



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

ΕΥΠΙΝΗΤΟΥ ΑΝΔΡΟΜΑΧΗ

**Σύνθεση νέων 3'-C-υδροξυμεθυλο-πυρανονουκλεοζιτών ως
νέοι υπογλυκαιμικοί παράγοντες**

ΛΑΡΙΣΑ 2012

Σύνθεση νέων 3' - C - υδροξυμεθυλο - πυρανονουκλεοζιτών ως νέοι υπογλυκαιμικοί παράγοντες

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δρ. Κομιώτης Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών μορίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μπαλατσός Νικόλαος

Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας καθώς και στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Οργανικής Χημείας, Δρ. Κομιώτη Δημήτριο, για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και για την αμέριστη εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου κατά την εκπόνησή της. Η βοήθεια του ήταν ουσιαστική δεδομένου ότι οι γνώσεις, η εμπειρία και ο κατανοητός τρόπος της διδασκαλίας του έκαναν τα δύσκολα να φαίνονται εύκολα.

Αδιαμφισβήτητα οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Αναπληρωτή καθηγητή Βιοχημείας, Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο για την καθοδήγηση, τη βοήθεια και την υπομονή του καθόλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

Τις θερμές ευχαριστίες μου στην Στυλιανή Μαντά ΠΔ 407/80 για τις συμβουλές της, τις διορθώσεις της και την καθημερινή βοήθεια της.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω στην υποψήφια διδάκτορα Καντσάδη Αναστασία, την αγάπη μου και την εκτίμησή μου, καθώς και ιδιαίτερες ευχαριστίες για την πολύτιμη συνεργασία μας και για τη βοήθεια που μου προσέφερε απλόχερα όποτε την είχα ανάγκη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη των εργαστηρίων που με φιλοξένησαν τους μήνες που χρειάστηκαν για την εκπόνηση των πειραμάτων μου αλλά και τον Σεραφείμ Παπαϊωάννου για την υπέροχη μορφή που έδωσε στη διπλωματική μου εργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο διαβήτης τύπου 2, μία από τις πιο διαδεδομένες παθήσεις, χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα του οργανισμού να ρυθμίσει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Με σκοπό τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ένζυμα και υποδοχείς που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για κάποιο κέντρο σύνδεσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικά φάρμακα. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί σήμερα, έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για τον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Πρόσφατες μελέτες της σύνδεσης μίας σειράς 3' φθοροπυριμιδινών της γλυκοπυρανόζης εμφάνισαν ανασταλτική δράση ως προς τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου β με τιμές IC₅₀ να κυμαίνονται από 6.5 mM έως 46.4 μM. Σε όλες τις ενώσεις αυτές οι 3' υποκαταστάτες της γλυκοπυρανόζης ήταν στην 3' ισημερινή θέση. Με δεδομένο πως το 3' άτομο άνθρακα της γλυκοπυρανόζης βρίσκεται σε απόσταση 5 Å από την γ-φωσφορική ομάδα της PLP στο σύμπλοκο GPb-α-D-γλυκόζη, κατάλληλοι υποκαταστάτες στην 3' αξονική κατεύθυνση θα ενίσχυαν τη σύνδεση αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου μέσω νέων αλληλεπιδράσεων με τη φωσφορική αυτή ομάδα.

Έτσι, η παρούσα μελέτη αναφέρει τη σύνθεση, τη βιοχημική αποτίμηση και τη δομική ανάλυση της σύνδεσης στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου της 1-[3'-C-(υδροξυμεθυλο)-β-D-γλυκοπυρανοζυλο] 5 φθοροουρακίλης (**7**) και του β-D-γλυκοπυρανονουκλεοζίτη της 5-φθοροουρακίλης (GlcFU) για λόγους σύγκρισης.

Η στρατηγική για τη σύνθεση του μορίου-στόχου, δηλαδή του 3'-C-υδροξυμεθυλονουκλεοζιτικού αναλόγου, ήταν να συντεθεί αρχικά ο κατάλληλος γλυκοζιτικός δότης, ο οποίος αποτελεί το βασικό ενδιάμεσο της σύνθεσης, και στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί η αντίδραση συμπύκνωσης με την ετεροκυκλική βάση. Η κινητική μελέτη με τη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από κουνέλι, απεκάλυψε πως και οι δύο ενώσεις, GlcFU και **7** είναι συναγωνιστικοί αναστολείς του ενζύμου με σταθερές αναστολής (K_i) $7.9 \pm$

0.3 μM και $27.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$ αντίστοιχα. Η δομική ανάλυση των συμπλόκων των αναστολέων με το ένζυμο έδειξε πως ο υποκαταστάτης 3'- CH_2OH της **7** σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με τη γ -φωσφορική ομάδα της φωσφορικής πυριδοξάλης όπως αναμενόταν. Εντούτοις η ένωση **7** είναι 3.4 φορές πιο ασθενής αναστολέας από την GlcFU. Συνεπώς για τη διαλεύκανση του φαινομένου αυτού απαιτούνται υπολογισμοί μοριακής κβαντομηχανικής.

Μέρος της πτυχιακής εργασίας παρουσιάστηκε στη δημοσίευση:

3'-axial CH(2) OH substitution on glucopyranose does not increase glycogen phosphorylase inhibitory potency. QM/MM-PBSA calculations suggest why. Manta S, Xipnitou A, Kiritsis C, Kantsadi AL, Hayes JM, Skamnaki VT, Lamprakis C, Kontou M, Zoumpoulakis P, Zographos SE, Leonidas DD, Komiotis D. *Chem Biol Drug Des.* 2012 Feb 2. doi: 10.1111/j.1747-0285.2012.01349.x. (Epub ahead of print)

ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is one of the most common diseases and is characterized by the inability of the human organism to control the glucose levels in the bloodstream. Rational structure-based drug design has exploited a number of promising targets for the treatment of T2D. Hepatic glycogen phosphorylase (GP) is considered to be one of the most promising therapeutic targets for the design of new hypoglycaemic drugs.

Recent studies showed that a series of 3'-fluorinated pyrimidine glucopyranonucleosides are inhibitors of GP with IC_{50} values ranging between 6.5 mM and 46.4 μ M. Structure based design pinpointed that the 3'-position of glucopyranose equipped with a suitable group has the potential to form interactions with enzyme's cofactor, PLP, thus enhancing the inhibitory potency. Hence, the present study reports the synthesis, biochemical evaluation and the structural mode of binding to GP of 3'-C-(hydroxymethyl)- β -D-glucopyranonucleoside of 5-fluorouracil (**7**) together with that of the parental compound β -D-glucopyranonucleoside of 5-fluorouracil (GlcFU) for comparison reasons. Our synthetic strategy to the target 3'-C-hydroxymethyl nucleoside analogue was first to synthesize the suitable glycosyl donor as the key intermediate, and then to carry out a condensation reaction with the nucleosidic base. Both ligands were found to be low μ M competitive inhibitors with K_i values of 7.9 and 27.1 μ M, respectively. X-ray crystallography revealed that the 3'-CH₂OH glucopyranose substituent is indeed involved in additional molecular interactions with the PLP γ -phosphate compared to GlcFU. However it is 3.4 times less potent. To elucidate this discovery Quantum Mechanics/Molecular Mechanics binding affinity calculations are necessary.

Περιεχόμενα

1 Εισαγωγή.....	9
1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης	9
1.2 Φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης	10
1.3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου Ι ή ινσουλινοεξαρτώμενος	12
1.4 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου ΙΙ.....	12
2 Βασικές γνώσεις	14
2.1 Γλυκόζη	14
2.2 Γλυκογόνο	15
2.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	16
2.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων	18
2.5 Νουκλεοζίτες	20
2.5.1 Γλυκοζιτικά και νουκλεοζιτικά παράγωγα ως υπο-	21
γλυκαιμικοί παράγοντες	21
3 Υλικά και Μέθοδοι	24
3.1 Γενική μεθοδολογία πειραμάτων σύνθεσης.....	24
3.2 Πειραματική διαδικασία.....	26
3.2.1 Μεθοδολογία σύνθεσης	26
3.2.2 Σύνθεση 3-C-υδροξυμεθυλο-1,2:5,6-di-O-ισοπροπυλιδένιο-α-D-γλυκοφουρανόζης (3)	28
3.2.3 Σύνθεση 3-C-ακετοξυμεθυλο-1,2:5,6-di-O-ισοπροπυλιδένιο-α-D-γλυκοφουρανόζη (4).....	29
3.2.4 Σύνθεση 3-C-ακετοξυμεθυλο-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλο-D-γλυκοκυρανόζη (5)	30
3.2.5 Σύνθεση 1-[2', 4', 6'-τρι-O-ακετυλο-3'-C(ακετοξυμεθυλο)-β-D-γλυκοκυρανοζυλο]5-φθοροουρακίλη (6)	31
3.2.6 Σύνθεση 1-[3'-C-(υδροξυμεθυλο)-β-D-γλυκοκυρανοζυλο] 5 φθοροουρακίλη (7)	32

3.3 Κινητικά πειράματα	33
3.3.1 Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	33
3.3.2 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	36
3.4 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb	52
3.5 Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου- αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη.....	54
4 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	57
4.1 Σκοπός της εργασίας.....	57
4.2 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου	59
4.3 Αποτελέσματα πειραμάτων σύνθεσης.....	60
4.4 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων	60
4.4.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου	60
4.4.2 Κινητική μελέτη ενώσεων 7 και GlcFU.....	62
4.5 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης	65
5 Βιβλιογραφία	73
5.1 Ελληνική βιβλιογραφία.....	73
5.2 Ξένη βιβλιογραφία	73

1 Εισαγωγή

1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές, εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δεν διατηρούνται σταθερά. Τα επίπεδα γλυκόζης, στα υγιή άτομα, ρυθμίζονται από τη δράση της ινσουλίνης. Στο ΣΔ, το πάγκρεας παράγει ελάχιστη ή καθόλου ινσουλίνη (διαβήτης τύπου I), είτε η ινσουλίνη που παράγεται δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό (διαβήτης τύπου II) οδηγώντας έτσι σε υπεργλυκαιμία. Ο διαβήτης τύπου I ή νεανικός διαβήτης πλήττει κυρίως άτομα νεαρής ηλικίας και οφείλεται στην καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που εκκρίνουν ινσουλίνη. Ο διαβήτης τύπου II 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 εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 χρονών και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών.

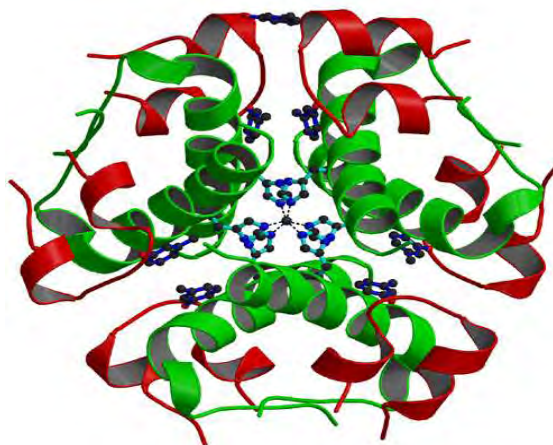
Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το διαβήτη (IDF) 194 εκ. άνθρωποι υποφέρουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως και αυτός ο αριθμός προβλέπεται να αυξηθεί σε 333 εκ. το 2025, κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού, τις αλλαγές στον τρόπο ζωής και της καθιστικής ζωής. Στην Ευρώπη σύμφωνα με τα στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, το 2000 υπήρχαν 33.3 εκ άτομα με διαβήτη ενώ προβλέπεται ότι το 2030 ο αριθμός αυτός θα φτάσει τα 48 εκ.

Έχει διαπιστωθεί ότι νουκλεοζίτες αποτελούμενοι από ολιγοσακχαρίτες συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση υπάρχουν σε πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντική αλλά και αντιδιαβητική δράση. Αυτή η ανακάλυψη αποτέλεσε το έναυσμα για την σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών οι οποίοι αναμενόταν να συμβάλλουν καθοριστικά στην αντιϊική, αντικαρκινική και αντιδιαβητική θεραπεία. Μια σχετικά νέα πιθανή εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων είναι η χρήση τους για την ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου II. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ένζυμο που μπορεί να αποτελέσει στόχο φαρμακευτικής παρέμβασης διότι εμπλέκεται στην διάσπαση του γλυκογόνου προς παραγωγή γλυκόζης (Oikonomakos, 2002). Εκλεκτικοί και ισχυροί

αναστολείς αυτού του ενζύμου θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στον έλεγχο της αποδόμησης του γλυκογόνου και κατά συνέπεια στον έλεγχο της παροχής γλυκόζης προς το κύτταρο (Somsák L. *et al*, 2008). Συγκεκριμένα, οι πυρανονουκλεοζίτες έχουν ανακαλυφθεί ως πιθανοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η οποία αποτελεί μοριακό στόχο για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών παραγόντων (Tsirkone *et al*, 2010).

1.2 Φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης

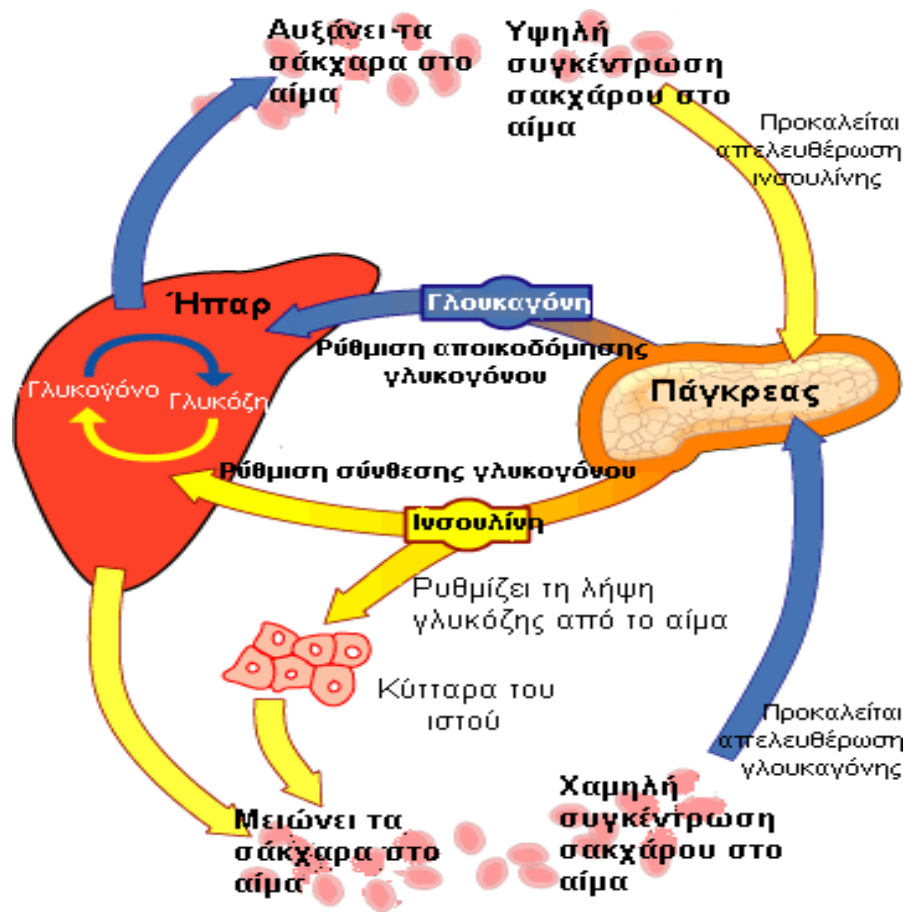
Η ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπίδιο, το οποίο παράγεται από τα β-κύτταρα της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος και διαδραματίζει έναν πολύπλευρο ρόλο στον μεταβολισμό.



