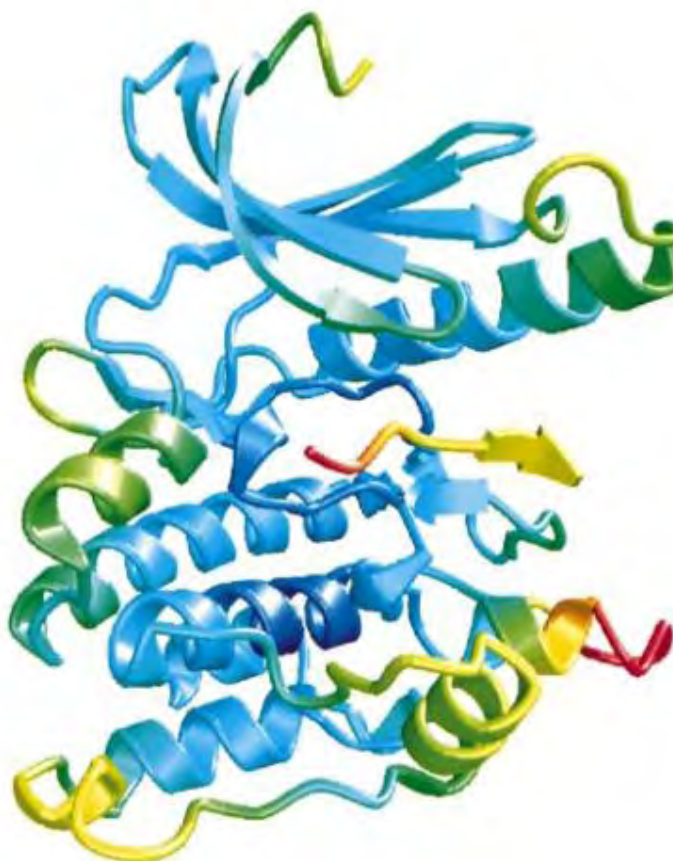




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**«ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΕ ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ  
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΛΥΣΗΣ»**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΚΑΤΟΥΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΕ ΕΝΖΥΜΑ ΤΗΣ  
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΛΥΣΗΣ»

## DIPLOMA PROJECT

« STUDIES ON THE BINDING OF INHIBITORS TO ENZYMES OF  
GLYCOGENOLYSIS»

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική (Επιβλέπουσα)**  
Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**  
Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας.
- **Δρ. Μπαλατσός Νικόλαος**  
Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## Περιεχόμενα

I. Περίληψη.....	5
II. Abstract.....	6
III. Ευχαριστίες.....	7
<b>1. Εισαγωγή .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Γενικά στοιχεία και δομή του γλυκογόνου .....	8
1.1.2 Σύνθεση του γλυκογόνου .....	9
1.1.3 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	10
1.1.4 Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου .....	11
1.1.5 Διαταραχές του μεταβολισμού του γλυκογόνου .....	13
1.1.5.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	13
1.1.5.2 Γλυκογονιάσεις .....	15
<b>1.2 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) .....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες – Η φωσφορυλίωση ως αντιστρεπτή ομοιοπολική τροποποίηση.....	16
1.2.2 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .....	17
1.2.2.1 Γενικά στοιχεία .....	17
1.2.2.2 Ισομορφές της PhK.....	18
1.2.2.3 Δομή της PhK .....	18
1.2.2.4 Ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας της PhK.....	21
<b>1.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP).....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 Τα ένζυμα της γλυκογονόλυσης ως μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη φαρμάκων .....</b>	<b>23</b>
1.4.1 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .....	23
1.4.2 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου .....	24
<b>2. Σκοπός.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Πειραματικό μέρος .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Υλικά-Όργανα.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Παρασκευαστικές μέθοδοι .....</b>	<b>28</b>

3.2.1 Καθαρισμός της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από μυϊκό ιστό κουνελιού.....	28
3.2.2 Παραγωγή και καθαρισμός της ανθρώπινης κολοβωμένης ηπατικής γ- καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (hIPhK-γ-trunc) .....	30
<b>3.3 Αναλυτικές μέθοδοι.....</b>	<b>31</b>
3.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	31
3.3.2 Μέθοδος Bradford.....	33
3.3.3 Κινητική μελέτη hIPhKγ.....	33
3.3.3.1 Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων-σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ) και μέγιστης ταχύτητας ( $V_{max}$ ).....	33
3.3.3.2 Προσδιορισμός $IC_{50}$ αναστολέων.....	36
3.3.3.3 Επεξεργασία των κινητικών δεδομένων με το πρόγραμμα GraFit.....	39
<b>4.Αποτελέσματα – Συζήτηση .....</b>	<b>40</b>
4.1 Απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου.....	40
4.2 Κινητική μελέτη της hIPhKγ .....	40
4.3 Κινητική μελέτη των αναστολέων .....	41
4.4 Συζήτηση .....	42
<b>Παράρτημα.....</b>	<b>43</b>
<b>5. Βιβλιογραφία .....</b>	<b>46</b>

## I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γλυκογονόλυση είναι μία μεταβολική οδός στην οποία το γλυκογόνο διασπάται και απελευθερώνει 1-φωσφορική γλυκόζη (G1P) μέσω της συντονισμένης δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) και της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK). Η GP καταλύει το πρώτο βήμα καταβολισμού του γλυκογόνου, ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την PhK στη Ser14 και η G1P που παράγεται, μετατρέπεται σε ελεύθερη γλυκόζη στα ηπατοκύτταρα. Τα ένζυμα αυτά συμβάλλουν κατά ένα μέρος στην παραγωγή υψηλών επιπέδων γλυκόζης από το ήπαρ επομένως απαιτείται σωστή ρύθμισή τους. Η αναστολή της γλυκογονόλυσης αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη δεδομένου ότι αποτελεί μία σοβαρή απειλή για την παγκόσμια υγεία. Παρά τη διαθεσιμότητα υπογλυκαιμικών φαρμάκων, οι τρέχουσες θεραπείες είναι αναποτελεσματικές και οδηγούν σε παρενέργειες. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ηπατικές ισομορφές της GP και PhK αποτελούν σημαντικούς μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό αντιυπεργλυκαιμικών παραγόντων.

Στο πλαίσιο της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν μελέτες πρόσδεσης δύο αναλόγων κουμαρίνης στη  $\gamma$  καταλυτική υπομονάδα της ανθρώπινης ηπατικής ισομορφής της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (h1PhK- $\gamma$ ) και αποτίμηση της δράσης των αναλόγων αυτών στη δραστηριότητα του ενζύμου. Οι κουμαρίνες είναι ενώσεις, κυρίως φυτικής προέλευσης, οι οποίες δρουν ως δευτερογενείς μεταβολίτες και παρουσιάζουν ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b, από σκελετικούς μύς κουνελιού (rmGPb) η οποία φωσφορυλιώθηκε από την h1PhK- $\gamma$ . Στη συνέχεια έγινε κινητική μελέτη της h1PhK- $\gamma$  για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων και προσδιορισμός της IC50 των δύο συνθετικών ενώσεων. Ο αναστολέας 4a έδειξε να αναστέλλει το ένζυμο με  $IC_{50}=61.5 \pm 0.47\mu M$  ενώ ο 4'α με  $IC_{50}= 50.5 \pm 0.35\mu M$ .

## **II. ABSTRACT**

Glycogenolysis is a metabolic pathway in which glycogen breaks down towards glucose 1-phosphate (G1P) through the coordinated action of glycogen phosphorylase (GP) and glycogen kinase phosphorylase (PhK). GP catalyzes the first step of glycogen degradation, is activated through phosphorylation by PhK in Ser14 and G1P that is produced is converted to free glucose in hepatic cells. These enzymes lead partly to elevated glucose production by the liver and as a result, there is demand for their right regulation. Inhibition of glycogenolysis is a promising therapeutic strategy to tackle Diabetes Mellitus (DM), taking into account that DM is a serious threat to global health. In spite of availability of hypoglycemic drugs, the current treatments are inefficient and lead to side effects. Studies have shown that the hepatic isoforms of GP and PhK are important molecular targets for the design of anti-glycemic agents.

Within the general research conducted in the laboratory of Structural and Functional Biochemistry, in the present diploma thesis, binding studies of two coumarin analogues on the  $\gamma$ -catalytic subunit of the human liver glycogen phosphorylase kinase (hPhK- $\gamma$ ) were conducted, as well as evaluation of their effect in the activity of the enzyme. Coumarins are mainly plant-derived compounds that serve as secondary metabolites with diverse pharmacological properties. Initially, rabbit muscle glycogen phosphorylase b (rmGPb) was isolated and then phosphorylated by hPhK- $\gamma$ . Subsequently, the kinetic study of hPhK- $\gamma$  was held in order to determine the kinetic parameters as well as determination of IC<sub>50</sub> of the two synthetic compounds. Inhibitor 4a inhibited the enzyme with IC<sub>50</sub>=61.5  $\pm$ 0.47  $\mu$ M and inhibitor 4b inhibited the enzyme with IC<sub>50</sub>= 50.5  $\pm$ 0.35 $\mu$ M.

### **III. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2018 - Ιούνιος 2018 στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη, τις συμβουλές και την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου Δρ. Λεωνίδα Δ. Δημήτριο και Δρ. Μπαλατσό Νικόλαο που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την ομαλή συνεργασία. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Στραβοδήμο Γεώργιο και την υποψήφια διδάκτορα Σολοβού Θεοδώρα για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους, τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γκούσκου Αναστασία για τις συμβουλές και την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της κοινής πειραματικής μας μελέτης και τις προπτυχιακές φοιτήτριες Κάνουρα Αμαλία και Πολίτη Ελένη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην καλή μου φίλη, συμφοιτήτρια και συνάδελφό μου Κατσίδου Ελισάβετ με την οποία διεξήγαμε παράλληλα την πτυχιακή μας εργασία για την άψογη παρέα της, την υπομονή της και πάνω απ' όλα την υποστήριξή της ιδιαίτερα όταν προέκυπταν καταστάσεις μη ευνοϊκές. Επιπρόσθετα, θέλω να ευχαριστήσω τη φίλη, συμφοιτήτρια και συνάδελφό μου Ιωσηφίδου Νικολέτα για όλη της την υπομονή, την κατανόηση και την ψυχολογική της υποστήριξη προς το πρόσωπό μου σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου.

