο αυτό αντικαταστάθηκε από μία αμινομάδα η οποία άλλαξε το φορτίο στην θέση αυτή (από αρνητικό του υδροξυλίου σε θετικό της αμινομάδας). Μία άλλη διαφορά είναι πως ενώ το υδροξύλιο μπορεί να δράσει και ως δέκτης αλλά και ως δότης πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου με πρωτεϊνικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου η αμινομάδα μπορεί να δράσει μόνο ως δότης.

Ο αναστολέας που μελετήθηκε βρέθηκε να έχει σταθερά $IC_{50} = 1.1372 \pm 0.1061$ mM από την οποία μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά αναστολής $K_i = 0.63 \pm 0.25$ mM. Συγκριτικά με τη γλυκόζη που είναι ο φυσιολογικός αναστολέας του ενζύμου με σταθερά αναστολής 1.0-2.5 mM εμφανίζει πιο ισχυρή αναστολή. Εντούτοις συγκρίνοντας τον με την ένωση οδηγό (GlcFU) η οποία έχει $K_i = 7.9 \pm 0.3$ μ M (Manta et al, 2012) είναι προφανές πως η ένωση 11MS022 είναι πολύ πιο ασθενέστερος αναστολέας. Στη δομή του συμπλόκου GPb-GlcFU (Manta et al, 2012) το 3' υδροξύλιο της γλυκόζης σχηματίζει 3 δεσμούς υδρογόνου με αμιδικά άτομα της κύριας αλυσίδας των καταλοίπων Ala673, Ser674 και Gly675 στους οποίους δρα ως δέκτης πρωτονίων. Η αντικατάσταση του υδροξυλίου από μια αμινομάδα η οποία δεν μπορεί να δράσει ανάλογα σε αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου προσφέρει μία πιθανή δομική εξήγηση για την δραματική πτώση που επέφερε στην ανασταλτική δραστηριότητα η παρουσία της αμινομάδας. Δομικές μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριο αναμένεται να επιβεβαιώσουν την πρόταση αυτή. Συμπερασματικά, το 3' υδροξύλιο της γλυκοπυρανόζης εμπλέκεται σε σημαντικές αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη και αντικατάσταση του οδηγεί σε ασθενέστερους αναστολείς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- McMurry J. (2001). Οργανική Χημεία, Τόμοι I & II, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*, 63, 258-261
- Ρακιντζής Θ. Ν., 1994, Φυσικοχημεία, Έκδοση 3^η, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα.
- Σμοκοβίτης Α., 2004, Φυσιολογία, Έκδοση 4^η, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
- Stryer L., 1997, Βιοχημεία, Τόμος I, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Τσαγκάρης Γ., 1999, Εργαστηριακές ασκήσεις φυσικοχημείας, Σειρά 1, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα.
- Tsirkone G.V, Tsoukala E. , Lamprakis C. , Manta S. , Hayes M. J., Skamnaki T. V., Drakou C., Zographos E. S., Komiotis D, Leonidas D.D., 2010, 1-(3-Deoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 3413–3425.
- Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. 2008, New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983
- Oikonomakos, N.G., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E. and Johnson, L.N. (2000a). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.* 275, 34566-34573.
- Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G. and Johnson, L.N. (2000b). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* 8, 575-584.
- Oikonomakos, N.G. 2002, Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586

- Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák L., Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B. and Gergely, P., 2002, The binding of N'-acetyl- and Benzoyl-N'-β-D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696.
- Oikonomakos, N. G.; Somsak, L. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2008, 9, 379.
- Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., 1963, Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, *J. Mol. Biol.*, 6, 306-329.
- Monod J., Wyman J. & Changeux J-P., 1965, On the nature of allosteric transitions: a plausible model, *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118.
- Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature* 340, 609-616.
- Martin J. L., Johnson L. N. & Withers S. G., 1990, Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b, *Biochemistry*, 29, 10745-10757.
- McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., 2000, *Essentials of Exercise Physiology*, Τόμος Ι, Έκδοση 2^η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.
- McLaughlin, P.J., Stuart, D.I., Klein, H.W., Oikonomakos, N.G., and Johnson, L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry* 23, 5862-5873.