Εικόνα 1: Δομή ινσουλίνης

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα γίνεται με τη 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. Η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα οδηγεί σε έκκριση ινσουλίνης. Η ινσουλίνη λαμβάνεται από το ήπαρ και το πάγκρεας και προκαλεί την έναρξη σύνθεσης πολυμερών γλυκόζης στο ήπαρ. Τα μόρια γλυκόζης αποθηκεύονται με τη μορφή του πολυμερούς, που ονομάζεται γλυκογόνο. Μια δεύτερη δράση της ινσουλίνης, είναι η ρύθμιση της πρόσληψης γλυκόζης από τα κύτταρα του ιστού. Αντίθετα, η γλυκαγόνη απελευθερώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι χαμηλά, με σκοπό την κινητοποίηση των μηχανισμών που θα ελευθερώσουν γλυκόζη στο αίμα.

Η ινσουλίνη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού γλυκογονογένεσης και μείωση των ρυθμών της γλυκονεογένεσης και γλυκογονόλυσης. Επίσης επιδρά άμεσα στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, καθώς αυξάνει τη διόδο 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 2).



Εικόνα 2: Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα

Όταν η συγκέντρωση γλυκόζης είναι αυξημένη στο αίμα, απελευθερώνεται από το πάγκρεας ινσουλίνη που κατευθύνεται στο ήπαρ. Η ινσουλίνη προκαλεί σύνθεση γλυκογόνου στο ήπαρ με επακόλουθο, τη μείωση της συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα (πορεία με κίτρινα βέλη). Η χαμηλή συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα οδηγεί

σε απελευθέρωση γλυκαγόνης που λαμβάνεται από το πάγκρεας και το ήπαρ. Στο ήπαρ η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης (πορεία με μπλε βέλη). Η γλυκόζη μεταφέρεται στο αίμα και αυξάνει την συγκέντρωση του σακχάρου.

1.3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I ή ινσουλινοεξαρτώμενος

Προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη και συνήθως εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 20 ετών γι'αυτό και χαρακτηρίζεται ως «νεανικός διαβήτης». Ο όρος ινσουλινοεξαρτώμενος σημαίνει ότι το πάσχον άτομο χρειάζεται ινσουλίνη για να ζήσει.

Στον διαβήτη τύπου I απουσιάζει η ινσουλίνη με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της γλυκαγόνης να βρίσκεται σε υψηλότερο επίπεδο από το φυσιολογικό. Επειδή υπάρχει ανεπάρκεια ινσουλίνης, παρεμποδίζεται η είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα. Το ήπαρ παραμένει σε κατάσταση γλυκονεογένεσης και κετογένεσης ενώ αναστέλλεται η γλυκόλυση.

Ο υψηλός λόγος γλυκαγόνης / ινσουλίνης στον διαβήτη προάγει επίσης τη διάσπαση του γλυκογόνου. Έτσι παράγεται περίσσεια γλυκόζης από το ήπαρ η οποία απελευθερώνεται στο αίμα. Η γλυκόζη απεκκρίνεται με τα ούρα (γλυκοζουρία) όταν η συγκέντρωση της είναι μεγαλύτερη από εκείνη που μπορεί να επαναρροφηθεί από τα νεφρικά σωληνάκια. Η απεκκρινόμενη γλυκόζη συνοδεύεται από νερό, οπότε ο διαβητικός που δεν λαμβάνει κάποια αγωγή πεινά και διψά.(πολυφαγία, πολυδιψία).

1.4 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, γνωστότερος και ως «γεροντικός διαβήτης», πλήττει κυρίως ενήλικες. Είναι ο πιο κοινός τύπος διαβήτη αντιστοιχώντας σε περισσότερο από το 90% των πασχόντων. Ο χαρακτηρισμός του ως διαβήτης των ενηλίκων, οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, αλλά τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έξαρση της πάθησης σε άτομα νεαρής ηλικίας. Λαμβάνοντας υπόψη τον ρυθμό με τον οποίο αυξάνονται οι περιπτώσεις εμφάνισης της συγκεκριμένης μεταβολικής διαταραχής υπολογίζεται ότι σε μερικές δεκαετίες, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, θα είναι ένα από τα συνηθέστερα και μεγαλύτερα προβλήματα της παγκόσμιας υγείας. (Diamond, 2003). Ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί σε άτομα με γενετική προδιάθεση ωστόσο δεν θεωρείται ούτε κληρονομικός, ούτε

μεταδοτικός. Άλλοι παράγοντες προδιάθεσης είναι το γήρας, η παχυσαρκία, η έλλειψη άσκησης καθώς και οι σύγχρονες διατροφικές συνήθειες και ο αγχώδης τρόπος ζωής.

Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου I, στον οποίο η ινσουλίνη απουσιάζει παντελώς, ο διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινσουλίνης. Σε αυτή τη μορφή διαβήτη έχουν παρατηρηθεί ακόμα και υψηλά επίπεδα ινσουλίνης. Στο διαβήτη τύπου II, η ινσουλίνη η οποία παράγεται από το πάγκρεας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται το σάκχαρο σαν κύρια πηγή ενέργειας. Συνεπώς, η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται – σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου I - από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου II ονομάζεται και **"μη ινσουλινοεξαρτώμενος"** (NIDDM: Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα των ιστών να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη και τα επαγόμενα αποτελέσματα της δράσης της. Σε μερικούς ασθενείς παρουσιάζεται μειωμένος αριθμός ή συγγένεια των υποδοχέων ινσουλίνης (υποδοχείς με δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης), ενώ σε άλλους, παρόλο που η σύνδεση της ινσουλίνης είναι κανονική, παρατηρείται ανώμαλη μεταγωγή σήματος εντός του κυττάρου.

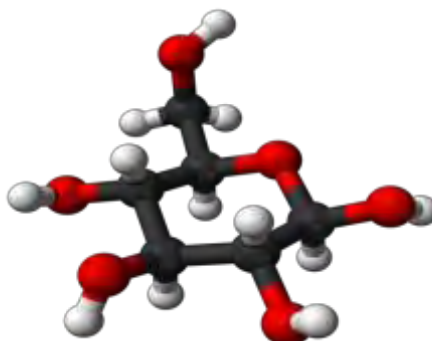
Η αγωγή για τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II περιλαμβάνει κυρίως κατάλληλη διατροφή, άσκηση και χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου II περιλαμβάνουν ινσουλίνη, σουλφονουλουρίες, διγουανιδίνες (μετμορφίνη), αναστολείς της α-γλυκοζιτάσης, θειαζολιδινεδιόνες, τα οποία έχουν διαφορετικό τρόπο και στόχο δράσης. (Οικονομάκος 2001).

Ωστόσο οι θεραπείες αυτές έχουν αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών αποδεικνύονται και ανεπαρκείς. Υπάρχει λοιπόν 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 (Οικονομάκος *et al.*, 2001). Σε αυτό το πλαίσιο ερευνών, η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου, μελετάται εντατικά.

2 Βασικές γνώσεις

2.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι 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 (Εικόνα 3). Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη. [Stryer,1997].



Εικόνα 3: Τρισδιάστατη απεικόνιση ενός μορίου γλυκόζης

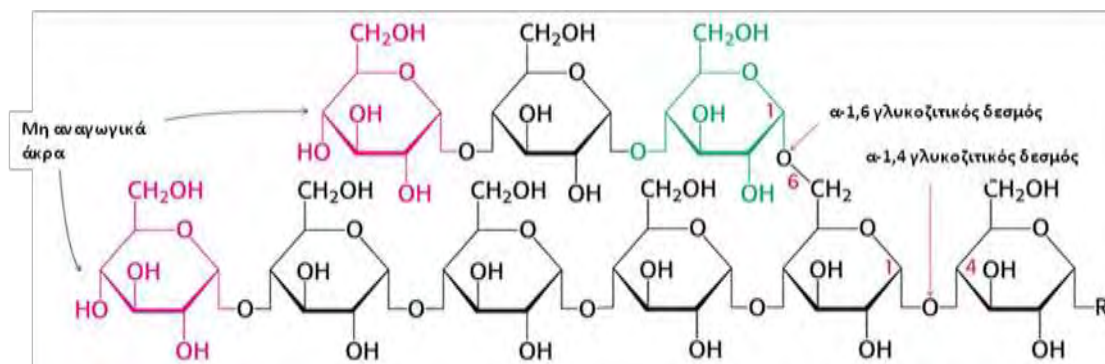
Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι, το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Έτσι ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό, ενώ τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν ως καύσιμο μόνο τη γλυκόζη. 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 φωσφορυλάση του γλυκογόνου (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).

2.2 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές το οποίο αποτελείται από μόρια α -D-γλυκόζης και αποτελεί την κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης (Stryer, 1997).



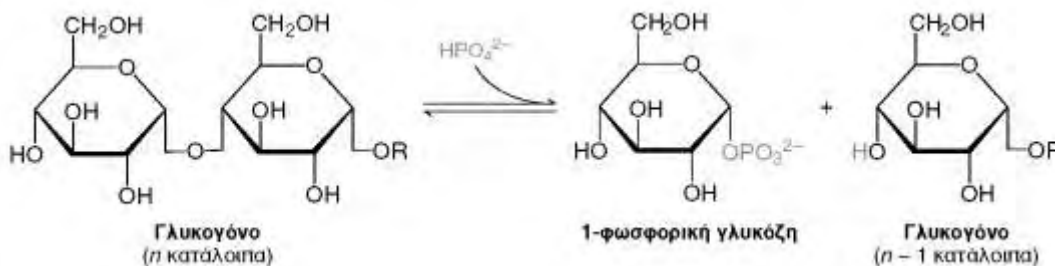
Εικόνα 4: Η δομή του γλυκογόνου

Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμοι μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς το γλυκογόνο

ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. 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 μύς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο. (Stryer 1997).

2.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του. Κατά την αντίδραση φωσφορόλυσης, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1- φωσφορικής γλυκόζης (Εικόνα 5).



Εικόνα 5 : Αποικοδόμηση γλυκογόνου (Stryer 1997)

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 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 μορίου 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].

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 μυς, 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 στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι 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 γλυκόζης (Stryer 1997).

Δομικά η GP είναι μια ομοδιμερή πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μία κοιλότητα που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινο-τελική και την καρβοξυ-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H₂O.

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση. (Stryer 1997)

Φυσιολογικά η δραστηριότητά της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο 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 1G,(PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GPb (μη φωσφορυλιωμένη GP). (Rath et al.2000)

2.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την θεραπεία του διαβήτη τύπου II (Oikonomakos 2001). Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν 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].

Ωστόσο η ύπαρξη των τριών ισομορφών (ηπατικής, μυϊκής , του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Συγκεκριμένα για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο άλλες ισομορφές. (Somsak et al., 2008). Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, 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) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί σε υψηλή ευκρίνεια.

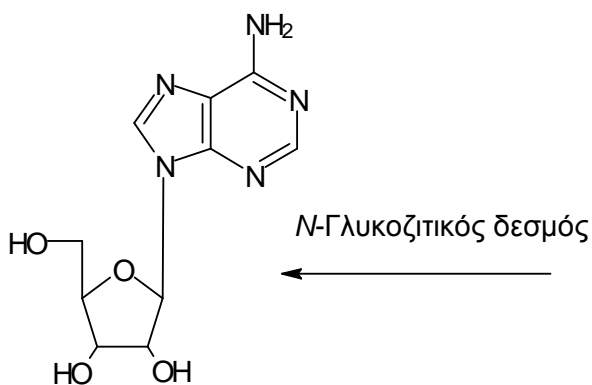
Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιοριστεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες 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 ακτίνες 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 περισσότερων ισχυρών αναστολέων (Blundell et al., 2002).

Απώτερος 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. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με $K_i \approx 1 \mu\text{M}$, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης (Witters & Avruch, 1978) στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο υπολογισμός υποθέτει πως το σύνολο του φαρμάκου φτάνει στο στόχο του. Αν όμως ληφθεί υπ' όψη η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου τότε απαιτείται αναστολέας με $K_i \approx 0.1 \mu\text{M}$.

Σε προκαταρκτικά κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα έχουν ταυτοποιηθεί 12 γλυκοπυρανονουκλεοζιτικά παράγωγα, τα οποία προκαλούν σημαντική αναστολή της ενζυμικής δράσης της GP (Tsirkone et al, 2010). Επιπλέον, μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπως οι 1-(3'-δεοξυ-3'-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο) πυριμιδινικοί νουκλεοζίτες, παρουσίασαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και επιπλέον έχει μελετηθεί η σχέση δομής-δράσης τους ώστε να δοθούν κατευθύνσεις προς την ανάπτυξη ισχυρότερων αναστολέων. Τέλος, νουκλεοζίτες που φέρουν αλκύνυλο υποκαταστάτες στην ετεροκυκλική βάση, εμφάνισαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

2.5 Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση διότι αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Ο νουκλεοζίτης προκύπτει από την ένωση μιας πουρινικής (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδινικής (θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) βάσης με τον C-1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg J. M. *et al*, 2001). Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης και χαρακτηρίζεται ως β - στερεοαπεικόνιση γιατί η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Η β - στερεοαπεικόνιση του N-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης

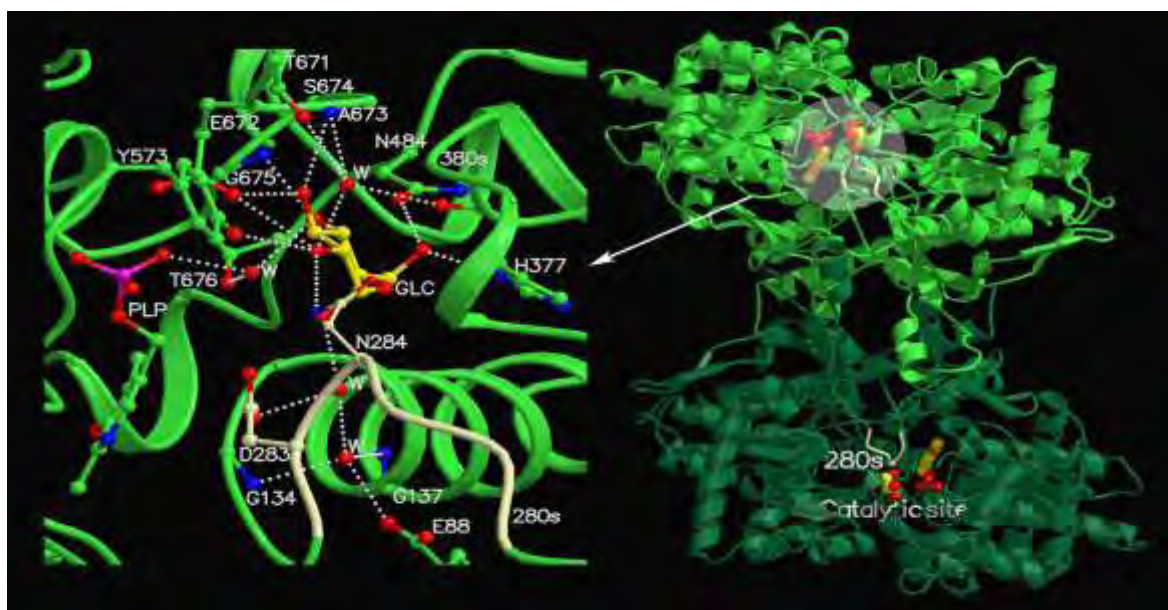
Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρουσιάζουν αντικαρκινικές και κυτταροστατικές ιδιότητες και αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Agelis *et al*, 2008; Agelis *et al*, 2007; Manta *et al*, 2010; Manta *et al*; 2009, Manta *et al*, 2009; Komiotis *et al*, 2008;). Επίσης, έχει διαπιστωθεί και η ικανότητα τους να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών (Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010). Επίσης επηρεάζουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς του πολλαπλασιασμού των ιών και για το λόγο αυτό παρέχουν ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντικρκινικών φαρμάκων. Τέλος, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν επιδείξει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Spanou C. *et al*, 2007), σαν ουσίες που μπορούν να επιβραδύνουν ή να αποτρέψουν την οξειδωση ενός υποστρώματος ενώ βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα. Αποτελούν δηλαδή αντιοξειδωτικές ουσίες (Halliwell B. 2001).