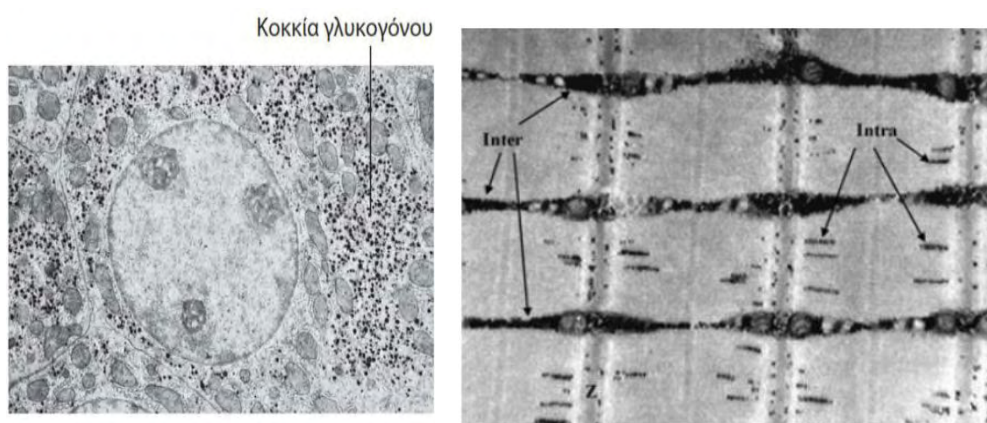
Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου για την οικονομική και ηθική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Μεταβολισμός του γλυκογόνου

### 1.1.1 Γενικά στοιχεία και δομή του γλυκογόνου.

Το γλυκογόνο είναι ένα μεγάλο μεγέθους πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, το οποίο μπορεί να διασπαστεί και να απελευθερώσει γλυκόζη όταν υπάρχει ενεργειακή ανάγκη. Αφού παραχθεί γλυκόζη, τότε αυτή μπορεί μέσω της γλυκολυτικής πορείας να καταβολιστεί για την παραγωγή ενέργειας. ( Stryer L. *et al.*, 2012) Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες, όπου αποθηκεύεται με τη μορφή κοκκίων στο κυτοσόλιο ( Graham TE. *et al.*, 2010)

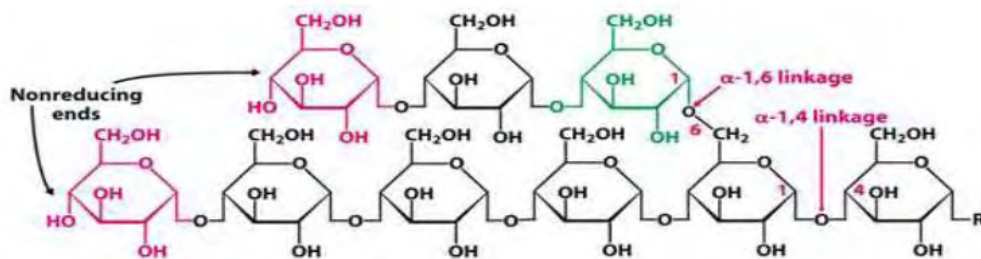


**Εικόνα 1:** Α) Ηλεκτρονιομικρογραφία ενός ηπατικού κυττάρου. Τα πυκνά σωματίδια στο κυτταρόπλασμα είναι κοκκία γλυκογόνου. ( Stryer L. *et al.*, 2012) Β) Ηλεκτρονική μικροσκοπία σκελετικών μυικών κυττάρων όπου τα κοκκία γλυκογόνου είναι ελεύθερα κυτοσολικά ή συνδεδεμένα με το ενδοπλασματικό δίκτυο. ( Graham TE. *et al.*, 2010)

Η ανακάλυψη του γλυκογόνου στο ήπαρ αποδίδεται στον Claude Bernard το 1857. (Zois & Harris, 2016, Young FG, 1957) Στο ήπαρ, παρέχει γλυκόζη στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια περιόδων νηστείας ενώ στους σκελετικούς μύες παρέχει γλυκόζη κατά τη διάρκεια της μυικής σύσπασης. (Adeva-Andany M.M *et al.*, 2016) Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ παρά στους μύες (10% έναντι 2% κατά βάρος) αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύες λόγω της πολύ μεγάλης μάζας τους ( Stryer L. *et al.*, 2012). Παρ'όλα αυτά, αξίζει να σημειωθεί ότι το γλυκογόνο έχει αναγνωριστεί και σε άλλους ιστούς όπως ο εγκέφαλος, η καρδιά, οι νεφροί, ο λιπώδης ιστός και τα ερυθροκύτταρα με άγνωστο όμως ακόμη ρόλο και λειτουργία. (Adeva-Andany M.M *et al.*, 2016).

Οι αλυσίδες του γλυκογόνου δομούνται από κατάλοιπα γλυκόζης τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς  $\alpha$ -1,4. Κάθε 8-12 κατάλοιπα γλυκόζης, το γλυκογόνο φέρει διακλαδώσεις που δημιουργούνται μέσω γλυκοζιτικών δεσμών  $\alpha$ -1,6. Ο σχηματισμός διακλαδώσεων είναι πολύ σημαντικός διότι αυξάνει τη διαλυτότητα του γλυκογόνου και δημιουργεί πολλά ελεύθερα άκρα από τα οποία μπορεί να ξεκινήσει η σύνθεση και αποικοδόμησή του. ( Stryer L. *et al.*, 2012)





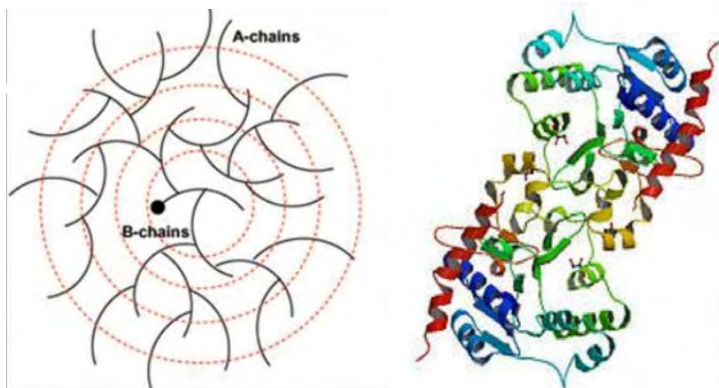
Εικόνα 2: Δομή του γλυκογόνου όπου διακρίνονται οι  $\alpha$ -1,4 και  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικοί δεσμοί. ( Stryer L. *et al.*, 2012)

### 1.1.2 Σύνθεση του γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου χρειάζεται μια ενεργοποιημένη μορφή της γλυκόζης, την ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη), η οποία παράγεται από την αντίδραση της UTP με την 1-φωσφορική γλυκόζη μέσω της πυροφωσφορυλάσης της UDP-γλυκόζης και προστίθεται στο μη αναγωγικό άκρο των μορίων γλυκογόνου. ( Stryer L. *et al.*, 2012) Το πρώτο βήμα στη σύνθεση γλυκογόνου είναι η εξωκυττάρια πρόσληψη της γλυκόζης. Για να επιτευχθεί αυτό, απαιτείται η είσοδος της γλυκόζης στο κύτταρο μέσω μεταφορέων (GLUTs – Glucose Transporters). Το συγκεκριμένο σύστημα μεταφοράς χρησιμοποιείται διότι το μόριο της γλυκόζης είναι ιδιαίτερα πολικό και δε μπορεί να διαχυθεί στη μη πολική λιποειδική διπλοστοιβάδα. Οι ισομορφές GLUT-1 και GLUT-3 πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνες για τη βασική μεταφορά τη γλυκόζης ενώ η ηπατική ισομορφή (GLUT-2 ) είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της γλυκόζης από και προς τα ηπατοκύτταρα. (Groppe S.S *et al.*, 2008)

Η UDP-γλυκόζη είναι ο άμεσος δότης καταλοίπων γλυκόζης στην αντίδραση που καταλύεται από τη **συνθάση του γλυκογόνου** η οποία προάγει τη μεταφορά του καταλοίπου γλυκόζης από την UDP-γλυκόζη στο μη αναγωγικό άκρο ενός διακλαδισμένου μορίου γλυκογόνου. Η συνθάση του γλυκογόνου δε μπορεί να δημιουργήσει τους  $\alpha$ -1,6 δεσμούς που υπάρχουν στα σημεία διακλάδωσης του γλυκογόνου. Αυτοί οι δεσμοί δημιουργούνται με τη δράση του **ενζύμου σχηματισμού διακλαδώσεων** (Bollen M. *et al.*, 1998) (Lehninger, 2011) ( Stryer L. *et al.*, 2012)

Η σύνθεση του γλυκογόνου χρειάζεται ένα εναρκτήριο μόριο πάνω στην πολυπεπτιδική αλυσίδα του οποίου προστίθενται οι νέες αλυσίδες. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται από την **γλυκογενίνη**, κάθε υπομονάδα της οποίας καταλύει την προσθήκη οκτώ γλυκοζυλο-μονάδων στην άλλη υπομονάδα για το σχηματισμό πολυμερών γλυκόζης με δεσμούς  $\alpha$ -1,4 τα οποία συνδέονται ομοιοπολικά στο υδροξύλιο της Tyr194 της γλυκογενίνης. Τα κοκκία γλυκογόνου σχηματίζονται γύρω από τη γλυκογενίνη η οποία καθορίζει την ποσότητα των κοκκίων και όχι το μέγεθός τους. Στο σημείο αυτό, η συνθάση του γλυκογόνου αναλαμβάνει να επεκτείνει το μόριο του γλυκογόνου. (Lehninger, 2011)( Stryer L. *et al.*, 2012)



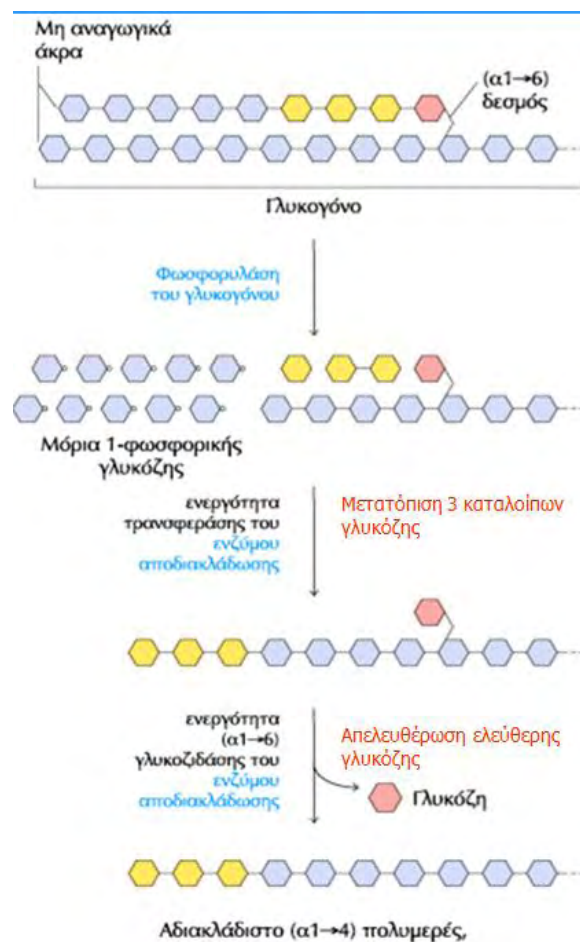
Εικόνα 3: α) Οι  $\alpha$  και  $\beta$  αλυσίδες του γλυκογόνου και η γλυκογενίνη που εμφανίζεται ως μαύρη κουκίδα στο κέντρο. (Roach PJ, *et al.*, 2012) β) Κρυσταλλική δομή της γλυκογενίνης. (Gibbons BJ., *et al.*, 2002)