2.5.1 Γλυκοζιτικά και νουκλεοζιτικά παράγωγα ως υπο-γλυκαιμικοί παράγοντες

Στις μέρες μας, είναι πολύ διαδεδομένες οι διαταραχές μεταβολισμού των υδατανθράκων με πιο κύρια το σακχαρώδη διαβήτη. Γενικότερα, οι διαβήτες (τύπου I και τύπου II) είναι η κύρια αιτία της τύφλωσης και νεφρικής ανεπάρκειας και είναι γνωστό ότι αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, οδηγώντας σε καρδιακή προσβολή, έμφραγμα και ακρωτηριασμό των κάτω άκρων (Somsak et al, 2008). Περίπου το 90% των διαβητικών είναι τύπου II. Οι προσπάθειες για την αντιμετώπιση του έχουν επικεντρωθεί σε αγωγές που περιλαμβάνουν δίαιτα, άσκηση, υπογλυκαιμικά φάρμακα και αν αυτά αποτύχουν, σε χορήγηση ινσουλίνης. Οι προσεγγίσεις αυτές δεν είναι πάντοτε ικανοποιητικές, επομένως, υπάρχει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων με σκοπό τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο με αποτέλεσμα την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου.

Η ανακάλυψη αντιδιαβητικών φαρμάκων αποτελεί ένα από τους κύριους στόχους των ερευνητικών τμημάτων πολλών μεγάλων φαρμακοβιομηχανιών (AstraZeneca, Aventis Pharma, Pfizer, Novo Nordisk A/S, κ.ά.). Οι υπάρχουσες θεραπείες είναι ατελείς ή προκαλούν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Η διεθνής ερευνητική προσπάθεια εστιάζεται σε αντιγονοειδικές ή γενικότερα εξειδικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις με ενδεχομένως ριζικά αποτελέσματα. Η συγκεκριμένη μελέτη στοχεύει στη σύνθεση νέων τροποποιημένων γλυκοπυρανόζυλο νουκλεοζιτών ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου, λόγω του κεντρικού ρόλου που κατέχει, μεταξύ άλλων ενζύμων στο μεταβολισμό του γλυκογόνου χρησιμοποιείται ως μοριακός στόχος για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου σύνδεσης της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο της μυϊκής φωσφορυλάσης από κουνέλι. Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές. Υποδεικνύεται η θέση του βρόχου 280s με υποκίτρινο χρώμα.

Η γνώση της τρισδιάστατης δομής της α-D γλυκόζης ως συμπλόκου με τη μυϊκή φωσφορυλάση από κουνέλι βοήθησε στη λεπτομερή καταγραφή των αλληλεπιδράσεων αυτής με τα αμινοξέα στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου και ειδικότερα με την πλευρική αλυσίδα των Asn284 και Asp283. Τα αμινοξέα αυτά προέρχονται από τον εύκαμπτο βρόχο 280, ο οποίος παρεμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο.

Πρόσφατα, ένας αριθμός υποκαταστατών στη 3'-θέση (αξονικές και ισημερινές) της γλυκόζης έχει μελετηθεί *in silico* χρησιμοποιώντας α-D-γλυκόζη σαν μοντέλο [Lamprakis et al. 2009]. Τα αποτελέσματα προέβλεπαν ότι καμία από τις ισημερινές υποκαταστάσεις δε θα αποδώσει καλύτερα τις GPb συγγένειες από ότι η υδροξυλική ομάδα -OH στην α-D-γλυκόζη. Όμως, για την αξονική θέση -CH₂OH προβλέπεται να είναι πιο δραστική. Συνεπώς, αυτή η ελπιδοφόρα υποκατάσταση θεωρείται υποψήφια για τη σύνθεση και την *in vitro* κινητική ανάλυση.

Τέλος, σε προκαταρκτικά κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα έχουν ταυτοποιηθεί 12 γλυκοκυρανονουκλεοζιτικά παράγωγα, τα οποία προκαλούν σημαντική αναστολή της ενζυμικής δράσης της GP (Tsirkone *et al*, 2010). Επιπλέον, νουκλεοζίτες που φέρουν αλκύνυλο υποκαταστάτες στην ετεροκυκλική βάση, εμφάνισαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των ενώσεων που βρέθηκαν ως πιθανοί υποψήφιοι υπογλυκαιμικών φαρμάκων, καθώς επίσης και ο σχεδιασμός νουκλεοζιτικών δομικών αναλόγων αυξημένης συγγένειας και εξειδίκευσης προς τη φωσφορυλάση, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη φαρμάκων για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II.

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Γενική μεθοδολογία πειραμάτων σύνθεσης

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₅₄) ώστε να ελεγχθεί η αντίδραση. Η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα θεικού οξέος (H₂SO₄) 30% είτε υπό λυχνία υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας (254 nm).

Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων και επιτυγχάνεται με υπό πίεση αέρα (flash chromatography), σε silica gel (240-400, Merck grade).

Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι:

- Διάλυμα Α : Εξάνιο / Οξικός Αιθυλεστέρας 60/40
- Διάλυμα Β : Εξάνιο / Οξικός Αιθυλεστέρας 40/60
- Διάλυμα Γ : Εξάνιο / Οξικός Αιθυλεστέρας 50/50
- Διάλυμα Δ : Οξικός Αιθυλεστέρας / Μεθανόλη 90/10

Ξήρανση διαλυτών

Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως CH₃CN. Η ξήρανση τους γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves).

Ταυτοποίηση ενώσεων

Μετά τη σύνθεση των ενώσεων γίνεται ταυτοποίηση με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR λήφθηκαν με Bruker 500 MHz, χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) ή σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD). Το tetramethylsilan (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

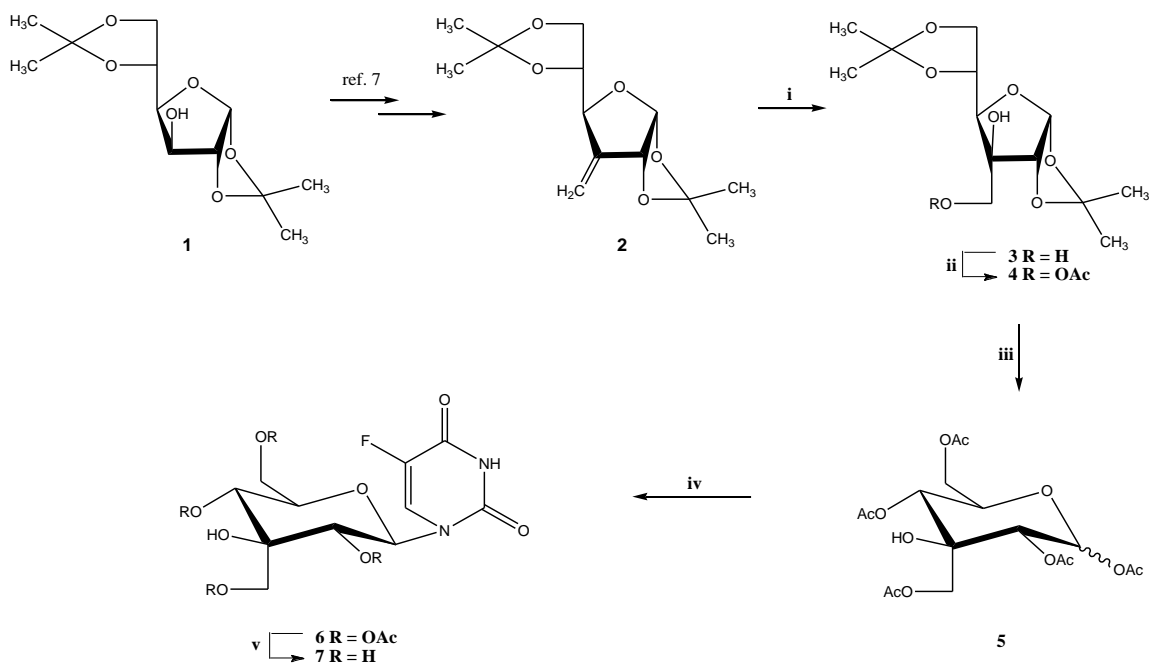
Οι μετρήσεις της γωνίας στροφής πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του πολωσίμετρου Autorol I. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($22\text{ }^\circ\text{C}$). Τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας καταγράφηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου PG Instruments Ltd.

Τα σημεία τήξης καταγράφηκαν χωρίς διόρθωση σε όργανο Mel-Temp Apparatus και μόνο για τα μη υγροσκοπικά στερεά.

3.2 Πειραματική διαδικασία

3.2.1 Μεθοδολογία σύνθεσης

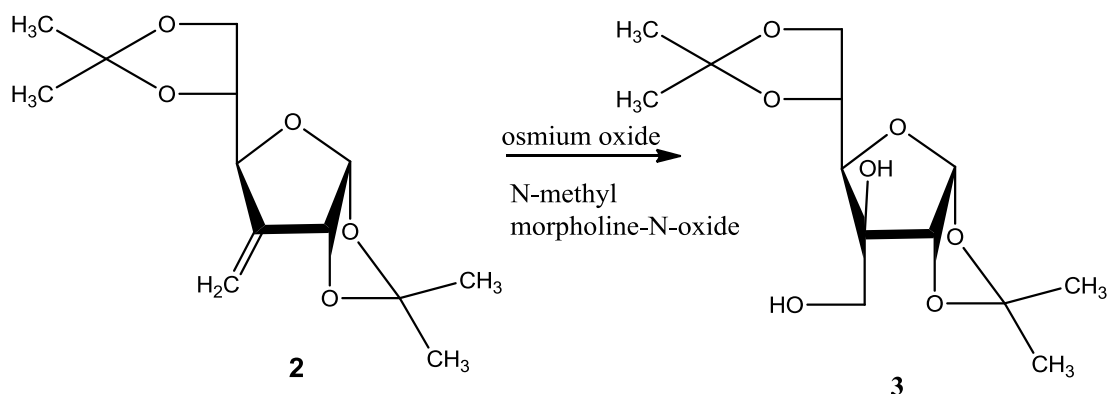
Η στρατηγική για τη σύνθεση του μορίου-στόχου, δηλαδή του 3'-C-υδροξυμεθυλονουκλεοζιτικού αναλόγου, ήταν να συντεθεί αρχικά ο κατάλληλος γλυκοζίτης, ο οποίος αποτελεί το βασικό ενδιάμεσο της σύνθεσης, και στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί η αντίδραση συμπύκνωσης του με την ετεροκυκλική βάση. Η σύνθεση της, 3'-C-ακετοξυμεθυλο-1,2,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο-*D*-γλυκοπυρανόζης (**5**) από την εμπορικά διαθέσιμη 1,2:5,6-di-*O*-ισοπροπυλιδένιο- α -*D*-γλυκοφουρανόζη (**1**) φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Η εμπορικά διαθέσιμη 1,2:5,6-δισ-*O*-ισοπροπυλιδενο-*D*-γλυκοφουρανόζη (**1**) μετατράπηκε στο παράγωγο 3-*C*-μεθυλένιο (**2**) έπειτα από οξείδωση με διχρωμικό πυριδίνιο (PDC/AC₂O) σε CH₂Cl₂ και επακόλουθη Wittig αντίδραση της παραγόμενης κατόνης με βρωμίδιο του μεθυλοτριφενυλοφωσφονίου (Ph₃PCH₂Br)/NaH, παρουσία *t*-αμυλο αλκοόλης σε τετραϋδροφουράνιο (THF). Η στερεοεκλεκτική *cis*-διυδροξυλίωση της (**2**) με τη χρήση καταλυτικής ποσότητας οξειδίου του οσμίου και *N*-μεθυλο μορφολίνο-*N*-οξειδίου οδήγησε στη διόλη (**3**), λόγω της στερεικής επίδρασης της ομάδας του 1,2-ισοπροπυλιδένιο. Η υδροξυλομάδα της (**3**) ακετυλιώθηκε για να παράσχει τον μονοακέτυλο αιθέρα (**4**) με απόδοση 80%. Η υδρόλυση της ένωσης (**4**) με τη χρήση όξινης ρητίνης Amberlite IR 120 (H⁺) σε μεθανόλη, ακολουθούμενη από επεξεργασία με Ac₂O σε πυριδίνη, οδήγησε στο μίγμα του ανωμερικού σακχάρου (**5**). Συμπύκνωση του τελευταίου με συλλιωμένη 5-φθοροουρακίλη, χρησιμοποιώντας TMSOTf ως καταλύτη σε ακετονιτρίλιο, έδωσε το προστατευμένο β-νουκλεοζιτικό ανάλογο (**6**), λόγω της συμμετοχής της 2'-ακετοξυομάδας. Τέλος, η απομάκρυνση όλων των ακετυλο προστατευτικών ομάδων της ένωσης (**6**) με άνυδρη μεθανολική αμμωνία, οδήγησε στη σύνθεση της ένωσης-στόχου 1-[3'-*C*-(υδροξυμεθυλο-β-*D*-γλυκοπυρανόζυλο)] 5-φθοροουρακίλη (**7**) με απόδοση 90%.

Αναλυτικά:

3.2.2 Σύνθεση 3-C-υδροξυμεθυλο-1,2:5,6-di-O-ισοπροπυλιδένιο- α -D-γλυκοφουρανόζης (3)

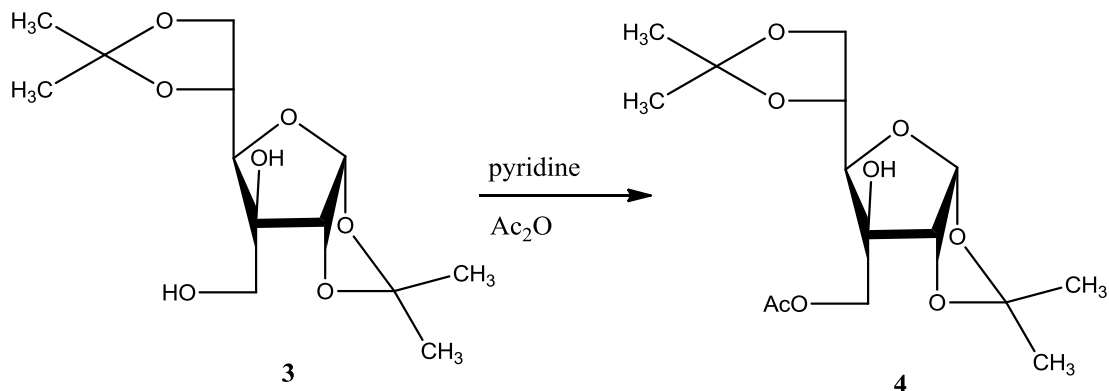


Σε διάλυμα της ολεφίνης (**2**) (3g, 11.71 mmol) σε ακετόνη (58.6 ml) και νερό (14.6 ml), προστέθηκαν στάγδην οξείδιο του οσμίου (0.029 ml, 0.12 mmol, 4% υδατικό διάλυμα) και N-μεθυλο μορφολινο-N-οξείδιο (0.72 ml, 70.00 mmol) στους 0° C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε όλη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και τερματίστηκε με προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος Na₂S₂O₃, και εν συνεχεία εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) (1000 ml). Η οργανική φάση ξεπλύθηκε με νερό (1 x 20 ml), ξηράνθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο (Na₂SO₄) και εξατμίστηκε πλήρως. Τέλος ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc,4:6) για να δώσει 2.89g της διόλης (**3**).