### 1.1.3 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936 και συνίσταται από τρία βήματα:

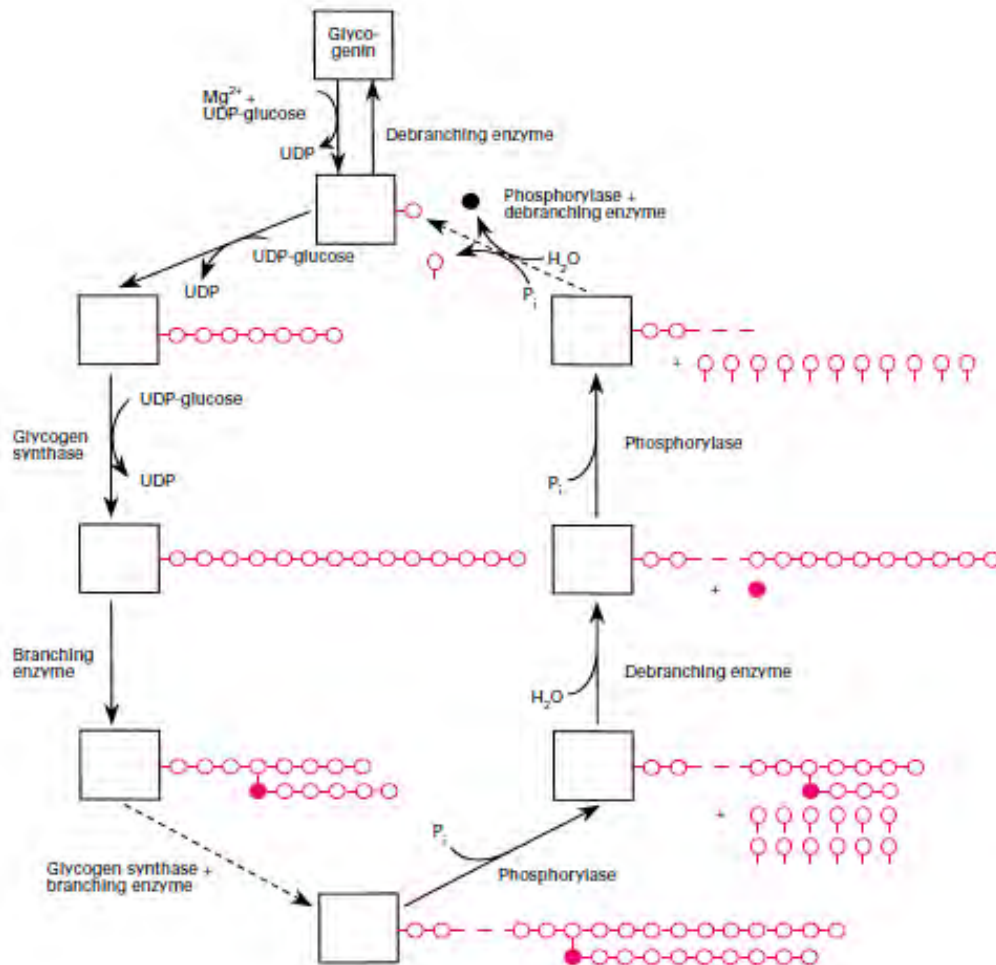
- ❖ Παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης μέσω της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου
- ❖ Ανακατασκευή του υποστρώματος γλυκογόνου για να αποικοδομηθεί περαιτέρω μέσω του ενζύμου αποδιακλάδωσης.
- ❖ Μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό με τη δράση της φωσφογλυκομουτάσης

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου λαμβάνει χώρα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων. Στο κυττόςλιο, η διάσπαση του γλυκογόνου πραγματοποιείται μέσω της συντονισμένης δράσης δύο ενζύμων: της **φωσφορυλάσης του γλυκογόνου** και του **ενζύμου αποδιακλάδωσης**. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου από τα μη αναγωγικά άκρα των αλυσίδων του γλυκογόνου για την παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διαδικασία της φωσφορόλυσης πραγματοποιείται με τη βοήθεια του συνενζύμου φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Η  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτάση γνωστή επίσης ως **ένζυμο αποδιακλάδωσης** υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό  $\alpha$ -1,6 διότι οι γλυκοζιτικοί δεσμοί  $\alpha$ -1,6 στα σημεία διακλάδωσης δεν διασπώνται από την φωσφορυλάση (Adeva-Andany M.M *et al.*, 2016), (Bollen M. *et al.*, 1998), (Stryer L. *et al.*, 2012)



**Εικόνα 4:** Ανακατασκευή του γλυκογόνου. Διακρίνεται η διάσπαση των  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικών δεσμών από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου καθώς και η δράση της και της  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτάσης. (Lehninger, 2011)

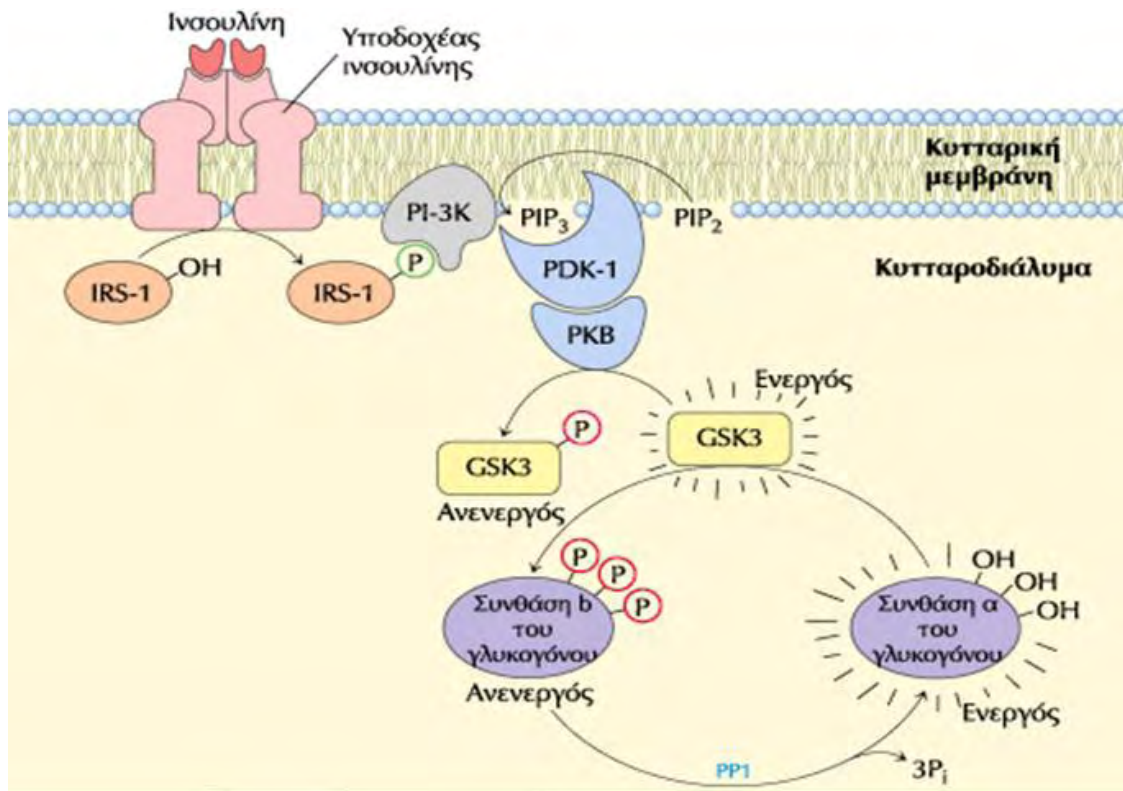
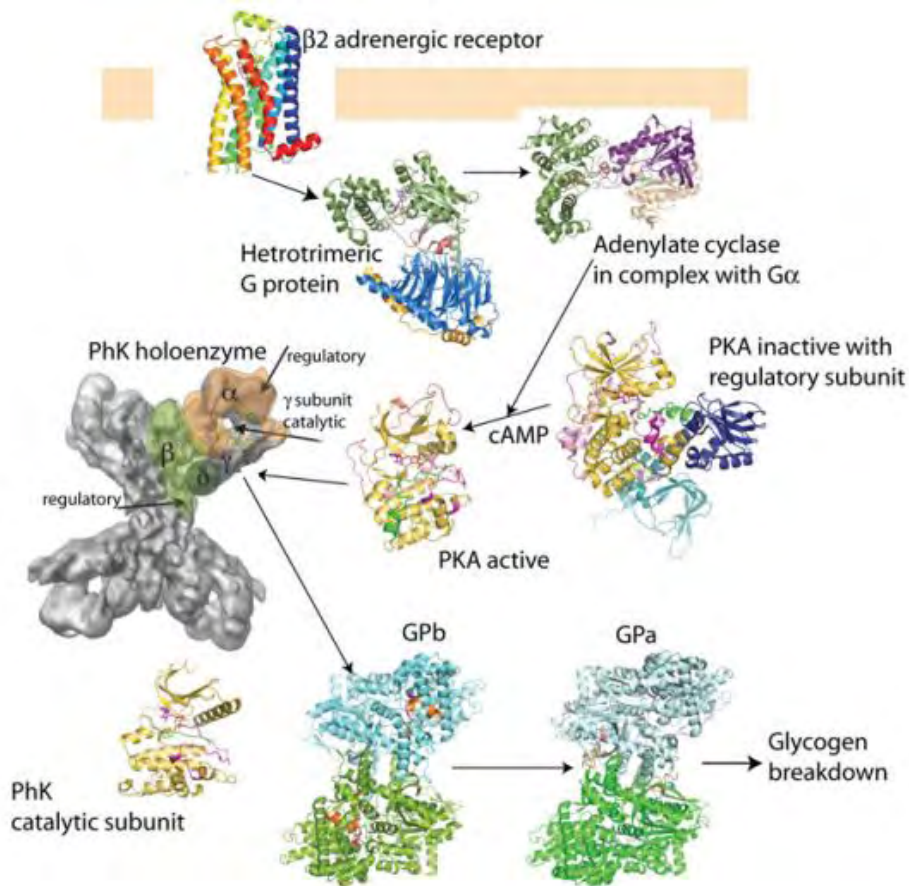
## ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ



Εικόνα 5: Σύνοψη των σταδίων σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου. (Bollen M. *et al.*, 1998)

### 1.1.4 Ορμονική ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου

Η γλυκαγόνη και η αδρεναλίνη (επινεφρίνη) σηματοδοτούν την έναρξη της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στους μυς και το ήπαρ και καταστέλλουν τη σύνθεση του γλυκογόνου μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Με αυτόν τον τρόπο φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται τα βασικότερα ένζυμα της γλυκογονόλυσης, κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η ινσουλίνη, αντίθετα, επιταχύνει τη σύνθεση του γλυκογόνου. Η γλυκαγόνη εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των νησίδων του παγκρέατος ως απόκριση στα χαμηλά επίπεδα της γλυκόζης του αίματος σε κατάσταση νηστείας. Η ινσουλίνη, που εκκρίνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, συντίθεται αρχικά ως ανενεργό μόριο, την προϊνσουλίνη, η οποία στη συνέχεια υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση ώστε να αφαιρεθεί ένα πεπτίδιο και να προκύψει η ινσουλίνη. Η ινσουλίνη διεγείρει τη σύνθεση του γλυκογόνου ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) η οποία αποφωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τη φωσφορυλάση α και την κινάση της φωσφορυλάσης ενώ ταυτόχρονα φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη συνθάση α. (Stryer L. *et al.*, 2012) (Youngren JF, 2007)



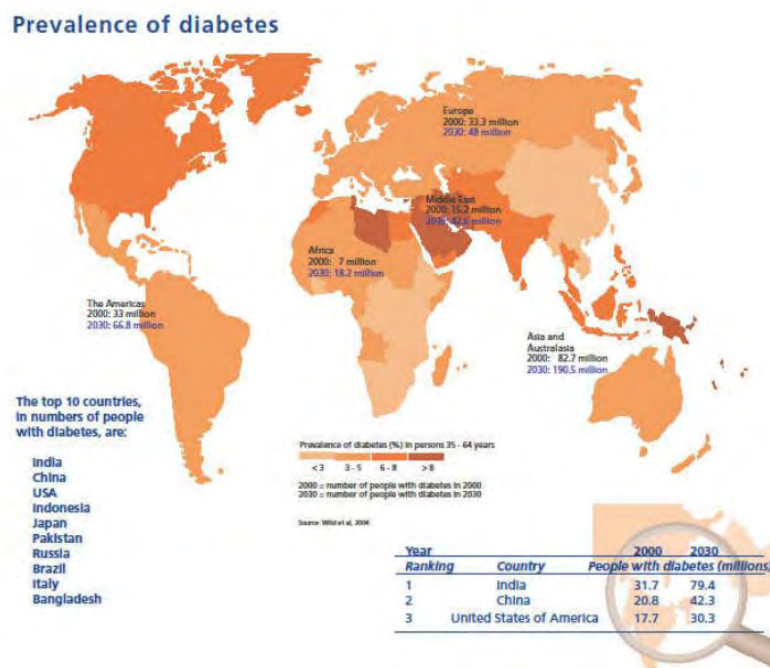
**Εικόνα 6:** α) Ρύθμιση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου από τη γλυκαγόνη και την αδρεναλίνη (Johnson 2009) β) Ρύθμιση της σύνθεσης γλυκογόνου από την ινσουλίνη (Lehninger, 2011)

## 1.1.5 Διαταραχές του μεταβολισμού του γλυκογόνου

### 1.1.5.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία ομάδα μεταβολικών διαταραχών οι οποίες έχουν ως βασικό τους χαρακτηριστικό την τάση για χρόνια υπεργλυκαιμία όταν διαταράσσεται η ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα. Η χρόνια υπεργλυκαιμία συνδέεται με μακροχρόνια καταστροφή ή δυσλειτουργία ποικίλων οργάνων όπως των ματιών, των αιμοφόρων αγγείων, της καρδιάς, των νεφρών και των νεύρων και οφείλεται σε ελαττωματική έκκριση ή δράση της ινσουλίνης ή και των δύο. Η διεργασία που εμπλέκεται κυρίως στην ανάπτυξη του διαβήτη είναι η αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος και κατά συνέπεια, η έλλειψη ινσουλίνης. (American Diabetes Association)

Ο σακχαρώδης διαβήτης τείνει να λάβει διαστάσεις επιδημίας σε συνδυασμό με την αύξηση των χαρακτηριστικών του λεγόμενου «μεταβολικού συνδρόμου» (παχυσαρκία, αντίσταση στην ινσουλίνη και δυσλιπιδαιμία). (Moller D.E, 2001) Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το Διαβήτη ( International Diabetes Foundation- IDF), το 2015, 415 εκατομμύρια ασθενείς ανά τον κόσμο έπασχαν από διαβήτη και ο αριθμός αυτός είναι πολύ πιθανό να ανέλθει στα 642 εκατομμύρια το 2040. Σύμφωνα με στοιχεία της Ελληνικής Διαβητολογικής Εταιρείας, το ποσοστό του πληθυσμού που πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη στην Ελλάδα είναι περίπου 10%.



**Εικόνα 7:** Κατανομή των ασθενών που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως. (WHO, Diabetes Action Now booklet)

Τα βασικότερα συμπτώματα της υπεργλυκαιμίας είναι η πολυδιψία, η πολουρία, η απώλεια σωματικού βάρους και η θολή όραση ενώ οι μακροπρόθεσμες επιπλοκές του διαβήτη είναι η νεφροπάθεια (που μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια), αμφιβληστροειδοπάθεια με πιθανή απώλεια όρασης και η νευροπάθεια που οδηγεί σε έλκη στα πόδια και πιθανόν ακρωτηριασμό ( το λεγόμενο «πόδι του διαβητικού» το οποίο εμφανίζει πόνο χωρίς την επίδραση εξωτερικού ερεθίσματος) όπως επίσης και σε διάφορες δυσλειτουργίες του γαστρεντερικού, καρδιαγγειακού και αναπαραγωγικού συστήματος. Τέλος, οι ασθενείς που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη διατρέχουν υψηλότατο κίνδυνο εμφάνισης υπέρτασης, διαταραχών στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών και αθηροσκλήρωσης. (American Diabetes Association)

Οι κυριότεροι τύποι σακχαρώδους διαβήτη είναι τρεις:

- Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ( ινσουλινοεξαρτώμενος ή αλλιώς νεανικός)
- Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2( μη-ινσουλινοεξαρτώμενος ή αλλιώς της ώριμης ηλικίας)
- Σακχαρώδης διαβήτης της κύησης.

### **Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1**

Σε αυτόν τον τύπο διαβήτη υπάρχει αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων των παγκρεατικών νησιδίων του Langerhans, τα οποία είναι υπεύθυνα για την έκκριση της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα να παρατηρείται ελάττωση ή παντελής έλλειψη έκκριση της ορμόνης. Η αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων έχει πολλαπλή γενετική προδιάθεση και ιστορικό συνδέεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι όμως δεν είναι ακόμη σαφώς καθορισμένοι. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 είναι το τελευταίο στάδιο μιας διαδικασίας σταδιακής καταστροφής των κυττάρων των νησιδίων.(Marshall & Bangert, 2011)

Το 10% των ασθενών με διαβήτη πάσχει από τον τύπο 1 και εμφανίζει απόλυτη εξάρτηση από την ινσουλίνη προκειμένου να επιβιώσει. Εμφανίζεται συνήθως σε οξεία μορφή σε νεαρά άτομα, με συμπτώματα που εμφανίζονται σε λίγες ημέρες ή εβδομάδες. (Marshall & Bangert, 2011) Στα άτομα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αυτού του τύπου διαβήτη, παρατηρούνται ορολογικές ενδείξεις αυτοάνοσων παθολογικών καταστάσεων στα παγκρεατικά νησίδια ενώ χρήσιμο ρόλο στη διάγνωση διαδραματίζουν και οι γενετικοί δείκτες. Τέλος, η πλειοψηφία των ασθενών είναι παχύσαρκοι. (American Diabetes Association)

### **Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2**

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 οφείλεται σε ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης και η μειωμένη αυτή ευαισθησία προς την ινσουλίνη συχνά αναφέρεται ως αντίσταση στην ινσουλίνη. (Guyton & Hall, 2013) Η μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη προκαλεί ελάττωση του καταβολισμού και της αποθήκευσης υδατανθράκων με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι, σε αντίθεση με τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, τα β-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων του Langerhans εκκρίνουν ινσουλίνη, όμως αυτή δεν είναι ικανή να υπερνικήσει την αντίσταση και για το λόγο αυτό αυξάνεται η γλυκόζη του αίματος. Η ανεπαρκής δράση της ινσουλίνης επηρεάζει επίσης το μεταβολισμό του λιπώδους ιστού οδηγώντας σε αυξημένη ροή ελεύθερων λιπαρών και άνοδο των επιπέδων των τριγλυκεριδίων ανταποδίδοντας χαμηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας ( LDL). (Kantzung B.G, 2009)

Αποτελεί το 90-95% των περιπτώσεων σακχαρώδους διαβήτη και στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζεται στην ηλικία των 30 ετών, συχνά συνοδευόμενος από την παχυσαρκία, επειδή η παχυσαρκία προκαλεί εν μέρει αντίσταση στην ινσουλίνη. Η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να βελτιωθεί με την ελάττωση του σωματικού βάρους ή/και με φαρμακολογική αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας χωρίς όμως να αποκαθίσταται στο εντελώς φυσιολογικό. (Guyton & Hall, 2013) (American Diabetes Association). Οι περισσότεροι ασθενείς αντιμετωπίζουν τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, με δίαιτα και με ή χωρίς υπογλυκαιμικά φάρμακα από του στόματος αλλά οι περισσότεροι τελικά θα χρειαστούν θεραπεία με ινσουλίνη προκειμένου να επιτύχουν ικανοποιητικό γλυκαιμικό έλεγχο. Βέβαια, υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες οι ασθενείς δεν θα χρειαστούν θεραπεία με ινσουλίνη καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής τους προκειμένου να επιβιώσουν. (American Diabetes Association)

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 υπόκειται σε ισχυρή οικογενή επίδραση ενώ περιβαλλοντικοί παράγοντες θεωρούνται εξίσου σημαντικοί. Η αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην παθογένεια της νόσου, φαίνεται από τον υψηλό επιπολασμό της σε ορισμένες εθνολογικές ομάδες. (Marshall & Bangert, 2011) Πιθανόν, υπάρχουν πολλές διαφορετικές αιτίες αυτής της μορφής διαβήτη παρ'όλο που η ακριβής αιτιολογία δεν είναι γνωστή. Αυτή η μορφή, παραμένει συνήθως αδιάγνωστη για πολλά χρόνια επειδή η υπεργλυκαιμία εξελίσσεται βαθμιαία και στα πρώιμα στάδια δεν παρατηρούνται σε σοβαρό

βαθμό τα κλασσικά συμπτώματα στον ασθενή. Βέβαια, οι ασθενείς διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης μακροαγγειακών και μικροαγγειακών επιπλοκών και ο κίνδυνος αυτός αυξάνει ανάλογα με την ηλικία, την παχυσαρκία και την έλλειψη άσκησης και κάθε είδους σωματικής δραστηριότητας. (American Diabetes Association). Συμπερασματικά, επειδή ο τύπος 2 αφορά όπως προαναφέρθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων που πάσχουν από διαβήτη, είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης φαρμάκων προκειμένου το πρόβλημα να αντιμετωπιστεί ριζικά και αποτελεσματικά.