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**3**):

TLC (Σύστημα B)	R _f = 0.43
Απόδοση	85%
[α] _D	+25.00 c = 0.90

3.2.3 Σύνθεση 3-C-ακετοξυμεθυλο-1,2:5,6-di-O-ισοπροπυλιδένιο-α-D-γλυκοφουρανόζη (4)

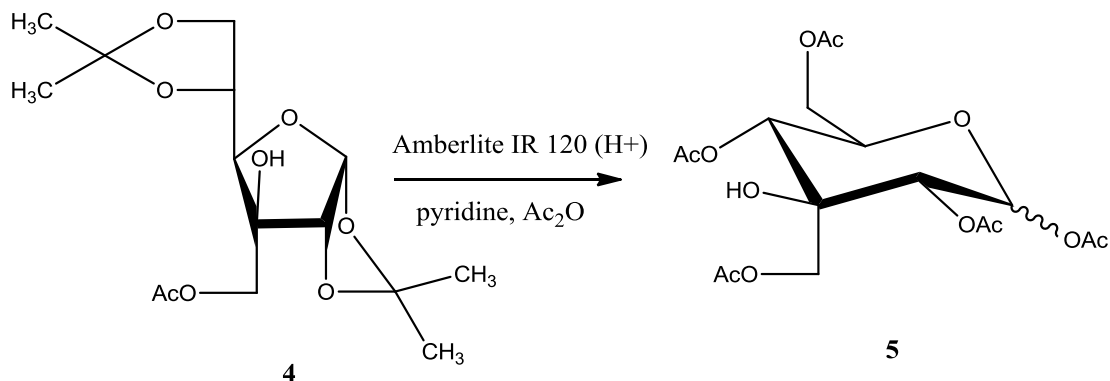


Η διόλη (3) (2.89 g, 9.95 mmol) διαλύθηκε σε μίγμα πυριδίνης (35 ml) και οξικού ανυδρίτη (Ac_2O) (18.4 ml). Η αντίδραση έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα και διεκόπη με προσθήκη MeOH στους 0°C και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα αραιώθηκε με EtOAc και ξεπλύθηκε με κορεσμένο NaHSO_4 , διττανθρακικό νάτριο και νερό. Το οργανικό εκχύλισμα ξηράνθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4), διηθήθηκε κι εξατμίστηκε πλήρως. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, 6:4) για να δώσει 2.65g από την ένωση (4).

Τα αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (4) είναι τα εξής:

TLC (Σύστημα A)	$R_f = 0.38$
Απόδοση	80%
$[\alpha]_D$	+51.0 $c = 0.14$

3.2.4 Σύνθεση 3-C-ακετοξυμεθυλο-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζη (5)

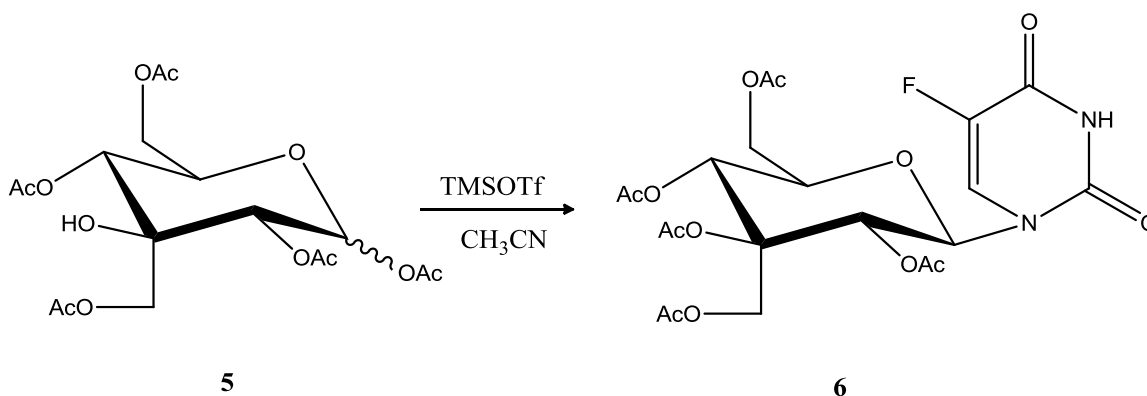


Σε διάλυμα της ένωσης **4** (2.65 g, 7.96 mmol) σε MeOH (12.4 ml) και H₂O (71.1 ml) προστέθηκε ρητίνη Amberlite IR 120 (H⁺) και το μίγμα θερμάνθηκε υπό αναβρασμό όλη τη νύχτα. Η αντίδραση διηθήθηκε και εξατμίστηκε πλήρως. Το υπόλειμμα εν συνεχεία διαλύθηκε σε μίγμα πυριδίνης (20.2 ml) και Ac₂O (10.6 ml). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και τερματίστηκε με προσθήκη MeOH στους 0° C. Τέλος, ακολούθησε συμπύκνωση υπό κενό. Το υπόλειμμα αραιώθηκε με EtOAc και ξεπλύθηκε με άνυδρο NaHSO₄, διττανθρακικό νάτριο και νερό. Το οργανικό εκχύλισμα ξηράνθηκε με άνυδροθειικό νάτριο, διηθήθηκε και εξατμίστηκε για να παραχθεί το σάκχαρο βάρους 1.81g (**5**).

Τα αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**5**) είναι τα εξής:

TLC (Σύστημα Γ)	R _f = 0.28
Απόδοση	54%
[α] _D	+13.0 c = 0.50

3.2.5 Σύνθεση 1-[2', 4', 6'-τρι-*O*-ακετυλο-3'-C(ακετοξυμεθυλο)-β-D-γλυκοκυρανοζυλο]5-φθοροουρακίλη (6)

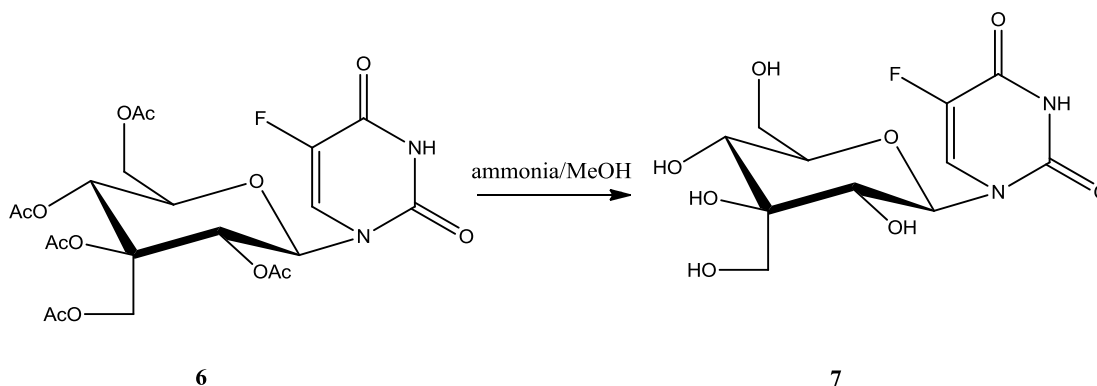


Διάλυμα που περιείχε 5-φθοροουρακίλη (0.78 g, 6.02 mmol), εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) (1.57 ml, 7.46 mmol) και σακχαρίνη (0.051 g, 0.28 mmol) σε άνυδρο διαλύτη ακετονιτρίλιο θερμάνθηκε υπό αναβρασμό για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε το σάκχαρο (5) (1.81 g, 4.30 mmol) και τριμεθυλσιλυλ τριφθορομεθανοσουλφονικό (TMSOTf) (1.09 ml, 6.02 mmol). Το μίγμα θερμάνθηκε υπό αναβρασμό για 1,5 ώρες, εξουδετερώθηκε με κορεσμένα διττανθρακικό νάτριο και στη συνέχεια εκχυλίστηκε με CH_2Cl_2 . Το οργανικό εκχύλισμα ξηράνθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθήθηκε και εξατμίστηκε. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης για να ληφθεί η ένωση **6**, με τη μορφή λευκού αφρού και σε ποσότητα 1.27g.

Τα αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**6**) είναι τα εξής:

TLC (Σύστημα B)	$R_f = 0.32$
Απόδοση	60%
$[\alpha]_D$	- 2.0 $c = 0.11$

3.2.6 Σύνθεση 1-[3'-C-(υδροξυμεθυλο)-β-D-γλυκοκυρανοζυλο] 5 φθοροουρακίλη (7)



Ο νουκλεοζίτης (**6**) (1.27 g, 2.58 mmol) κατεργάστηκε με κορεσμένο διάλυμα αμμωνία / MeOH στους 0° C με (106ml). Το διάλυμα αναδεύτηκε όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια συμπυκνώθηκε υπό πίεση για να παραχθεί η ένωση **7**, με τη μορφή λευκού αφρού βάρους 0.75g.

TLC (Σύστημα Δ)	$R_f = 0.2$
Απόδοση	90%
$[\alpha]_D$	+ 2.0 $c = 0.17$

3.3 Κινητικά πειράματα

3.3.1 Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η μυϊκή φωσφορυλάση γλυκογόνου b (GPb) που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες της παρούσης εργασίας έχει απομονωθεί από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer & Krebs (1962), με μικρές μόνο τροποποιήσεις (χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) (Melpidou and Oikonomakos, 1983).

Υλικά:

- Κουνέλια (2 μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃),
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO₃ και 10mM EDTA στους 100°C και συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους)

Όργανα:

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

Πορεία:

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

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από 2 κουνέλια. Οι μυς αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσεις με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο ύδατος 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^ο: Ώξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH_3COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολρότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κεκορεσμένο KHCO_3 και ογκομέτρηση του διαλύματος.

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειϊκό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5500rpm για 30min στους 0-4°C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH7.0 όγκου ίσο με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1M pH7.0 ίσο με το 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στα 8.8. Μετά από επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH₃COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετράται.

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1mL AMP 0.1M (pH 7.0) και (CH₃COO)₂Mg 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, (το AMP και το (CH₃COO)₂Mg διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστο 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραιώσης (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min 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 στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα

6h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP.

Βήμα 6^ο: Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου

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

3.3.2 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

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 ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου 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 *αντίστροφη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, προστίθενται μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Πορεία:

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται και λαμβάνεται το εναιώρημα ένζυμου περιεκτικότητας ~500 $\mu\text{g/mL}$. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που

περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 0.2 % (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου 5% (v/v). Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται επίσης το υπόστρωμα για α-D-Glc-1-P 2.0mM με προσθήκη 200μL υποστρώματος α-D- Glc -1-P 9.0mM, 20μL AMP 45mM και 500μL H₂O (κατάλληλο για τέσσερα δείγματα).

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση στους 30°C επί 15 λεπτά και το υπόστρωμα επί 5 λεπτά. Μετά την επώαση, 180μL από το ενζυμικό μείγμα προστίθενται στον σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε: 5.0μg ένζυμου ανά mL, 1.0mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υπόστρωμα α-D- Glc-1-P 2.0mM, 50mM υδροχλωρικής τριαιθανολαμίνης, 100mM KCl και 1mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονται δείγματα των 200μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50μL 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).

Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m , mol) 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).

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 αραιώση 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.

Πορεία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 5% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωληνίων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D- Glc-1-P 2.0 έως 20mM, με προσθήκη 200μL από το αντίστοιχο υπόστρωμα α-D- Glc-1-P, 18μL AMP 50mM και 502μL 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 σωληνίες των υποστρωμάτων σταδιακά προστίθενται 180λ ενζυμικού μίγματος. Στις συνθήκες αυτές, στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, έχουμε: 5.0μg ένζυμο/mL, AMP 1.0mM, γλυκογόνο 1%, υπόστρωμα α-D- Glc-1-P 1.0-20mM, 50 mM ιμιδαζολίου, 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 200μL από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωληνίες που περιέχουν 50μL SDS 1.0% .

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).

Διαλύματα υποστρωμάτων	A	B	Γ	Δ	E
	G1P 2mM	G1P 4mM	G1P 6mM	G1P 10mM	G1P 20mM
G1P	200μL (9mM)	200μL (18mM)	200μL (27mM)	200μL (45mM)	200μL (90mM)
AMP (50mM)	18 μL	18 μL	18 μL	18 μL	18 μL
H ₂ O	502 μL	502 μL	502 μL	502 μL	502 μL
Τελικός Όγκος	720μL	720μL	720μL	720μL	720μL

Προσδιορισμός Ki 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. Τέτοιοι αναστολείς είναι αρκετά κοινοί στη φύση.

Η σταθερά αναστολής K_i αποτελεί μια ένδειξη για το πόσο ισχυρός είναι ο αναστολέας. Είναι η απαιτούμενη συγκέντρωση για να επιτύχει το μισό της μέγιστης αναστολής του, ένας συναγωνιστικός αναστολέας. Ο προσδιορισμός της K_i προϋποθέτει τη μελέτη της κινητικής του ενζύμου παρουσία συγκεκριμένης συγκέντρωσης του αναστολέα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις G1P (1-φωσφορικής γλυκόζης).

Υλικά :

- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (α -D- Glc-1-P) 9, 18, 27, 45, 90 mM
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50mM β -φωσφογλυκερόλης (β -GP), 50mM β -μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA)
- Γλυκογόνο 1 % (w/v)
- 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 SDS 1%
- 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

Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε γλυκερόλη παίρνουμε 10μl και το αραιώνουμε με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. 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 50:50:1 v/v, 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 μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης (2, 4, 6, 10, 20 mM). Ο αναστολέας μελετάται σε διάφορες συγκεντρώσεις και σε κάθε συγκέντρωση για όλες τις συγκεντρώσεις του υποστρώματος. Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση 15 min σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 30° C.

Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η Ki, και συγκεντρώσεις α-D- Glc-1-P 9, 18, 27, 45, 90 και AMP 50mM ώστε μετά την προσθήκη του

ενζυμικού διαλύματος (180μl) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P να είναι 2, 4, 6, 10 και 20 mM και της AMP 1mM. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720 μL. Τέλος, το πείραμα ελέγχου (control) αποτελεί η σταθερά Km. Τα διαλύματα υποστρώματος τοποθετούνται πριν την εκτέλεση του πειράματος στο υδατόλουτρο ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με το ενζυμικό διάλυμα.