## Διαβήτης της κύησης

Ο διαβήτης της κύησης (ή GDM- Gestational Diabetes Mellitus) ορίζεται σαν μια οποιαδήποτε ανωμαλία των επιπέδων της γλυκόζης που επισημαίνονται για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της κύησης. Κατά τη διάρκεια της κύησης, ο πλακούντας και οι ορμόνες του δημιουργούν αντίσταση στην ινσουλίνη η οποία είναι περισσότερο έκδηλη κατά το τελευταίο τρίμηνο. Για το λόγο αυτό, είναι επιτακτική η ανάγκη διατήρησης άριστου γλυκαιμικού ελέγχου από την πλευρά της μητέρας. (American Diabetes Association). (Kantzung B.G, 2009)

### 1.1.5.2 Γλυκογονιάσεις

Με τον όρο γλυκογονιάσεις, αναφερόμαστε σε ασθένειες εναποθήκευσης γλυκογόνου που οφείλονται σε ανεπάρκεια των ενζύμων που ρυθμίζουν τον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Είναι γνωστές κληρονομικές μεταβολικές διαταραχές και εκδηλώνονται με διαφορετικές κλινικές εικόνες που αφορούν κατά κύριο λόγο το ήπαρ και τους μυς, ενώ δευτερευόντως εμπλέκονται τα κύτταρα του αίματος, η καρδιά και οι νεφροί. Οι ανεπάρκειες των ενζύμων προκαλούν είτε ανώμαλες συγκεντρώσεις γλυκογόνου στον εκάστοτε ιστό είτε μη φυσιολογικά σχηματισμένο γλυκογόνο. Ο προσδιορισμός του τύπου της ανεπάρκειας που έχει ένα άτομο εξαρτάται από τα συμπτώματα και συνήθως ο γιατρός πραγματοποιεί εξέταση αίματος και ούρων καθώς και βιοψία μυών ή/και ήπατος προκειμένου να προσδιοριστεί η ποσότητα ενός συγκεκριμένου ενζύμου σε ένα συγκεκριμένο σημείο του σώματος. ( Association for glycogen storage diseases)

Ειδικότερα, η πρώτη νόσος αποθήκευσης γλυκογόνου περιγράφηκε από τον Edgar von Gierke το 1929. Η ενζυμική βλάβη στη νόσο αυτή αφορά τη φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Το ένζυμο αυτό απελευθερώνει γλυκόζη η οποία αποδίδεται στο αίμα και έλλειψη του ενζύμου αυτού προκαλεί υπερβολικά χαμηλές τιμές σακχάρου σε νηστικά άτομα. Η ανωμαλία βρίσκεται στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου, η οποία σταματά ενώ η σύνθεση συνεχίζεται κανονικά, γεγονός που οδηγεί σε εναποθήκευση γλυκογόνου. (Karlson P. *et al.*, 2005) ( Stryer L. *et al.*, 2012)

Οι νόσοι που σχετίζονται με μειωμένη δράση ή ανεπάρκεια σημαντικών ενζύμων της γλυκογονόλυσης είναι: **η νόσος McArdle ( V)**, **η νόσος Hers (VI)** και **η νόσος VIII**. Στη νόσο McArdle, παρατηρείται έλλειψη της μυϊκής ισομορφής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο PYGM που κωδικοποιεί την εν λόγω πρωτεΐνη. Στους ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο αυτή, η διαθεσιμότητα της γλυκόζης είναι περιορισμένη κατά τη σύσπαση των μυών με αποτέλεσμα να παρατηρούνται κράμπες, κόπωση και αύξηση του καρδιακού ρυθμού. Αυτό συμβαίνει διότι οι μύες δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τις αποθήκες γλυκογόνου για να κερδίσουν ενέργεια. Στη νόσο Hers, παρατηρείται έλλειψη της ηπατικής ισομορφής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου PYGL που κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Η νόσος αυτή, είναι μία ασυνήθιστη ανωμαλία που συνήθως οδηγεί σε φαινότυπο με ήπια κλινικά χαρακτηριστικά και η θεραπεία που συνήθως ακολουθείται είναι η αποφυγή παρατεταμένης νηστείας και η κατανάλωση σνακ πριν τον ύπνο για να αποφευχθεί η υπογλυκαιμία το πρωί της επόμενης ημέρας. (Adeva-Andany M.M *et al.*, 2016).

Τέλος, στη νόσο VIII παρατηρείται έλλειψη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Αυτό συμβαίνει λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο PHKA1 που κωδικοποιεί τη μυϊκή ισομορφή του ενζύμου (και ειδικότερα την  $\alpha$  υπο

μονάδα) και στα γονίδια PHKA2 (που κωδικοποιεί την  $\alpha$  υπομονάδα της ηπατικής ισομορφής), PHKB (που κωδικοποιεί τη  $\beta$  υπομονάδα τόσο της μυϊκής όσο και της ηπατικής ισομορφής) και PHG2 (που κωδικοποιεί τη  $\gamma$

υπομονάδα της ηπατικής ισομορφής). Από άποψη φαινοτύπου και κλινικών χαρακτηριστικών, σοβαρότερες θεωρούνται οι μεταλλάξεις των γονιδίων PPKA2 και PPKG2 δεδομένου ότι μπορεί να οδηγήσουν σε χρόνια ασθένεια του ήπατος και σε κίρρωση του ήπατος αντίστοιχα. (Adeva-Andany M.M *et al.*, 2016).

Τύπος	Ένζυμο που λείπει	Όργανο που προσβάλλεται	Γλυκογόνο στο όργανο που προσβάλλεται	Κλινικά χαρακτηριστικά
I ΝΟΣΟΣ VON GIERKE	Φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης	Ήπαρ και νεφροί	Αυξημένη ποσότητα, κανονική δομή.	Διογκωμένο ήπαρ. Αδυναμία ανάπτυξης. Πολύ σοβαρή υπογλυκαιμία, κέτωση, υπερουρικαιμία, υπερλιπιδαιμία.
II ΝΟΣΟΣ POMPE	$\alpha$ -1,4-Γλυκοζιτάση (λυσosomalτική)	Όλα τα όργανα	Πολύ αυξημένη ποσότητα, κανονική δομή.	Οι ασθενείς πεθαίνουν συνήθως πριν κλείσουν δύο έτη ζωής, από καρδιοαναπνευστική ανεπάρκεια.
III ΝΟΣΟΣ CORI	Αμυλο-1,6-γλυκοζιτάση (ένζυμο αποδιακλάδωσης)	Μύες και ήπαρ	Αυξημένη ποσότητα, μικρές εξωτερικές διακλαδώσεις.	Όπως η τύπου I, με ηπιότερη όμως εξέλιξη.
IV ΝΟΣΟΣ ANDERSEN	Ένζυμο διακλάδωσης ( $\alpha$ -1,4 $\rightarrow$ $\alpha$ -1,6)	Ήπαρ και σπλήνας	Κανονική ποσότητα, πολύ επιμήκεις εξωτερικές διακλαδώσεις.	Σταδιακή κίρρωση του ήπατος. Η προκύπτουσα ηπατική ανεπάρκεια προκαλεί τον θάνατο συνήθως πριν από την ηλικία των δύο ετών.
V ΝΟΣΟΣ McARDLE	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	Μύες	Ελαφρώς αυξημένη ποσότητα, κανονική δομή.	Περιορισμένη δυνατότητα για έντονη άσκηση, λόγω επώδυνων μυϊκών συσπάσεων. Κατά τα άλλα, οι ασθενείς είναι φυσιολογικοί και η ανάπτυξη τους κανονική.
VI ΝΟΣΟΣ HERS	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	Ήπαρ	Αυξημένη ποσότητα.	Όπως και η τύπου I, με ηπιότερη όμως πορεία.
VII	Φωσφοφρουκτοκινάση	Μύες	Αυξημένη ποσότητα, κανονική δομή.	Όπως και η τύπου V.
VIII	Κινάση της φωσφορυλάσης	Ήπαρ	Αυξημένη ποσότητα, κανονική δομή.	Μικρής έκτασης διόγκωση του ήπατος. Ήπια υπογλυκαιμία.

Σημείωση: Οι τύποι I έως VII κληρονομούνται ως αυτοσωματικοί υπολειπόμενοι. Ο τύπος VIII είναι φυλοσύνδετος.

**Εικόνα 8:** Πίνακας με τις κυριότερες νόσους αποθήκευσης γλυκογόνου. ( Stryer L. *et al.*, 2012)

## 1.2 Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK)

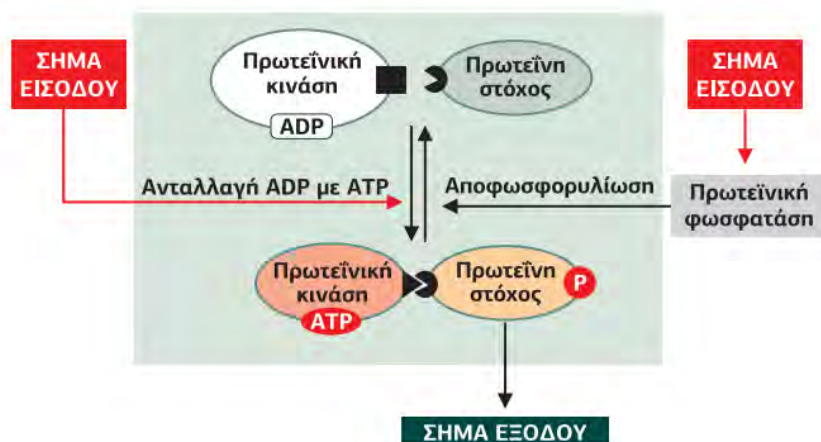
### 1.2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες – Η φωσφορυλίωση ως αντιστρεπτή ομοιοπολική τροποποίηση

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα τα οποία ρυθμίζουν τα ενδοκυτταρικά γεγονότα μέσω της διαδικασίας που ονομάζεται φωσφορυλίωση Η διαδικασία αυτή είναι αντιστρεπτή και μεταβάλλει τη βιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών μέσω ρύθμισης της δομής τους ή/και της δραστηρότητας τους. Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών είναι η πλέον διαδεδομένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της δομής τους και επηρεάζει τουλάχιστον το 1/3 όλων των κυτταρικών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να αποτελεί σημαντικό μηχανισμό ελέγχου στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι στόχοι της φωσφορυλίωσης είναι τα αμινοξέα Ser, Thr και Tyr και δευτερευόντως τα αμινοξέα His, Cys και Asp. (Gomperts B., *et al.*, 2009)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν μία από τις πιο γνωστές οικογένειες ενζύμων. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα τα γονίδια κινασών τα οποία αντιστοιχούν στο 1,7 % του συνόλου των γονιδίων. Οι ευκαρυωτικές κινάσες καταλύουν τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων με δότη φωσφορικών το ATP. Για να αποκτήσουν πλήρη ενζυμική δραστηρότητα πολλές από αυτές πρέπει να υποστούν αυτοφωσφορυλίωση ή να φωσφορυλιωθούν από μια άλλη κινάση. Οι φωσφορικές ομάδες που προστίθενται δεν μπορούν να μεταφερθούν σε άλλες πρωτεΐνες αλλά αντί για αυτό αλλάζουν τη διαμόρφωση της κινάσης διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση με το ATP και το πρωτεϊνικό υπόστρωμα. Η φωσφορυλίωση επηρεάζει τη λειτουργία, τη δραστηρότητα και τον



υποκυτταρικό εντοπισμό του πρωτεϊνικού υποστρώματος καθώς επάγει αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και εμφανίζει θέσεις πρόσδεσης για μόρια τελεστές. (Gomperts B., *et al.*, 2009)



**Εικόνα 9:** Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών ως διακόπτης. Η ενεργή κινάση μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα (P) από το ATP στην πρωτεΐνη στόχο, η διαμόρφωση και η λειτουργία της οποίας αλλάζει, αποτελώντας το σήμα εξόδου. (Gomperts B., *et al.*, 2009)

## 1.2.2 Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK)

### 1.2.2.1 Γενικά στοιχεία

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*PhK*, EC 2.7.11.19) των σκελετικών μυών του κουνελιού ήταν η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που αναγνωρίστηκε το 1955 από τους Fischer και Krebs και απομονώθηκε από τον Krebs το 1964. Είναι ένα βασικό ένζυμο που εμπλέκεται στον έλεγχο της αποικοδόμησης του γλυκογόνου (γλυκογονόλυσης) και ανταποκρίνεται σε σήματα που προκύπτουν από αλληλεπιδράσεις ορμονών με τους υποδοχείς τους και από νευρωνικές ώσεις που διαμεσολαβούνται από το ασβέστιο λόγω ενδοκυτταρικών συμβάντων. (E.D.Lowe *et al.*, 1997) Η PhK τροποποιεί ομοιοπολικά τη φωσφορυλίωση την ανενεργή μορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου β (GPβ) στη Ser14 μετατρέποντάς τη σε ενεργή α (GPα). Είναι ένα ετεροτετραμερές μόριο και αποτελείται από 4 υπομονάδες με στοιχεία δεκαεξαμερούς (αβγδ)<sub>4</sub> και έχει συνολικό μοριακό βάρος  $1,3 \times 10^6$  Da. Οι υπομονάδες α, β και δ έχουν ρυθμιστική λειτουργία ενώ η καταλυτική δραστηριότητα εντοπίζεται στην γ υπομονάδα. (Brushia & Walsh, 1999).

Πιο συγκεκριμένα, η α (138 kDa, 1237 αα) και η β (125 kDa, 1092 αα) υπομονάδα είναι ομόλογες και φωσφορυλίωση ή αυτοφωσφορυλίωσή τους έπειτα από ορμονική διέγερση οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης. Η γ υπομονάδα (44,7 kDa) αποτελείται από μία περιοχή κινάσης στο αμινοτελικό άκρο (κατάλοιπα 20-276) και μία ρυθμιστική περιοχή δέσμευσης της καλμοδουλίνης (κατάλοιπα 298-396) στο καρβοξυτελικό άκρο. Η δ υπομονάδα έχει δράση καλμοδουλίνης και παρουσία ιόντων ασβεστίου ενεργοποιεί τη γ υπομονάδα (Brushia & Walsh, 1999). (Bryan-Venien *et al.*, 2009) Η καλμοδουλίνη είναι μία πολυλειτουργική ενδιάμεση αγγελιοφόρος πρωτεΐνη που συνδέεται με το ασβέστιο και με αυτόν τον τρόπο ενεργοποιείται. Εκφράζεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και δρα ως τμήμα μιας οδού μεταγωγής σήματος ασβεστίου, τροποποιώντας τις αλληλεπιδράσεις με διάφορες πρωτεΐνες-στόχους όπως κινάσες και φωσφατάσες. (Branden & Tooze, 1999).

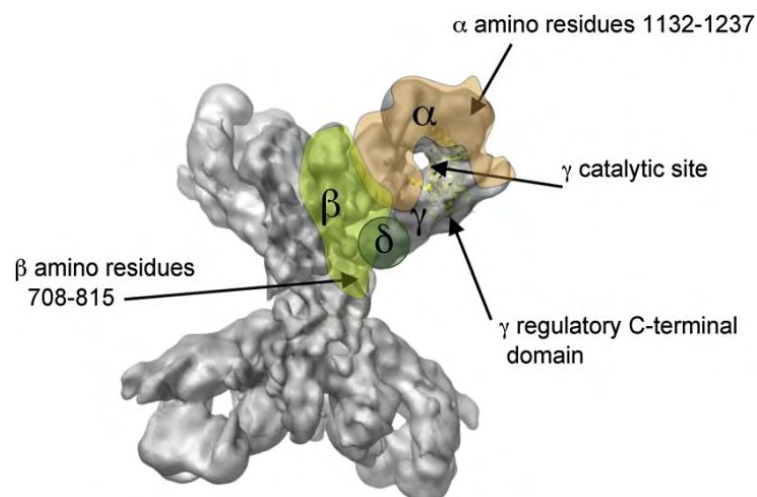
In vivo, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου και η συνθάση του γλυκογόνου έχουν αναγνωρισθεί ως τα μοναδικά υποστρώματα της PhK, παρόλο που και άλλες πρωτεΐνες φωσφορυλιώνονται, in vitro, από την PhK όπως η τροπονίνη I, η τροπονίνη T και η καζείνη. ( Skamnaki, V.T *et al.*, 2013) Ως τώρα, η ρύθμιση της γλυκογονόλυσης είναι η μοναδική φυσιολογική λειτουργία που αποδίδεται στην PhK, αν και πιθανόν να βρεθούν και άλλες που να σχετίζονται με αυτό το ένζυμο. (Brushia & Walsh, 1999).

### 1.2.2.2 Ισομορφές της PhK

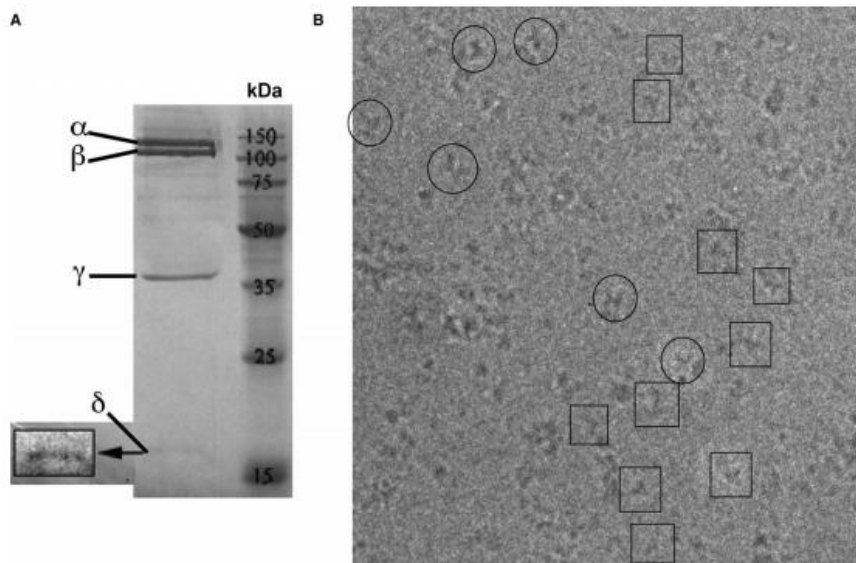
Η PhK εμφανίζει εκτεταμένη κατανομή στους ιστούς αλλά κυρίως εντοπίζεται στο ήπαρ, τους μυς και τον εγκέφαλο. (Brushia & Walsh, 1999). Στον εγκέφαλο, εντοπίζεται στα κύτταρα της αστρογλοίας τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του εγκεφάλου. Οι διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου που υπάρχουν στο ήπαρ και τους μυς αντικατοπτρίζουν τους διαφορετικούς «προορισμούς» της 1-φωσφορικής γλυκόζης, του 1<sup>ου</sup> δηλαδή προϊόντος της γλυκογονόλυσης. ( Skamnaki, V.T *et al.*, 2013) Η α-υπομονάδα της PhK (PHKA) έχει δύο ισομορφές την μυϊκή (PHKA1) και την ηπατική (PHKA) οι οποίες κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια. Η β-υπομονάδα (PHKB) κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο και οι διαφορετικές ισομορφές της είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος. Η γ-υπομονάδα (PHKG) έχει δύο ισομορφές, την μυϊκή (PHKG1) και την ηπατική (PHKG2), οι οποίες κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια. Τέλος, η δ-υπομονάδα (ή καλμοδουλίνη) εκφράζεται παντού και κωδικοποιείται από τρία ανεξάρτητα γονίδια τα CALM1, CALM2 και CALM3. (Adeva-Andany M.M *et al.*, 2016).

### 1.2.2.3 Δομή της PhK

Όπως ήδη προαναφέρθηκε η κινάση της φωσφορυλάσης έχει μοριακό βάρος 1.3 MDa και αποτελείται από τέσσερις τύπους υπομονάδων α,β,γ,δ με στοιχειομετρία δεκαεξαμερούς (α,β,γ,δ)<sub>4</sub>. (Pickett-Gies & Walsh, 1986). Οι υπομονάδες α, β και δ είναι ρυθμιστικές ενώ η γ είναι η καταλυτική υπομονάδα. Δεδομένου του μεγάλου μεγέθους της και της πολυπλοκότητάς της, η PhK είναι δύσκολο να κρυσταλλωθεί και άρα δεν μπορεί να κατανοηθεί σε βάθος η ρύθμιση της ενζυμικής της δραστηριότητας. Για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της, η μέθοδος που έχει κυρίως χρησιμοποιηθεί, είναι αυτή της κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-EM). Στις μελέτες κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας χρησιμοποιήθηκε η PhK του κουνελιού και παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο έχει διάταξη πεταλούδας με δύο λοβούς που συνδέονται με δύο λοξές γέφυρες. (Bryan-Venien *et al.*, 2009)



**Εικόνα 10:** Δομή του ολοενζύμου της PhK όπου εντοπίζεται η κάθε υπομονάδα της. (Bryan-Venien *et al.*, 2009)



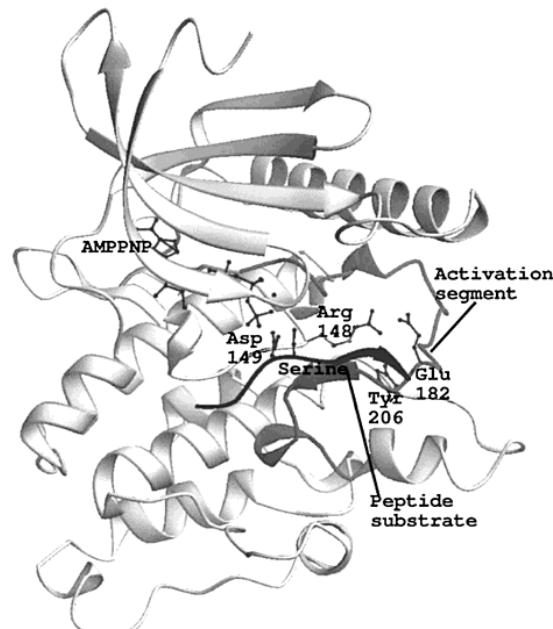
**Εικόνα 11:** α) Ηλεκτροφόρηση PhK σε πήκτωμα 10% SDS-PAGE β) Κρυο-ηλεκτρονική μικρογραφία της PhK. Η χαρακτηριστική μορφή πεταλούδας επισημαίνεται με κύκλο, ενώ οι λουπές διαμορφώσεις με τετράγωνο (Bryan-Venien *et al.*, 2009)

Οι υπομονάδες α και β αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με την γ υπομονάδα ενώ η δ υπομονάδα αλληλεπιδρά μόνο με τη γ υπομονάδα. Πιο συγκεκριμένα, η αμινοτελική περιοχή της α υπομονάδας ( περίπου 500 αμινοξέα ) αλληλεπιδρά με την β υπομονάδα ενώ μέσω πειραμάτων σταυροσυνδέσεων αποδείχτηκε η αλληλεπίδραση συγκεκριμένων περιοχών του καρβοξυτελικού άκρου της α υπομονάδας με την γ καταλυτική υπομονάδα. (Bryan-Venien *et al.*, 2009)

**α και β υπομονάδες:** οι α και β υπομονάδες αποτελούν ρυθμιστικές υπομονάδες του ενζύμου με μοριακά βάρη 138 kDa και 125 kDa, αντίστοιχα, αποτελούν το 81% του ολοενζύμου της PhK και αναστέλλουν την καταλυτική δράση της γ υπομονάδας. Τόσο η α όσο και η β υπομονάδα περιέχουν μια αλληλουχία πολυ-ισοπρενυλίωσης στο καρβοξυτελικό τους άκρο και ταυτόχρονα, μελέτες στην PhK του κουνελιού έδειξαν ότι και οι δύο υπομονάδες είναι φαρνεσυλιωμένες. Η φαρνεσυλίωση πιθανόν κατευθύνει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της PhK και σταθεροποιεί τη δομή των α και β υπομονάδων. Επίσης, η φαρνεσυλίωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της PhK με άλλες πρωτεΐνες. Η υπομονάδα β έχει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης κάποιες από τις οποίες αυτοφωσφορυλιώνονται από την κινάση της φωσφορυλάσης ενώ η Ser26 φωσφορυλιώνεται από την cAPK (Kiliman *et al.*, 1988).