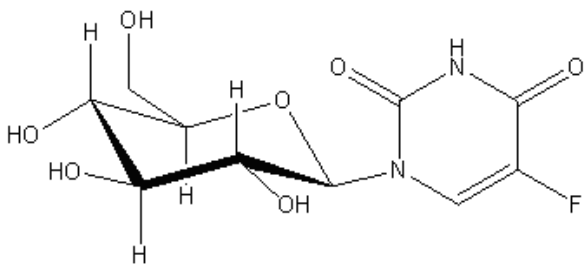
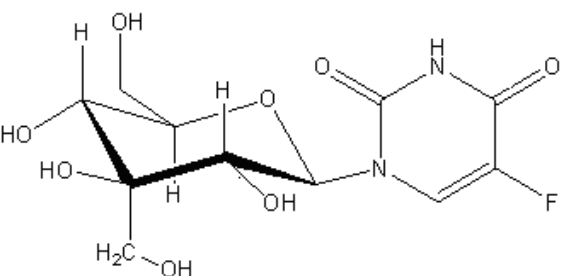
Διαλύματα υποστρωμάτων	A	B	Γ	Δ	E
	G1P 2mM	G1P 4 mM	G1P 6 mM	G1P 10 mM	G1P 20 mM
G1P	200μL (9mM)	200μL (18mM)	200μL (27mM)	200μL (45mM)	200μL (90mM)
AMP (50mM)	18 μL	18 μL	18 μL	18 μL	18 μL
Αναστολέας	X μL	X μL	X μL	X μL	X μL
H ₂ O	720- (200+18+X) μL	720- (200+18+X) μL	720- (200+18+X) μL	720- (200+18+X) μL	720- (200+18+X) μL
Τελικός Όγκος	720 μL	720 μL	720 μL	720 μL	720 μL

Εκτέλεση του πειράματος

Μετά την επώαση, του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 180μl 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 λεπτών), λαμβάνονται από 200 μL και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1%. Έτσι σταματά η ενζυμική αντίδραση, αφού το απορρυπαντικό αποδιατάσσει και αδρανοποιεί το ένζυμο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μια διαφορετική συγκέντρωση α-D- Glc-1-P.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 2.5 ml διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου 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 Ρi που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit, προκειμένου να προσδιοριστεί η Κi. 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 τους αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και περιγραφή των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν για τον προσδιορισμό της Κi.

Όνομα	Χημική δομή ένωσης	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν
GlcFU		10μM, 20μM, 40μM
7		15μM, 30μM, 50μM

Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην 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 αμιζών 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 2.5mL από το

αντιδραστήριο χρώσης. Μετά από ισχυρή ανάμιξη οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850nm. Επίσης γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών.

Παρασκευή τυφλών

Ο προσδιορισμός της K_i προκύπτει από τον 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 τη ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με τη συγκέντρωση της υψηλότερης α -D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται (90mM), 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 όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$.

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 μmol υποστρώματος ή παραγωγή 1 μmol 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, $v = V_{\max}[S]/K_m + [S]$ (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} με την

προϋπόθεση σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος με μετατροπή της υπερβολής της εξίσωσης Michaelis-Menten στη γραμμική Lineweaver-Bruk:

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



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

Υπολογισμός της φαινόμενης K_m ($K_{m,app}$) και της K_i – Μοντέλο συναγωνιστικής αναστολής (competitive inhibition)

Συναγωνιστική αναστολή είναι μία μορφή ενζυμικής αναστολής όπου η πρόσδεση ενός αναστολέα στο ένζυμο εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος και αντίστροφα.

Μηχανισμός

Στην συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας συνδέεται στο ίδιο ενεργό κέντρο όπου συνδέεται και το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου, στο καταλυτικό κέντρο, χωρίς να υπάρξει κάποια αντίδραση. Έτσι, το μόριο του υποστρώματος δεν μπορεί να συνδεθεί όταν ο αναστολέας είναι ήδη συνδεδεμένος και το αντίθετο. Σε αυτή την περίπτωση, η V_{\max} της αντίδρασης παραμένει η ίδια (καθώς η παρουσία του αναστολέα μπορεί να υπερνικηθεί από υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος), ενώ η φαινόμενη συγγένεια του υποστρώματος στο καταλυτικό

κέντρο μειώνεται (αυτό σημαίνει ότι η φαινόμενη σταθερά διάστασης K_d ($K_{\text{dissociation}}$) αυξάνεται). Η μεταβολή της K_m (σταθερά Michaelis-Menten) ακολουθεί την αλλαγή της K_d . Έτσι η φαινόμενη K_m ($K_{m,\text{apparent}}$) αυξάνεται και η τιμή της δίνεται από τον τύπο:

$$K_{m,\text{app}} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Εδώ θα πρέπει να επισημανθεί ότι δεν είναι απαραίτητο αναστολέας και υπόστρωμα να δένονται στο ίδιο κέντρο του ενζύμου. Από τη στιγμή που η πρόσδεση του αναστολέα εμποδίζει τη πρόσδεση του υποστρώματος ο μηχανισμός αναστολής είναι συναγωνιστικός. Μπορεί η πρόσδεση του αναστολέα να γίνεται σε ένα δευτερεύον κέντρο του ενζύμου και αυτό να προκαλεί τέτοιες δομικές αλλαγές που να μην επιτρέπουν τη σύνδεση του υποστρώματος.

Μαθηματική επεξεργασία

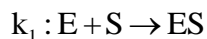
Στην απλούστερη περίπτωση ενός μονοϋποκατεστημένου ενζύμου η οποία υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten, το τυπικό σχήμα

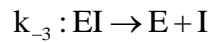
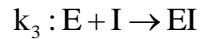
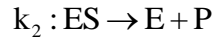
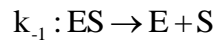


τροποποιείται ώστε να περιλάβει τη σύνδεση του αναστολέα στο ελεύθερο ένζυμο:



Πρέπει να τονιστεί ότι ο αναστολέας I δεν δένεται στο σύμπλοκο ES και το υπόστρωμα S δεν δένεται στο σύμπλοκο EI. Είναι γενικότερα αποδεκτό ότι αυτή η συμπεριφορά είναι ενδεικτική για δύο ενώσεις, οι οποίες δένονται στο ίδιο κέντρο, όμως αυτό δεν είναι αυστηρά απαραίτητο. Για να παραχθεί η εξίσωση που περιγράφει αυτή την κινητική, ορίζονται αρχικά οι μικροσκοπικές σταθερές ισορροπίας για κάθε βήμα:





Γίνεται η παραδοχή μίας στάσιμης κατάστασης, ότι δηλαδή η συγκέντρωση κάθε μορφής του ενζύμου (ελεύθερο ή συμπλοκοποιημένο) παραμένει αμετάβλητη.

$$\frac{dE}{dt} = \frac{d}{dt} ES = \frac{d}{dt} EI = 0$$

Επιπλέον, η γνωστή συνολική ενζυμική συγκέντρωση είναι $E_T = E + ES + EI$, η ταχύτητα μετριέται υπό τον όρο ότι οι συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα δεν αλλάζουν ουσιαστικά και ένα ασήμαντο ποσό προϊόντος έχει συσσωρευθεί. Έτσι δημιουργούνται οι παρακάτω εξισώσεις:

$$(1) E_T = E + ES + EI$$

$$(2) \frac{dE}{dt} = 0 = -k_1 * E * S + k_{-1} * ES + k_2 * ES - k_3 * E * I + k_{-3} * EI$$

$$(3) \frac{dES}{dt} = 0 = k_1 * E * S - k_{-1} * ES - k_2 * ES$$

$$(4) \frac{dEI}{dt} = 0 = k_3 * E * I - k_{-3} * EI$$

Όπου S, I και E_T είναι γνωστά. Η αρχική ταχύτητα ορίζεται ως $v = dP/dt = k_2 ES$ έτσι πρέπει να καθορισθεί η άγνωστη ES ως προς τις S, I and E_T

Από την (3) μπορούμε να προσδιορίσουμε την E ως προς ES :

$$k_1 * E * S = (k_{-1} + k_2) * ES$$

Διαιρώντας με $k_1 S$:

$$E = \frac{(k_{-1} + k_2) * ES}{k_1 * S}$$

Αντικαθιστώντας τον όρο $(k_{-1} + k_2)/k_1$ με την μακροσκοπική σταθερά K_m :

$$(5) E = \frac{K_m * ES}{S}$$

Αντικαθιστώντας την (5) στην (4) έχουμε:

$$0 = \frac{k_3 * I * K_m * ES}{S} - k_{-3} * EI$$

Από όπου προκύπτει:

$$EI = \frac{k_3 * I * K_m * ES}{S * k_{-3}}$$

Σε αυτό το σημείο μπορούμε να καθορίσουμε τη σταθερά διάστασης για τον αναστολέα ως $K_i = k_{-3}/k_3$, έτσι έχουμε

$$(6) EI = \frac{I * K_m * ES}{S * K_i}$$

Αντικαθιστώντας τις (5) και (6) στην (1) έχουμε:

$$E_T = K_m * \frac{ES}{S} + ES + \frac{I * K_m * ES}{S * K_i}$$

Λύνοντας ως προς ES, βρίσκουμε:

$$E_T = ES * \left(\frac{K_m}{S} + 1 + \frac{I * K_m}{S * K_i} \right) = ES * \frac{K_m * K_i + S * K_i + I * K_m}{S * K_i}$$

$$\text{οπότε } ES = \frac{E_T * S * K_i}{K_m * K_i + S * K_i + I * K_m}$$

Επιστρέφοντας στην έκφραση της ταχύτητας v , τώρα έχουμε:

$$v = k_2 * ES = \frac{k_2 * E_T * S * K_i}{K_m * K_i + S * K_i + I * K_m}$$

Τροποποιώντας την εξίσωση και αντικαθιστώντας την k_2 με k_{cat} , έχουμε

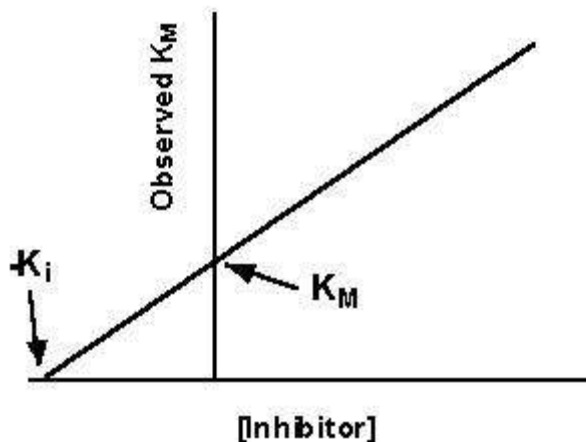
$$v = \frac{k_{cat} * E_T * S}{K_m + S + K_m * (I/K_i)}$$

Τέλος αν αντικαταστήσουμε το $k_{cat} * E_T$ με V_{max} παίρνουμε:

$$v = \frac{V_{max} * S}{S + K_m * (1 + I/K_i)}$$

Επίσης, ο υπολογισμός της σταθεράς αναστολής K_i σε συστήματα καθαρής συναγωνιστικής αναστολής μπορεί να γίνει από το αντίστοιχο δευτερεύον διάγραμμα των $K_{m,app}$ ως προς τις συγκεντρώσεις του αναστολέα και θεωρώντας ότι η τιμή της K_i αντιστοιχεί σε $K_{m,app}=0$ (Segel, 1975).

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς K_i , ουσιαστικά βρίσκουμε την $K_{m,app}$ του ενζύμου για τουλάχιστον 3 συγκεντρώσεις του αναστολέα. Η $K_{m,app}$ είναι η σταθερά K_m του ενζύμου παρουσία του αναστολέα, σε αντίθεση με την K_m του ενζύμου που είναι απουσία αναστολέα.



Εικόνα 8: Η γραφική παράσταση που αποκαλύπτει τη σταθερά αναστολής K_i . Ο άξονας του y για $\chi=0$ φανερώνει την πραγματική K_m του ενζύμου (απουσία αναστολέα) και για $\chi \neq 0$ τις K_{mapp} λόγω της παρουσίας του αναστολέα στο ενζυμικό διάλυμα.

3.4 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι θα πρέπει στο διάλυμα του ενζύμου να μην υπάρχει AMP. Για τον λόγο αυτό ακολουθείται διαδικασία για την απομάκρυνση του.

Το διάλυμα του ενζύμου υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM BES (pH 6.7) για 16h. Στη συνέχεια πραγματοποιείται κατεργασία με ενεργό ζωάνθρακα ώστε να απομακρυνθούν τα νουκλεοτίδια. Στη συνέχεια, μετρείται η οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος 280nm 260nm. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων (A_{260}/A_{280}) πρέπει να είναι ~ 0.53 .

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Έτσι δίδεται χρόνος στην πρωτεΐνη να οργανωθεί σε κρυστάλλους και όχι σε άμορφο ίζημα. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T state) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο batch [Oikonomakos et al, 1985]. Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης

κρυστάλλων GPb (T state), η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου P43212) εντός γυάλινων σωλήνων.

Υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα BES, σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθανίου(10mM BES, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT pH 6.7)
- Διάλυμα DTT 200mM, pH 6.7
- Διάλυμα IMP 100mM, pH 6.7
- Διάλυμα σπερμίνης 200mM, pH 6.7
- Πυρήνες κρυστάλλωσης
- Εναιώρημα GPb περιεκτικότητας 20-30 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα BES.
- Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3 nm και μήκους 3 cm

Όργανα:

- Φασματοφωτόμετρο UV

Πορεία:

Για την ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων (ομάδας συμμετρίας χώρου P₄₃2₁2) της GP χρησιμοποιείται η στατική μέθοδος (batch method). Το ένζυμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από AMP. Ο λόγος των απορροφήσεων A₂₆₀/A₂₈₀, αποτελεί κριτήριο ύπαρξης νουκλεοτιδίων και είναι συνήθως 0.62, κατάλληλος για την καλύτερη διατήρηση του ενζύμου και της ενζυμικής δραστηριότητας. Στην τιμή αυτή ο γραμμομοριακός λόγος ενζύμου: AMP είναι περίπου 1:1. Για την απομάκρυνση του AMP (όπου κρίνεται αναγκαίο) το ένζυμο κατεργάζεται με ενεργό ζωικό άνθρακα (Norit A) σε αναλογία ενζύμου:ζωικός άνθρακας περίπου 1:1 (κ.β.) (Melpidou & Oikonomakos, 1983). Λόγος των απορροφήσεων A₂₆₀/A₂₈₀ 0.53-0.54 θεωρείται ενδεικτικός της απομάκρυνσης του AMP (Kastenschmidt et al., 1968).

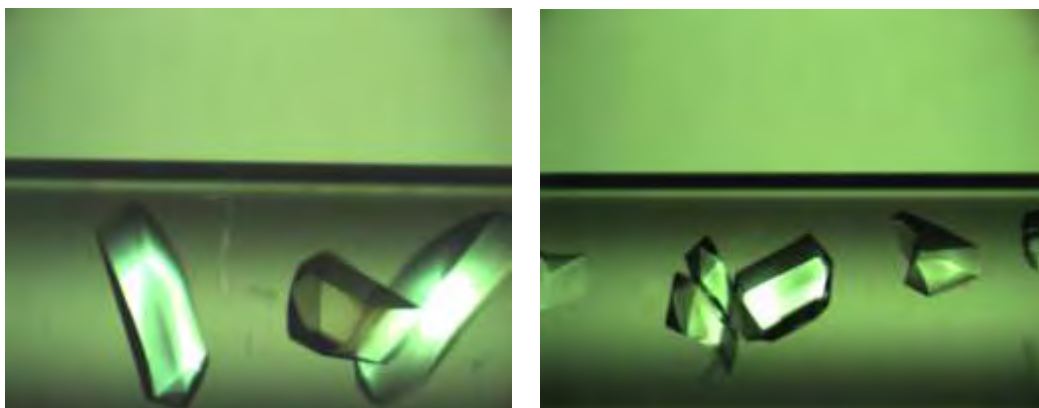
Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι.. Στη συνέχεια το

διάλυμα μεταφέρεται σε μικρούς σωλήνες μήκους περίπου 3 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3 mm, των οποίων τα δύο άκρα κλείνονται με parafilm.