**γ υπομονάδα:** η γ υπομονάδα αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα της PhK και το μοριακό βάρος της μυϊκής ισομορφής είναι περίπου 45 kDa. Η γ υπομονάδα της μυϊκής ισομορφής της PhK του κουνελιού είναι η πιο καλά χαρακτηρισμένη, έχει εντοπιστεί με τη βοήθεια αντισωμάτων που συνδέονται σε αυτή (μέθοδος ELISA) και φαίνεται ότι βρίσκεται στο εσωτερικό των λοβών. Αποτελείται από μία περιοχή κινάσης στο αμινοτελικό άκρο (κατάλοιπα 20-276) και μία ρυθμιστική περιοχή δέσμευσης της καλμοδουλίνης ( κατάλοιπα 298-396) στο καρβοξυτελικό άκρο. (Bryan-Venien *et al.*, 2009) Η καταλυτική επικράτεια της γ-καταλυτικής υπομονάδας της PhK είναι συνεχώς ενεργή χωρίς να απαιτείται η φωσφορυλίωση του ενζύμου με φωσφορυλίωση στην περιοχή ενεργοποίησης κινάσης όπως συμβαίνει με άλλες πρωτεϊνικές κινάσες. Αυτό συμβαίνει λόγω της ύπαρξης ενός κατάλοιπου γλουταμινικού οξέος (Glu182) το οποίο «μιμείται» φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης ή/και τυροσίνης με αποτέλεσμα η επικράτεια αυτή να καθίσταται ιδιοσυστάτα ενεργή. Επιπλέον, όπως όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες των ευκαρυωτικών οργανισμών, η PhK περιέχει ένα συντηρημένο κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος (Asp149) στην καταλυτική υπομονάδα. Δομικές μελέτες σε τρεις πρωτεϊνικές κινάσες που βρίσκονται σε τριμερή σύμπλοκα με ανάλογα του ATP έδειξαν ότι το συγκεκριμένο αυτό κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος βρίσκεται σε τέτοια θέση ώστε να είναι πιθανό να συμμετέχει και αυτό στην κατάλυση της ενζυμικής αντίδρασης. (Skamnakis, V.T, *et al.*,1999)

Το καρβοξυτελικό άκρο της γ καταλυτικής υπομονάδας της ΡhΚ εμφανίζει 2 περιοχές σύνδεσης με την καλμοδουλίνη, γεγονός που εξηγεί την ισχυρή σύνδεση των γ και δ υπομονάδων. Το 1/3 του καρβοξυτελικού άκρου της μυϊκής ισομορφής της ΡhΚ δεν παρουσιάζει σημαντική ομολογία την αλληλουχία των αμινοξέων με άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, υποδεικνύοντας ότι έχει έναν «μοναδικό» ρόλο στην ΡhΚ και την γ υπομονάδα. (Skamnaki, V.T, *et al.*,1999)



**Εικόνα 12:** Δομή της ΡhΚ όπου διακρίνονται τα σημαντικά κατάλυτα Glu182 και Asp149. (Skamnaki, V.T, *et al.*,1999)

**δ υπομονάδα:** Όπως προαναφέρθηκε, η δ υπομονάδα έχει δράση καλμοδουλίνης, αποτελείται από 148 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 16,7 kDa. Βασικός της ρόλος είναι η δέσμευση ιόντων ασβεστίου στο μόριο της ΡhΚ, προσδίδοντάς του ευαισθησία στις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις ασβεστίου. (Grand *et al.*, 1981). Η καλμοδουλίνη έχει σχήμα κωδωνοειδές σχήμα και αποτελείται από μία α-έλικα η οποία συνδέει δύο σφαιρικές περιοχές δέσμευσης του ασβεστίου. (Brushia & Walsh, 1999). Η δ υπομονάδα είναι υπεύθυνη για την ασβέστιο-εξαρτώμενη δραστικότητα της ΡhΚ παρόλο που υπάρχουν αξιοσημείωτες διαφορές στον τρόπο με τον οποίο η καλμοδουλίνη εμπλέκεται στη δομή και ρύθμιση της ΡhΚ, σε σύγκριση με τη συμβολή της στη ρύθμιση άλλων ασβέστιο-εξαρτώμενων ενζύμων. (Pickett-Gies & Walsh, 1986).

Η καλμοδουλίνη συνήθως συνδέεται στις πρωτεΐνες-στόχους της με μηχανισμό που εξαρτάται από το ασβέστιο και αποσυνδέεται όταν η συγκέντρωση του ασβεστίου μειώνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Είναι ένα μόριο το οποίο περιλαμβάνει δύο επικράτειες που διαχωρίζονται από μια μακριά α-έλικα και κάθε επικράτεια περιλαμβάνει δύο μοτίβα "EF-hand" μέσω των οποίων γίνεται η πρόσδεση των ατόμων ασβεστίου και κατ'επέκταση η σύνδεση των πρωτεϊνών-στόχων. Εξάιρεση σε αυτόν τον κανόνα αποτελεί η ΡhΚ η οποία παραμένει αναπόσπαστο συστατικό του ολοενζύμου, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου (Brushia & Walsh, 1999)

### 1.2.2.4 Ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας της PhK

**A. Ρύθμιση με φωσφορυλίωση:** Η ομοιοπολική τροποποίηση της PhK με φωσφορυλίωση αποτελεί τον σημαντικότερο μηχανισμό ρύθμισης της δράσης της. Η PhK φωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) έπειτα από ορμονικά ερεθίσματα στις  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδες της με αποτέλεσμα να μετατρέπεται από μια μορφή χαμηλής δραστηριότητας σε μια μορφή υψηλής δραστηριότητας. Η φωσφορυλίωση συμβαίνει αρχικά μόνο στις  $\beta$  υπομονάδες και έπειτα φωσφορυλίωση των  $\alpha$  υπομονάδων ενισχύει την αύξηση της δραστηριότητας της PhK αλλά δεν είναι από μόνη της ικανή να προκαλέσει ενεργοποίηση του ενζύμου. Αύξηση της δραστηριότητας μπορεί να επιτευχθεί και με αυτοφωσφορυλίωσή της *in vitro*. Η αυτοφωσφορυλίωση λαμβάνει χώρα σε πολλά σημεία, στα οποία συγκαταλέγονται επίσης εκείνα στα οποία δρα η PKA. (Brushia & Walsh, 1999) (Stryer et al., 2012).

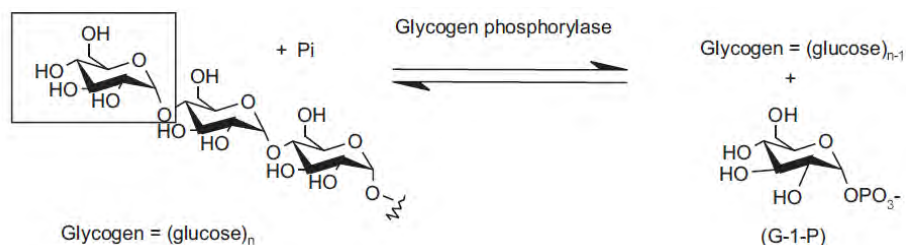
**B. Επίδραση του pH:** Η δραστηριότητα της PhK αυξάνει σημαντικά όταν μεταβληθεί το pH από 6,8 σε 8,2. Η αύξηση του pH ενεργοποιεί άμεσα την PhK και η κατάλυση της ενζυμικής αντίδρασης γίνεται 2πλάσια ή 3πλάσια σε σχέση με αυτή σε τιμή pH=6,8. Επιπλέον, μειώνεται η ανασταλτική δράση των  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδων στη  $\gamma$ , και η δραστηριότητα του ενζύμου αυξάνεται κατά 10-20 φορές. (Brushia & Walsh, 1999)

**Γ. Ασβέστιο:** Η μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από την PhK είναι ασβέστιο-εξαρτώμενη και στο γεγονός αυτό συμβάλει η  $\delta$  υπομονάδα. Η PhK μπορεί να ενεργοποιηθεί εν μέρει, από επίπεδα  $\text{Ca}^{2+}$  της τάξεως του  $10^{-6}$  M.. Η ενεργοποίηση του ενζύμου από ασβέστιο προϋποθέτει την κατάληψη τριών τουλάχιστον από τα τέσσερα κέντρα σύνδεσης  $\text{Ca}^{2+}$  της υπομονάδας  $\delta$  (Burger et al., 1982, 1983) Η υπομονάδα  $\delta$  είναι η ένας αισθητήρας ασβεστίου που διεγείρει πολλά ένζυμα στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτός ο τρόπος ενεργοποίησης είναι σημαντικός για τους μύς, όπου το έναυσμα της σύσπασης τους είναι η απελευθέρωση  $\text{Ca}^{2+}$  από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (Stryer et al., 2012).

**Δ. Απενεργοποίηση της PhK:** Η απενεργοποίηση της PhK έχει ως αποτέλεσμα να σταματά η διαδικασία αποικοδόμησης του γλυκογόνου και να ευνοείται η σύνθεσή του. Η πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) απενεργοποιεί την PhK με αποφωσφορυλίωση με αποτέλεσμα να μειώνεται ο ρυθμός διάσπασης του γλυκογόνου. (Stryer et al., 2012).

## 1.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (EC 2.4.1.1) ανακαλύφθηκε από το ζεύγος Cori το 1936 και καταλύει τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου προς απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης και γλυκογόνου με ένα λιγότερο κατάλοιπο γλυκόζης. Πιο συγκεκριμένα, ξεκινά τη δράση της από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου. (Stryer et al., 2012). Αποτελεί το πιο καλά μελετημένο ένζυμο του μεταβολισμού του γλυκογόνου και αποτελεί στόχο ενώσεων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα.



**Εικόνα 13:** Φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου που καταλύεται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η φωσφορολυτική διάσπαση πλεονεκτεί ενεργειακά διότι το απελευθερωμένο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο. (Treadway JL, et al., 2001)

Στον άνθρωπο υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου οι οποίες εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία σε ποσοστό 80%.

1. **Φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου:** Αποτελείται από 862 αμινοξέα και συναντάται κυρίως στα αστροκύτταρα και λιγότερο συχνά στους νευρώνες. Ο γενετικός τόπος που κωδικοποιεί τη συγκεκριμένη ισομορφή έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 22(γονίδιο PYGB).

2. **Μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου:** Αποτελείται από 841 αμινοξέα, κωδικοποιείται από το γονίδιο PYGM και παρέχει ενέργεια στους μυς.

3. **Ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου:** Αποτελείται από 846 αμινοξέα, κωδικοποιείται από το γονίδιο PYGL και ρόλος της είναι η διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης του οργανισμού ως συνόλου. (Adeva-Andany M.M *et al.*, 2016).

Η GP υπόκειται σε αντιστρεπτή ομοιοπολική τροποποίηση μέσω φωσφορυλίωσης στο κατάλοιπο Ser14 και έτσι υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: τη φωσφορυλάση α (GPα) και την β (GPβ) όπου η φωσφορυλάση α είναι συνήθως ενεργή και η φωσφορυλάση β συνήθως ανενεργή. Η φωσφορυλίωση αυτή καταλύεται από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK).