Οι κρύσταλλοι της φυσικής T διαμόρφωσης της GPb αναπτύσσονται από μίγμα 20-30 mg/ml καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 1 mM IMP, 10 mM BES/NaOH (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN₃ στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραίωσης (Oikonomakos *et al.*, 1985). Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 h, ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας των κρυστάλλων είναι $a=b=128.6 \text{ \AA}$, $c=116.1 \text{ \AA}$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι ισόμορφοι με τους κρυστάλλους που αναπτύσσονται παρουσία οξικού μαγνησίου αντί σπερμίνης. Συνήθως το μέγεθος αυτών είναι 0.2-0.5mm, κατάλληλο για την περαιτέρω χρήση αυτών σε πειράματα περίθλαση ακτινών

X. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι: $I = I_0 * e^{-\mu t}$



Εικόνα 9: Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της GPb στην T διαμόρφωση.

3.5 Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου- αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη.

Υλικά:

- Διάλυμα αναστολέα

- Κρύσταλλοι GPb
- Ρυθμιστικό διάλυμα BES (10mM BES/NaOH, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT pH 6.7)
- Τριχοειδείς σωλήνες (διαμέτρου 1.0, 2.0 mm)
- Κερί
- Σύριγγες

Όργανα:

- Στερεοσκόπιο
- Πιπέτες Pasteur

Η κρυσταλλογραφική μελέτη των εν δυνάμει αναστολέων έχει σαν σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου δράσης των ενώσεων που υπέδειξαν τα κινητικά πειράματα.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο- αναστολέας πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της συγκρυστάλλωσης είτε με τη μέθοδο του εμποτισμού προσχηματισμένων κρυστάλλων του ενζύμου με διάλυμα αναστολέα, όπου η ουσία διαχέεται εντός των καναλιών του κρυστάλλου και συνδέεται στην πρωτεΐνη, στο κέντρο σύνδεσης για το οποίο παρουσιάζει συγγένεια. Στην περίπτωση όπου το σύμπλοκο σχηματίζεται με τη μέθοδο του εμποτισμού ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες θα γίνει η συλλογή δεδομένων (κρυογενείς συνθήκες ή σε θερμοκρασία δωματίου) ακολουθείται διαφορετική διαδικασία. Οι κρύσταλλοι αρχικά μεταφέρονται σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM BES/NaOH pH 6.7 εντός τριβλίου Petri. Στη συνέχεια, επιλέγονται μεμονωμένοι κρύσταλλοι οι οποίοι δεν φέρουν ορατές προσμίξεις ή άλλες εναποθέσεις μικροκρυστάλλων στην επιφάνειά τους οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή δεδομένων.

Στην περίπτωση συλλογής σε θερμοκρασία δωματίου οι κρύσταλλοι μεταφέρονται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur μέσα σε μικρούς τριχοειδείς σωλήνες και το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο τον περιβάλλει απομακρύνεται με χρήση μικρών λωρίδων απορροφητικού χαρτιού για να αντικατασταθεί από το διάλυμα του αναστολέα που θα μελετηθεί. Το διάλυμα του αναστολέα προστίθεται στον σωλήνα και αφήνεται για ικανό χρονικό διάστημα ώστε να εμποτίσει τον κρύσταλλο (π.χ. ~2-3 hrs). Στη συνέχεια το διάλυμα απομακρύνεται από το σωλήνα και στα δύο

του άκρα τοποθετείται μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος BES (για την αποφυγή αφυδάτωσης του κρυστάλλου). Τέλος ο τριχοειδής σωλήνας σφραγίζεται και στα δύο του άκρα με τη χρήση μικρής ποσότητας κεριού και τοποθετείται στο γωνιόμετρο για την έκθεση του στη δέσμη ακτίνων X.

4 Αποτελέσματα-Συζήτηση

4.1 Σκοπός της εργασίας

Η αύξηση αριθμού των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη τύπου II έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με στόχο το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Τα φάρμακα αυτά έχουν στόχο ένζυμα και υποδοχείς που συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και αποσκοπούν σε μία αποτελεσματική αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 [Kurukulasuriya et al, 2003].

Το ήπαρ είναι ένα όργανο που έχει ως σκοπό να αποκαθιστά της ενεργειακές ανάγκες των άλλων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP, Liver GP), ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, αποτελεί έναν από της μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η αναστολή του ενζύμου αυτού έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου και τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών. Σύμφωνα με τους Agius et al. (2001), η φωσφορυλάση και η γλυκοκινάση αποτελούν δύο ένζυμα που φαίνεται να έχουν κατά κύριο λόγο τον έλεγχο της ρύθμισης της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τα ηπατικά κύτταρα.

Ο σχεδιασμός με βάση τη μακρομοριακή δομή, η σύνθεση, η βιοχημική και βιολογική μελέτη της ουσίας αποτελεί σήμερα μία πορεία εργασιών με στόχο την ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και μεγάλη συγγένεια της την πρωτεΐνη-στόχο. Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της πορείας και συγκεκριμένα αποσκοπεί στη βιοχημική και κρυσταλλογραφική μελέτη ουσιών που έχουν συντεθεί μετά από κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό και έχουν ως στόχο το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Η παρούσα διατριβή έχει ως στόχο τη μελέτη του ενζύμου της φωσφορυλάσης γλυκογόνου για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης ενζύμου:αναστολέα και το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου:αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης \leftrightarrow σύνθεσης γλυκογόνου στο σακχαρώδη διαβήτη τυπου II. Έτσι, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά σύνθεση οργανικής ένωσης αναλόγου γλυκόζης και στη συνέχεια η κινητική μελέτη δύο αναλόγων της γλυκόζης, για τον

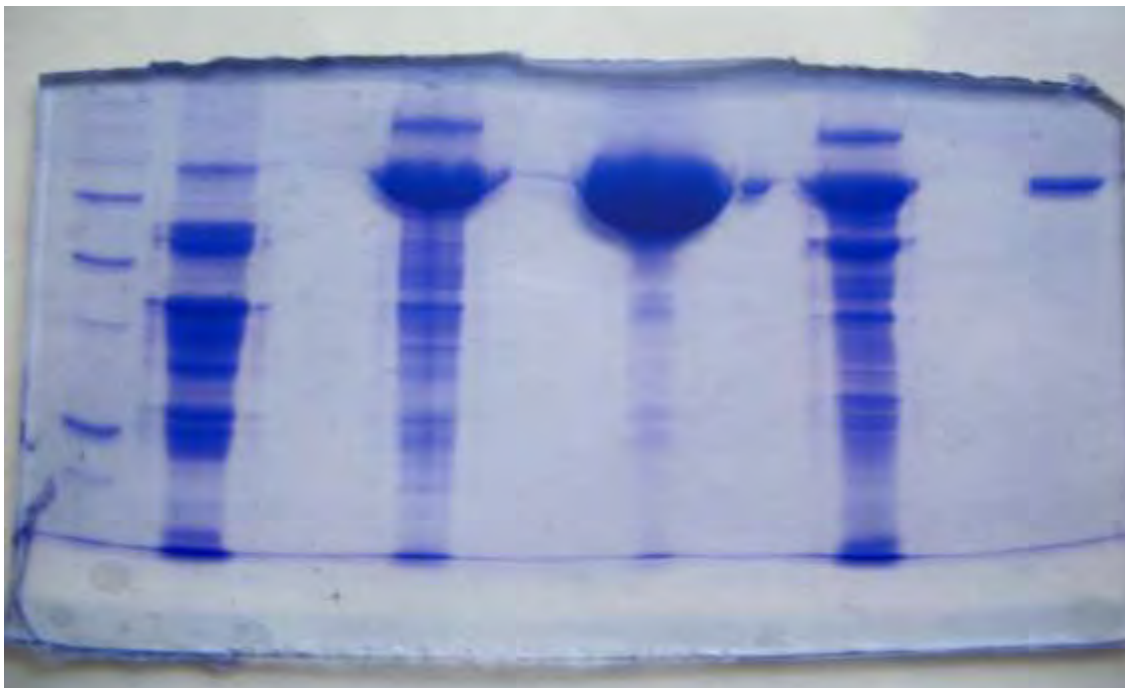
προσδιορισμό της ικανότητάς της να αναστέλλουν τη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου b από κουνέλι. Τα ανάλογα αυτά επιλέχθησαν με βάση πρόσφατες μελέτες της σύνδεσης μίας σειράς 3'φθοροπυριμιδινών της γλυκοπυρανόζης τα οποία εμφάνισαν μέτρια ανασταλτική δράση ως προς τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου β (IC50 = 6.5 mM έως 46.4 μM) (Tsirkone et al., 2010). Σε όλες τις ενώσεις αυτές οι 3' υποκαταστάτες της γλυκοπυρανόζης ήταν στην 3' ισημερινή θέση. Με δεδομένο πως το 3' άτομο άνθρακα της γλυκοπυρανόζης βρίσκεται σε απόσταση 5 Å από την γ-φωσφορική ομάδα της PLP στο σύμπλοκο GPb-α-D-γλυκόζη (Martin et al., 1990), στην 3' αξονική κατεύθυνση κατάλληλοι υποκαταστάτες στη θέση αυτή θα ενίσχυαν τη σύνδεση αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο μέσω νέων αλληλεπιδράσεων με τη φωσφορική αυτή ομάδα.

Η επιλογή του μυϊκού ισοενζύμου της GP κουνελιού έγινε λόγω της μεγάλης ομολογίας που παρουσιάζουν το ηπατικό και το μυϊκό ένζυμο (80% στην αμινοξική αλληλουχία ολόκληρων των μορίων και 100% στα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ισοένζυμα του ανθρώπου: «ηπατικό», «μυϊκό» και «εγκεφάλου», έχουν ομολογία 80-83%, ενώ για το καταλυτικό κέντρο η ομολογία είναι 100%. Συγκριτικές δομικές μελέτες έδειξαν ότι το καταλυτικό κέντρο της ηπατικής ανθρώπινης φωσφορυλάσης και της μυϊκής φωσφορυλάσης κουνελιού δεν διαφέρουν ούτε στην αλληλουχία αλλά ούτε και στη δομή (Rath et al., 2000).

4.2 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος.

Μάρτυρας Διαδρομή 1 Διαδρομή 2 Διαδρομή 3 Διαδρομή 4 Διαδρομή 5



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την 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 τη θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

4.3 Αποτελέσματα πειραμάτων σύνθεσης

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης 3'-C-υδροξυμεθυλο-πυρανονουκλεοζιτών με πιθανή αντιδιαβητική δράση. Οι τελικές αποδόσεις της σύνθεσης των νέων μορίων ήταν αρκετά καλές. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση της 3-C-υδροξυμεθυλο-1,2:5,6-di-O-ισοπροπυλιδένιο- α -D-γλυκοφουρανόζης (**3**) είχε απόδοση 85%, της 3-C-ακετοξυμεθυλο-1,2:5,6-di-O-ισοπροπυλιδένιο- α -D-γλυκοφουρανόζης (**4**) είχε απόδοση 80%, της 3-C-ακετοξυμεθυλο-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζης είχε απόδοση 54% (**5**), ενώ της 1-[2', 4', 6'-τρι-O-ακετυλο-3'-C(ακετοξυμεθυλο)- β -D-γλυκοπυρανοζυλο]5-φθοροουρακίλης (**6**) 60%. Τέλος, το μόριο στόχος 1-[3'-C-(υδροξυμεθυλο)- β -D-γλυκοπυρανοζυλο] 5 φθοροουρακίλη (**7**) συντέθηκε με εξαιρετικά καλή απόδοση, 90%.

Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίστηκαν με αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H NMR}$, με αναλύσεις φασματοσκοπίας UV, με φασματοσκοπία μάζας και με elemental ανάλυση.

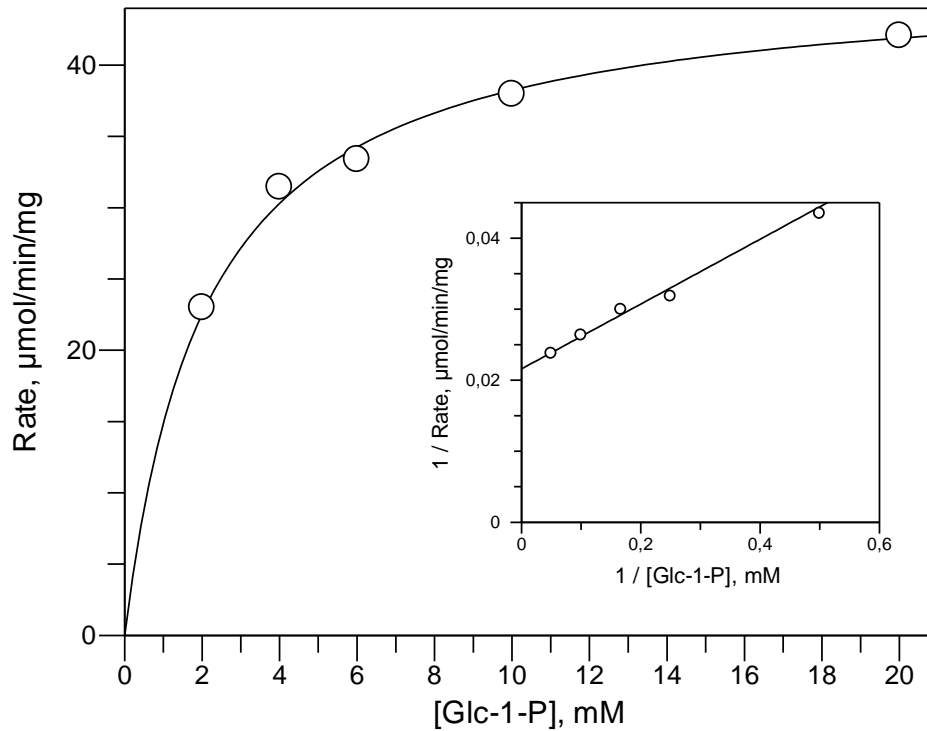
4.4 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

4.4.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-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}). 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: $K_m=2.12 \pm 0.15$ mM και $V_{max}=46.32 \pm 0.61$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G-1-P).

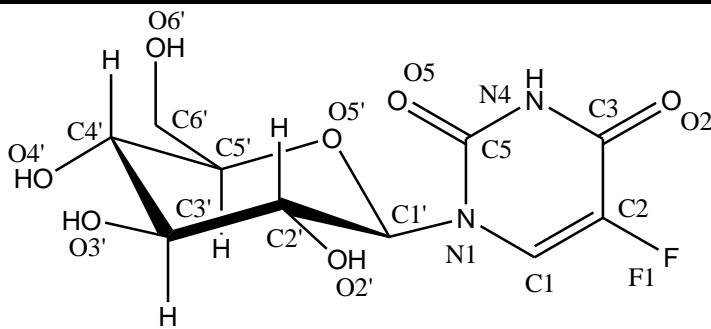
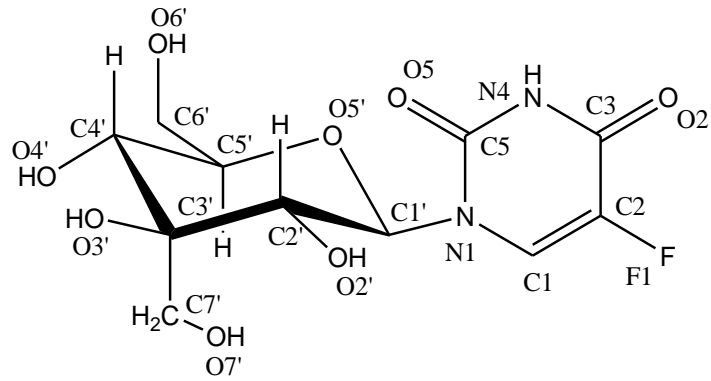
GP Kinetics Data



Εικόνα 11: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

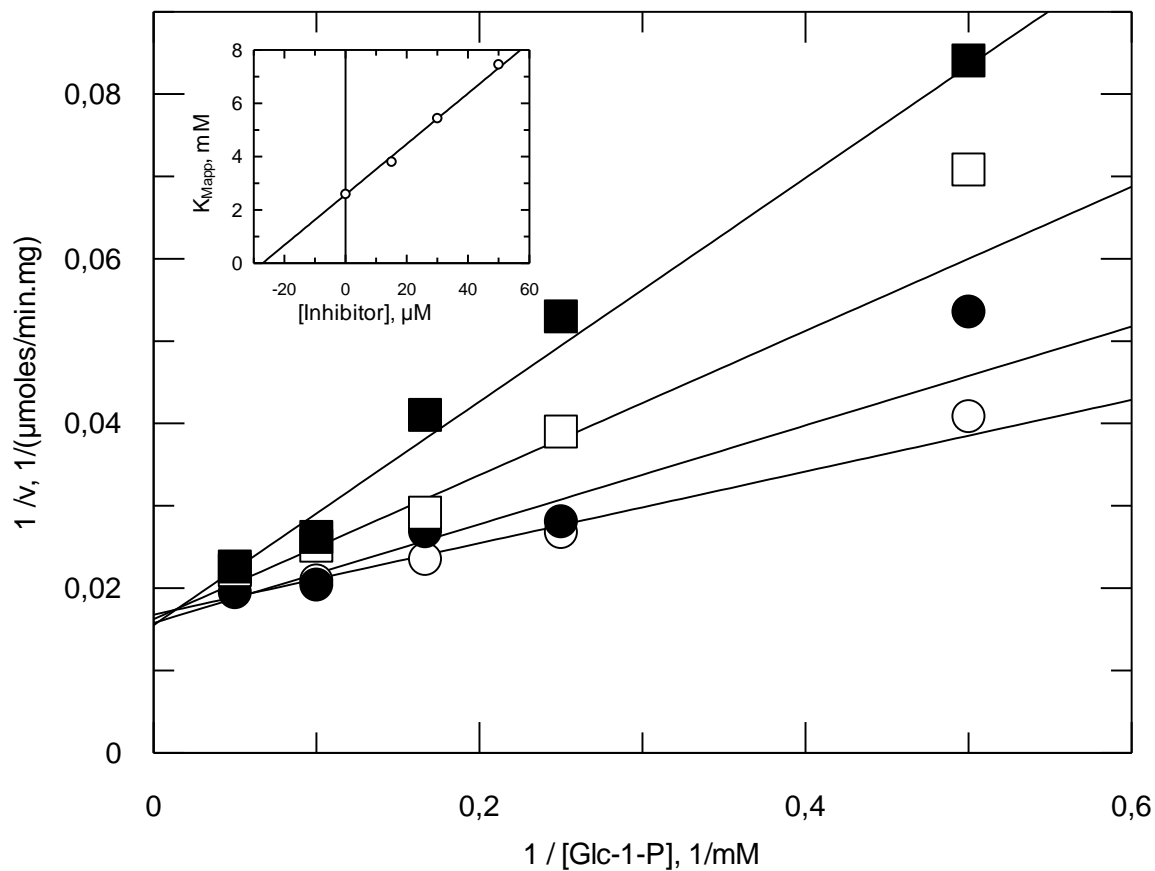
4.4.2 Κινητική μελέτη ενώσεων 7 και GlcFU

Για το σκοπό της εργασίας, μετά την απομόνωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου μελετήθηκαν οι ενώσεις 7 και GlcFU ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Grafit (Leatherberrow,1997)

Όνομα	Χημική δομή ένωσης	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν	K_i (μM)
GlcFU		10μM, 20μM, 40μM	7.9 ± 0.3
7		15μM, 30μM, 50μM	27.1 ± 1.4

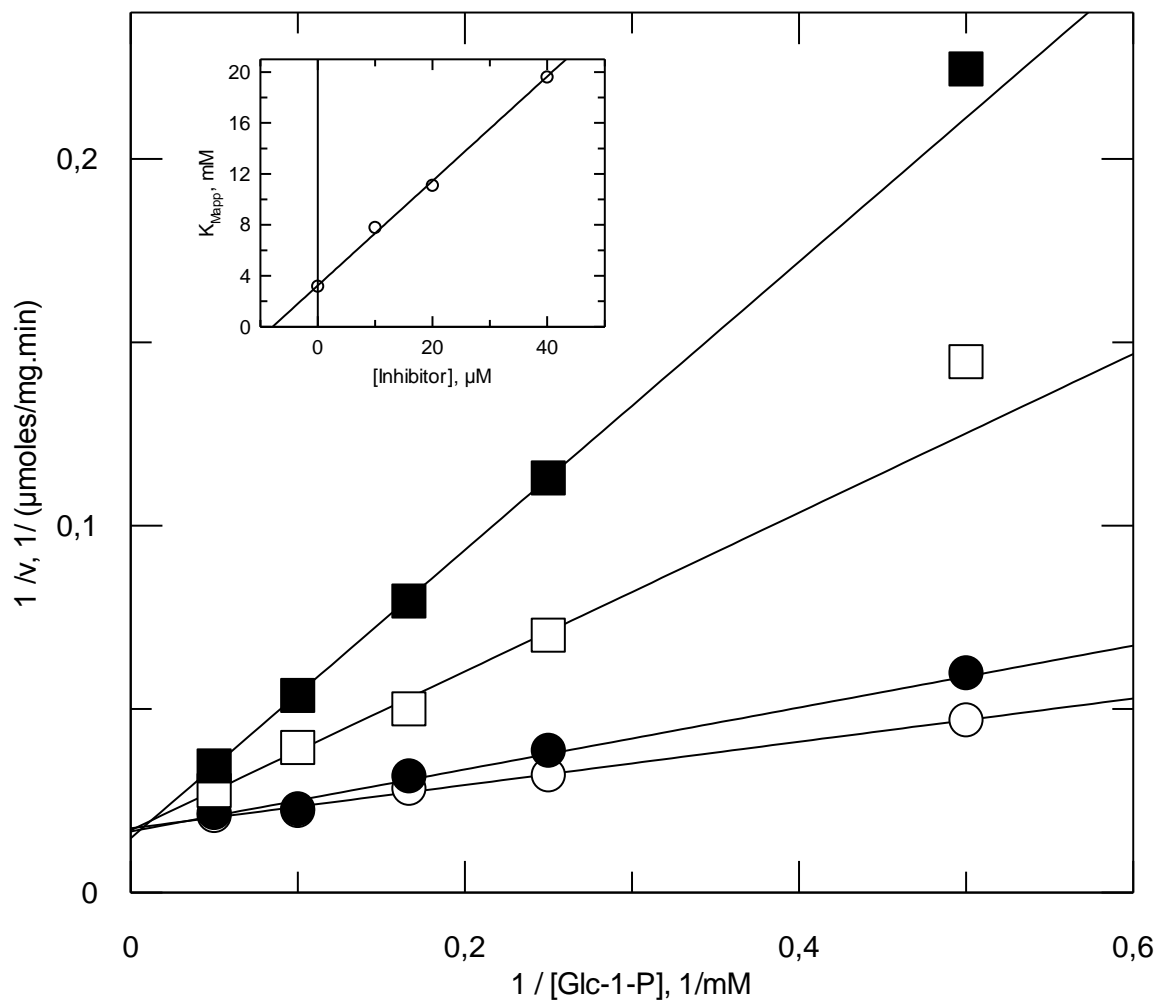
Πίνακας 1: Οι χημικές δομές των ενώσεων που μελετήθηκαν μαζί με τις τιμές K_i του κάθε αναστολέα.

Ένωση 7



Εικόνα 12: Γραφική παράσταση Lineweaver-Burk της αναστολής της φωσφορυλάσης από την ένωση 7. Το γεγονός ότι οι ευθείες τέμνονται στον άξονα v υποδηλώνει πως πρόκειται για συναγωνιστικό αναστολέα. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα ήταν 0 (\circ), 15 (\bullet) 30 (\square) και 50 μM (\blacksquare). Στο ένθετο παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της K_{Mapp} ως προς τη συγκέντρωση του αναστολέα για τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής K_i .

Ένωση GlcFU



Εικόνα 13: Γραφική παράσταση Lineweaver-Burk της αναστολής της φωσφορυλάσης από την ένωση GlcFU. Το γεγονός ότι οι ευθείες τέμνονται στον άξονα v υποδηλώνει πως πρόκειται για συναγωνιστικό αναστολέα. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα ήταν 0 (\circ), 10 (\bullet) 20 (\square) και 40 μM (\blacksquare). Στο ένθετο παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της K_{app} ως προς τη συγκέντρωση του αναστολέα για τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής K_i .

Οι δύο ενώσεις που μελετήθηκαν ως προς την αναστολή τους έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου, εμφάνισαν συναγωνιστική αναστολή σε σχέση με το υπόστρωμα της 1-φωσφορικής γλυκόζης, σε σταθερές συγκεντρώσεις γλυκογόνου, με σταθερές αναστολής K_i 7.9

$\pm 0.3 \mu\text{M}$ για την ένωση GlcFU και $27.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$ αντίστοιχα, για την ένωση 7.

Και οι δύο ενώσεις είναι πολύ πιο ισχυροί αναστολείς από την α -D- γλυκόζη, πιθανότατα λόγω των πρόσθετων αλληλεπιδράσεων της ομάδας της ουρακίλης με τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα. Επίσης, είναι πιο ισχυροί αναστολείς από την ένωση 1-(3'-δεοξυ-φθόρο-β-D-γλυκοπυρανονουκλεοζίτης της 5- φθοροουρακίλης (K_i 3.67 μM), το οποίο αποδίδεται στην έλλειψη του φθορίου από το δακτύλιο του γλυκοπυρανονουκλεοζίτη και στην παρουσία της υδροξυλομάδας στην αξονική θέση, αφού έχει αναφερθεί πως τα φθόρο παράγωγα γλυκόζης εμφανίζουν αναστολή της GPb σε συγκεντρώσεις mM (Martin et al., 1990).

Από τα κινητικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, φαίνεται ότι η προσθήκη μιας υδροξυλομάδας στον δακτύλιο του γλυκοπυρανονουκλεοζίτη στην αξονική θέση (ένωση 7), δε βελτίωσε τη δραστηριότητα της ένωσης, δεδομένου ότι η σταθερά αναστολής της GlcFU είναι 3.9 φορές χαμηλότερη.

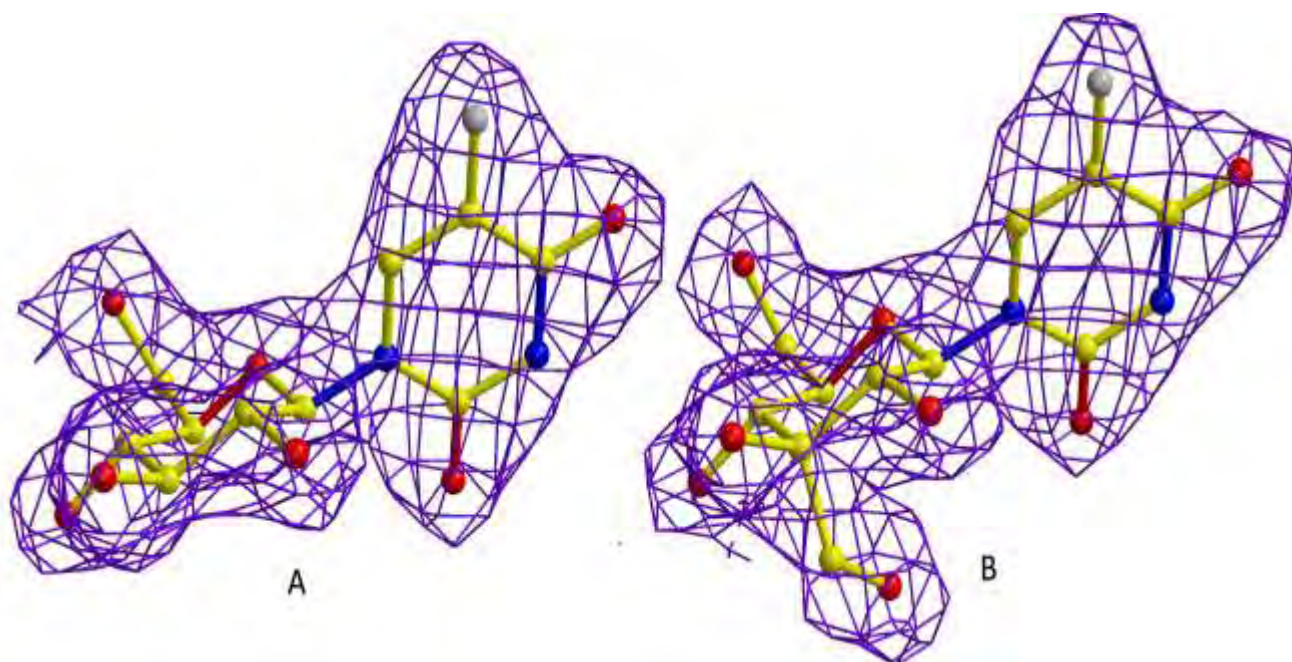
4.5 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης

Η κρυσταλλογραφική μελέτη αποτέλεσε το επόμενο στάδιο της έρευνάς μας και είχε ως στόχο την περαιτέρω μελέτη του τρόπου σύνδεσης των ενώσεων 7 και GlcFU, για την ερμηνεία των κινητικών αποτελεσμάτων.

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε την κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (διαμόρφωση T), τον εμποτισμό κρυστάλλου με διάλυμα της υπό μελέτη ουσίας, τη συλλογή και την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

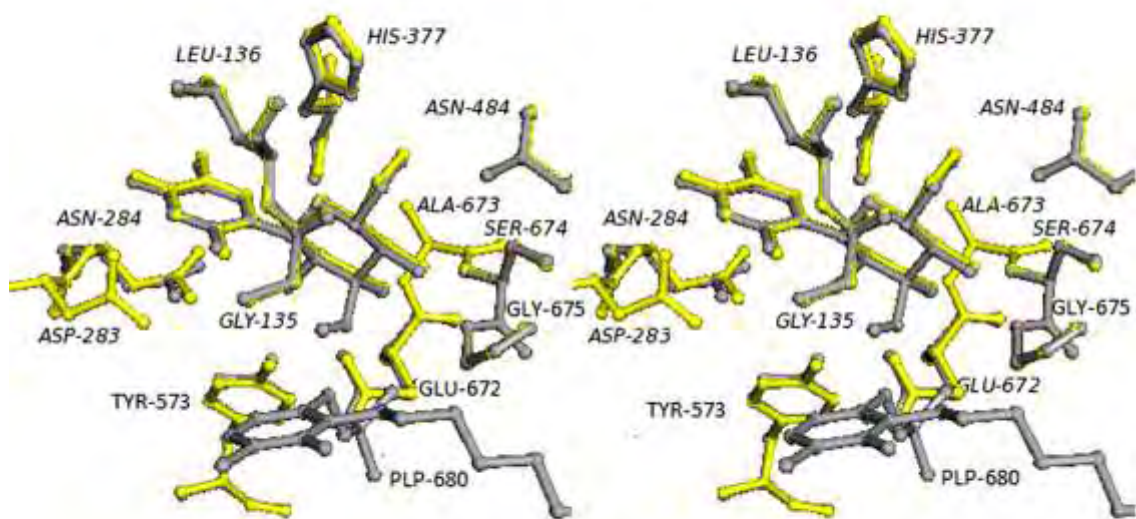
Στη συνέχεια η δομή της GPb ως συμπλόκου με την α -D-γλυκόζη χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο το οποίο υποβλήθηκε σε βελτιστοποίηση έναντι των πειραματικών δεδομένων για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του νέου συμπλόκου.

Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας διαφοράς 2Fo-Fc και Fo-Fc που προέκυψε μετά τη βελτιστοποίηση έχοντας συμπεριλάβει την κάθε μία ένωση ξεχωριστά στο μοντέλο, έδειξε με σαφήνεια τη θέση κάθε ατόμου των αναστολέων (Εικόνα 14) και πιο συγκεκριμένα έδειξε ότι και οι δύο ενώσεις συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου GPb.



Εικόνα 14: Ηλεκτρονικοί χάρτες διαφοράς $2F_o-F_c$ των ενώσεων GlcFU (A) και **7** (B).

Όταν έγινε υπέρθεση των δύο συμπλόκων GPb-**7** και GPb-GlcFU σε περιοχή που γειτνιάζει στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, βρέθηκε πως και οι δύο ενώσεις δεσμεύονται στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με παρόμοιο τρόπο (**Εικόνα 15**).



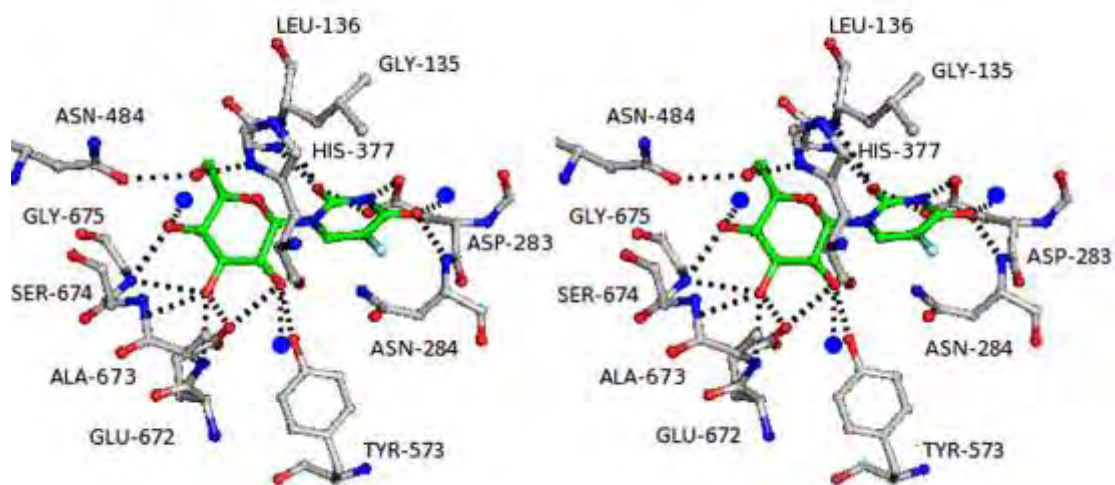
Εικόνα 15: Υπέρθεση του συμπλόκου GPb-7 (γκρι χρώμα) πάνω στο σύμπλοκο GPb-GlcFU (κίτρινο χρώμα).

Η κρυσταλλογραφική μελέτη λοιπόν απέδειξε πως οι δύο αναστολείς προσδένονται παρόμοια στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με τη γλυκοπυρανόζη και τα άτομα της φθοροουρακίλης να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου οι οποίοι παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα.

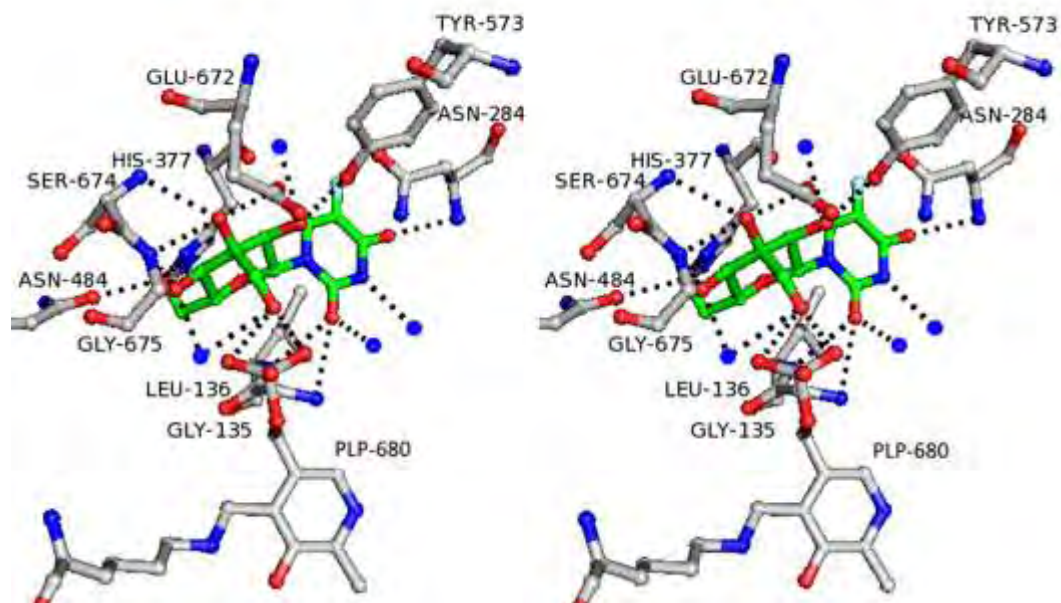
Άτομα αναστολέα	Άτομα πρωτεΐνης	Σύμπλοκο GPb – GlcFU	Σύμπλοκο GPb - 7
O2'	Tyr573 OH	3.0	3.0
	Glu672 OE1	3.0	3.1
	Asn284 ND2	3.3	-

	Wat244	2.8	2.7
O3'	Glu672 OE1	2.6	2.7
	Ala673 N	3.2	3.2
	Ser674 N	3.0	3.0
	Gly675 N	3.1	3.2
O4'	Gly675 N	2.7	2.7
	Wat117	2.7	2.5
O6'	His377 ND1	2.8	2.7
	Asn484 OD1	2.7	2.8
O7'	PLP O2P	-	2.8
	Wat117	-	3.0
O5	Gly135 N	3.2	3.2
	Leu136 N	3.0	3.0
	Asp283 OD1	3.3	-
	Asp283 OD2	3.3	-
	Wat77	-	3.2
	Wat56	-	2.8
O3	Asn284 N	3.0	3.0
	Wat345	2.7	-
N4	Asp283 OD1	2.6	-
	Wat239	-	2.8

Πίνακας 2: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των υπό μελέτη ενώσεων και των αμινοξέων του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου GPb. Οι τιμές είναι οι αποστάσεις σε Å. Για την ονοματολογία των ατόμων που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη δείτε τον Πίνακα 1.



a



b

Εικόνα 16: Στερεοσκοπική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης GlcFU (a) και της ένωσης **7** (b) με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και τα μόρια ύδατος. Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές και τα μόρια του νερού ως μπλε σφαίρες.

Οι van der Waals αλληλεπιδράσεις των αναστολέων με τα αμινοξικά κατάλοιπα παρατίθενται στον επόμενο πίνακα.

Άτομο αναστολέα	Σύμπλοκο GPb - GlcFU	Σύμπλοκο GPb - 7
C1'	Leu136 N	Leu136 N
C2'	His377 O; Glu672 OE1	Glu672 OE1; His377 O
C3'	Glu672 OE1; Gly675 N	Gly675 N; Glu672 OE1
C4'	Gly675 N	Gly675 N
C5'	Gly135 C; Leu136 N	Gly135 C, CA; Leu136 N
C6'	Gly135 C, O; Leu136 N, CA; His377 ND1; Asn484 OD1	Asn484 OD1; Gly136 C, O; Leu136 N; His377 ND1
C7'	-	PLP O3P, O2P; Gly675, CA; Glu672 CD, OE1
C1	Asn284 OD1, ND2; His377 CB, O	Leu136 CB; Asn284 ND2, OD1; His377 CB, C, O;
C2	Asn284 CG, ND2, OD1	Asn284 CG, ND2, OD1; His377 O
C3	Asn284 N, CG, OD1, ND2; Asp283 OD1	Asn284 N, CG, ND2
C5	Leu136 N, CB; Asp 283 CG, OD1, OD2; Asn284 ND2	Leu136 N, CB; Asp 283 OD1; Asn284 ND2
O2'		Asn284 ND2, OD1
O3'	Ala 673 C, Ser 674 CA, C; Glu672 CG, CD, C; Ala673 CA, CB	Ala673 C, CA, CB, N; Ser674 N, CA, C; Glu672 CD
O4'	Gly675 CA, C, O; Thr676 N, Asn484 OD1; Ser674 N, CA, CB, OG, C	Gly675 C, O, N, CA; Thr676 N; Asn585 OD1; Ser 674 CA, CB, C
O5'	Gly135 C; Leu136 N, CA, CB; His377 ND1	Gly135 C; Leu136 N, CA, CB; His377 CB, ND1

O6'	Leu139 CD2; His377 CE1; Val455 CB, CG2, Val455 CG1; Asn484 CG;	Val455 CB, CG1, CG2; Asn484 CG; His377 CE1, CG;
O7'	-	PLP P, O3P
O3	Asp283 OD1; Asn284 CA	Asn284 ND2, CA
O5	Gly135 C, CA; Leu136 CA, CB; Asp283 CG	Gly135 C, CA; Leu136 CA, CB
N1	Leu136 CB; Asn284 ND2	Leu136 CB; Asn284 ND2
N4	Leu136 CB; Asp 283 CG, OD2; Asn284 N, ND2	Leu136 CB; Asp 283 CG, OD1; Asn284 ND2
F1	Asn284 OD1; His377 CB, O; Thr378 CB, CG2	Asn284 CG, OD1; His377 CB, O; Thr378 CB, CG2
Σύνολο	79 αλληλεπιδράσεις (14 αμινοξικά κατάλοιπα)	87 αλληλεπιδράσεις (15 αμινοξικά κατάλοιπα)

Πίνακας 3: Πιθανές αλληλεπιδράσεις van der Waals των ενώσεων 7 και GlcFU με τα αμινοξικά κατάλοιπα του ενζύμου GPb μετά από τη δέσμευση των ενώσεων στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.

Οι δύο αναστολείς συνδέονται με παρόμοιο τρόπο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με τη γλυκοπυρανόζη και τη φθοροουρακίλη να εμπλέκονται σε ένα δίκτυο πολικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με την πρωτεΐνη ανάλογο με εκείνο που έχει παρατηρηθεί και για άλλα παράγωγα γλυκοπυρανόζης (Somsak et al., 2008) και της 1-(3'-δεοξυ-3'-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοζυλ)5-φθοροουρακίλης (Tsirkone et al., 2010). Επιπροσθέτως, η 3'-υδροξυμέθυλο ομάδα της ένωσης **7** βρίσκεται σε απόσταση δεσμού υδρογόνου από το άτομο O2P της γ φωσφορικής ομάδας της PLP και εμπλέκεται και σε ένα πολικό δεσμό με το άτομο O3P μέσω ενός μορίου ύδατος (Εικόνα 16, Πίνακας 2). Επίσης η ομάδα αυτή συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις van der Waals (πολικό-πολικό και μη πολικό – μη πολικό) με τη γ φωσφορική ομάδα της PLP (Πίνακας 4). Η δομική σύγκριση των συμπλόκων GPb-GlcFU και GPb-7 απεκάλυψε πως η παρουσία της 3'-υδροξυμέθυλο ομάδας εκτοπίζει ένα συντηρημένο μόριο ύδατος (Somsak et al., 2008) από το ενεργό κέντρο και το οποίο διαμεσολαβούσε σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ της γ φωσφορικής ομάδας και των ατόμων της πλευρικής αλυσίδας του

αμινοξικού κατάλοιπου Glu672. Συνεπώς, η δομική ανάλυση δεν μπορεί να παράσχει ικανοποιητική εξήγηση για τη σημαντική διαφορά στην ανασταλτική ικανότητα που εμφανίζουν οι δύο ενώσεις. Αντιθέτως, αποκαλύπτει πως η ένωση **7** συμμετέχει σε περισσότερες αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη από ότι η ένωση GlcFU. Συνεπώς απαιτείται μία ενεργή ανάλυση της πρόσδεσης των ενώσεων μέσω υπολογισμών μοριακής δυναμικής.

5 Βιβλιογραφία

5.1 Ελληνική βιβλιογραφία

Οικονομάκος Ν. Γ. (2001), Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*, 63, 258-261

Σμοκοβίτης Α., 2004, Φυσιολογία, Έκδοση 4^η, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.

Stryer L., 1997, Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

5.2 Ξένη βιβλιογραφία

Agelis G., Tzioumaki N., Tselios T., Botic T., Cencic A., Komiotis D. Eur. J. Med. Chem. 2008, p.43, 1366

Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis D. Bioorg. Med. Chem. 2007, p.15, 5448

Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001 (p) 329-351

Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. Molecular cancer therapeutics 2010

Blundell T. L., Jhoti H. & Abell C., 2002, High-throughput crystallography for lead discovery in drug design, Nature Reviews, Drug Discovery, Volume 1.

Diamond J., 2003, The double puzzle of diabetes, *Nature*, 423, 599-602.

Fiske C. H. & Subbarow Y., 1925, The colometric determination of phosphorous, *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.

Halliwell, B. Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopaedia of life sciences* 2001

Komiotis, D.; Manta S.; Tsoukala E.; Tzioumaki N. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* 2008, p.7, 219

Kurukulasuriya R., Link J.T., Madar D.J., Pei Z., Richards S.J., Rohde J.J., Souers A.J. and Szczepankiewicz B.G. 2003. Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of the hepatic glucose production. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 123-153.

Leatherbarrow, R. J., 1990, Using linear and non-linear regression to fit biochemical data, *TIBS*, 15, 455-458.

Lui V.W.Y.W., Lau C.P.Y.P., Cheung C.S.F.S., HO K., Ng M.H.L.H., Cheng S.H.H., HOng B., Tsao S.-W.W., Tsang C.M.M., Lei K.I.K.I., Yamasaki Y., Mita A., Chan A.T. *Biochemical pharmacology* 2010, p.79, 1772–1780.

Manta, S., Tsoukala, E., Tzioumaki, N., Kiritsis, C., Balzarini J., Komiotis, D. *Bioorg. Chem.* 38, (2010), 48-55.

Manta, S., Tsoukala, E., Goropevšek, A., Pamulapati, R., Cencič, A., Balzarini, J., Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 44, (2009), 2696-2704.

Manta, S., Tzioumaki, N., Tsoukala, E., Panagiotopoulou, A., Pelecanou, M., Balzarini J., Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 44, (2009), 4764–4771.

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 I, Έκδοση 2^η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.

Melpidou A. E. & Oikonomakos N. G., 1983, Effects of glycose-6-P on the catalic and structural properties of glycogen phosphorylase α , *FEBS Lett.*, 154, 105-110.

Oikonomakos N. G., Melpidou A.E & Johnson L. N., 1985, Crystallization of pig skeletal phosphorylase b. Purification, physical and catalic characterization, *Biochem. Biophys. Acta*, 832, 248-256.

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.; Somsak, L. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2008, 9, 379.

Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinowetz A.M., McPherson R.K., Olson T.V., Treadway J.L. and Hoover D.J., 2000, Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at new allosteric site. *Chemistry and Biology*, 7, No 9, 677-682.

Saheki, S., Takeda, A. & Shimazu, T., (1985), Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity, *Anal. Biochem.*, 148, 277-281.

Segel, L.H., 1975, *Enzyme kinetics*, Wiley interscience, New York.

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

Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *Int. J. Mol. Sci.* 2007, p.8, 695

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.
Witters L. A. & Avruch J., 1978, Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase, *Biochemistry*, 17, 406-410.