Επιπλέον, η GP είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο που ακολουθεί το μοντέλο των Monod, Wyman και Changeaux και βρίσκεται πάντοτε σε δύο μορφές: μία ενεργή, R, με υψηλή συγγένεια για υποστρώματα και τροποποιητές και μια ανενεργή, T, με χαμηλή συγγένεια για υποστρώματα και τροποποιητές οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το φωσφορικό είναι καλά διευθετημένη. Σε αντίθεση με την κατάσταση R, στην κατάσταση T το καταλυτικό κέντρο δεν είναι πλήρως προσβάσιμο. Η ισορροπία για τη φωσφορυλάση α ευνοεί την κατάσταση R ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση β ευνοεί την κατάσταση T. (Monod *et al.*, 1963; Monod *et al.*, 1965)

Όσον αφορά τη δομή, η GP είναι ένα ομοδιμερές που αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες των 97,5 kDa. Κάθε μονομερές περιέχει ένα μόριο φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ως συνένζυμο, συνδεδεμένο με μια βάση Schiff στη Lys 680 της κάθε υπομονάδας. Η κατάλυση της φωσφορόλυσης του γλυκογόνου γίνεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, το οποίο βρίσκεται σε μια σχισμή που σχηματίζεται με κατάλοιπα από τις δύο δομικές περιοχές. (Stryer *et al.*, 2012)

Κάθε υπομονάδα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχει έξι διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης (Εικόνα 14)

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

Το καταλυτικό κέντρο περιλαμβάνει τον βασικό συμπράγοντα PLP και βρίσκεται στο κέντρο κάθε υπομονάδας του ενζύμου.(Hayes JM *et al.*, 2014)

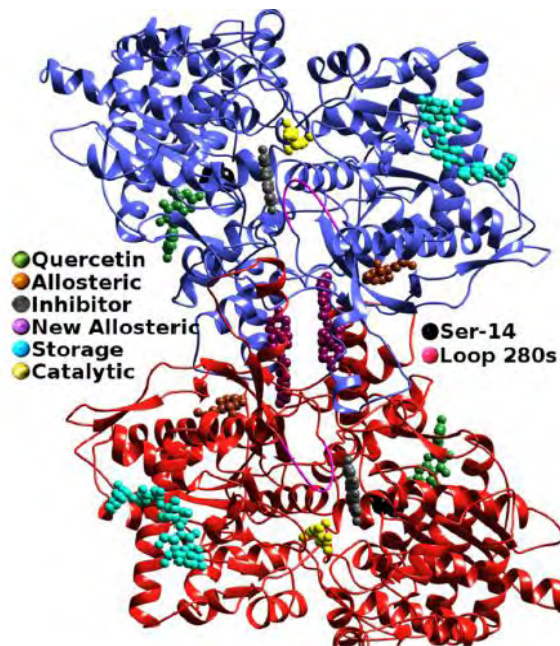
Το αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στην αμινοτελική περιοχή, αποτελείται από δομικά στοιχεία από τις δύο υπομονάδες του λειτουργικού διμερούς και αναγνωρίζει μια ποικιλία φωσφορυλιωμένων ενώσεων όπως AMP, ATP και 6-φωσφορική γλυκόζη. (Hayes JM *et al.*, 2014)

Το νέο αλλοστερικό κέντρο απέχει 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο και βρίσκεται εντός της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς ενζύμου που σχηματίζεται από τη σύνδεση των δύο υπομονάδων. (Hayes JM *et al.*, 2014)

Το κέντρο αναστολής βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Η καφεΐνη ήταν ο πρώτος αναστολέας που βρέθηκε να δεσμεύεται σε αυτό το κέντρο ( $K_i=0,1 \text{ mM}$ ). (Hayes JM *et al.*, 2014)

Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου της GP περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και είναι η περιοχή όπου συνδέεται το γλυκογόνο *in vivo* (Hayes JM *et al.*, 2014)

Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης: Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας (Kantsadi *et. al.*,2015) βρέθηκε ότι η κερσετίνη προσδένεται σε ένα νέο κέντρο. Αυτό το κέντρο απέχει 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. (Hayes JM *et al.*, 2014)



Εικόνα 14: Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου όπου διακρίνονται τα έξι διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης. (Κυριακίς *et al.*, 2018)

## 1.4 Τα ένζυμα της γλυκογονόλυσης ως μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη φαρμάκων

### 1.4.1 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Τα κυριότερα ένζυμα της γλυκογονόλυσης, η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελούν σημαντικούς στόχους βιοδραστικών μορίων που λειτουργούν ως αναστολείς των ενζύμων αυτών. Η αναστολή τους αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική στρατηγική έναντι κυρίως του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και του καρκίνου.

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, όπως προαναφέρθηκε, είναι το ένζυμο που φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την φωσφορυλάση b, στη Ser14 μετατρέποντάς τη στην ενεργή μορφή a. Με αυτόν τον τρόπο, αν ανασταλεί η κινάση της φωσφορυλάσης τότε τα επίπεδα της GPa θα μειωθούν και θα ευνοείται η σύνθεση γλυκογόνου και όχι η αποικοδόμησή του. Σε αυτό το πλαίσιο, έχει μελετηθεί η επώαση των ηπατοκυττάρων με τις φαινολικές ενώσεις προγλυκοσίνη και ρεσορκινόλη, προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο δρουν ανασταλτικά. Έτσι βρέθηκε ότι μειώνουν τη φωσφορυλάση a και αυτή η μείωση οφείλεται κατά ένα μέρος σε αναστολή της κινάσης της φωσφορυλάσης. (Van Schaftingen, 1995)

Εξίσου σημαντική είναι η αναστολή της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στο πεδίο του καρκίνου. Για παράδειγμα, αυτό έχει επιτευχθεί με τη χρήση του μορίου KT5720, που αποτελεί ανάλογο ινδριουβίδης. Η ινδριουβίδα είναι ισχυρός αναστολέας των πρωτεϊνικών κινάσων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο μέσω δέσμευσης στο κέντρο πρόσδεσης του ATP και έτσι είναι μια υποσχόμενη ένωση που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα εν δυνάμει αντικαρκινικό φάρμακο. Εξίσου καλά μελετημένο ανάλογο ινδριουβίδης είναι η 3'-οξίμη της ινδριουβίδης. (Begum J, et al., 2015)

Επιπρόσθετα, έχει μελετηθεί η αναστολή της κινάσης της φωσφορυλάσης σε *in vivo* σύστημα zebrafish και σε *in vitro* σύστημα ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προκειμένου να ανασταλεί η αγγειογένεση. Ως γνωστόν, η αγγειογένεση συμβάλλει στο σχηματισμό των πρώτων αγγείων από αγγειοβλάστες μεσοδερμικής προέλευσης και η **παθολογική** αγγειογένεση σχετίζεται με την ανάπτυξη όγκων και είναι προαπαιτούμενο για τη μετάσταση. Ως εκ τούτου, οι αναστολείς της αγγειογένεσης είναι επιθυμητοί για αντικαρκινικές θεραπείες. Το αποτέλεσμα της μελέτης έδειξε ότι η κινάση της φωσφορυλάσης υπερεκφράζεται σε δείγματα όγκων και για το λόγο αυτό ποικίλοι αναστολείς των παραγόντων αγγειογένεσης βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές. (Camus et al 2011)

Ωστόσο, το βασικότερο πρόβλημα στις μελέτες σχεδιασμού και πρόσδεσης αναστολέων στην κινάση της φωσφορυλάσης είναι ότι το κέντρο δέσμευσης του ATP είναι εξαιρετικά συντηρημένο και επομένως υπάρχει άμεση ανάγκη για νέες προσπάθειες σχεδιασμού ορθολογικών φαρμάκων.

#### 1.4.2 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι το βασικότερο ρυθμιστικό ένζυμο της γλυκογονόλυσης και παίζει ρόλο στην αποθήκευση γλυκόζης. Η αντίδραση που καταλύει είναι αυτή της φωσφορυλυτικής διάσπασης του γλυκογόνου. Βιοχημικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Οι τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του διαβήτη δεν επιτυγχάνουν ικανοποιητικό έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης του αίματος και δεν αντιμετωπίζουν άμεσα τις επιπλοκές του τελευταίου σταδίου διαβήτη όπως οι νευροπάθειες και οι αμφιβληστροειδοπάθειες. Στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, η παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ είναι αυξημένη και τα τωρινά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η γλυκογονόλυση συμβάλλει στην υψηλή παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ. (Oikonomakos & Somsak, 2008) (Moller D.E, 2001)

Έτσι, είναι επιτακτική η ανάγκη αναζήτησης νέων θεραπευτικών μηχανισμών όπως η αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, που είναι ένα πολύ καλά μελετημένο ένζυμο τόσο δομικά όσο και κινητικά. Με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζεται η γλυκογονόλυση και μειώνεται η παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ. Πολύ σημαντική παράμετρος είναι η στόχευση αποκλειστικά της ηπατικής ισομορφής για αναστολή και επιπλέον οι αναστολείς δεν θα πρέπει να επηρεάζουν τις άλλες ισομορφές. Παρ' όλα αυτά, η αναστολή της ηπατικής ισομορφής μπορεί να μειώσει τα επίπεδα παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ κατά 30-60% καθώς το υπόλοιπο ποσοστό αποδίδεται στην παραγωγή γλυκόζης μέσω της γλυκονογένεσης. (Treadway JL, et al., 2001)

Η πλειοψηφία των αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι ανάλογα γλυκόζης τα οποία προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο και συναγωνίζονται για τη δέσμευση με το υπόστρωμα. Γι' αυτό, στόχος είναι η εύρεση ενός αναστολέα που θα έχει δράση παρόμοια με αυτή της γλυκόζης αλλά θα δρα σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις από αυτή. Πρόσφατα, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχει χρησιμοποιηθεί για σάρωση φυσικών προϊόντων προκειμένου να ανακαλυφθούν μη συνταγογραφούμενα λειτουργικά τρόφιμα τα οποία θα ρυθμίζουν τα επίπεδα γλυκόζης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Μελέτες σε διαβητικά και μη ποντίκια έδειξαν ότι συγκεκριμένα φλαβονοειδή συμβάλουν στην υπογλυκαιμία. Τα φλαβονοειδή είναι φυσικές ενώσεις που εμφανίζονται σε μεγάλες ποσότητες στα φυτά και είναι η πιο κοινή κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων της διατροφής του ανθρώπου. Για παράδειγμα, το ελλαγικό οξύ είναι φυσικό φλαβονοειδές το οποίο έχει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου τόσο *in vitro* όσο και *ex vivo*. (Kyriakis E, et al., 2015)



Στο ίδιο πλαίσιο, έχει μελετηθεί η επίδραση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από τα προϊόντα οινοποίησης του σταφυλιού ποικιλίας *Vitis Vinifera* έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αναστολή *in vitro* και *ex vivo* υποδεικνύοντας ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα στα τρόφιμα για τη μείωση της υπεργλυκαιμίας. (Kantsadi et. al., 2015)

Τέλος, σημαντική αποδεικνύεται η αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στο πεδίο του καρκίνου και των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Πειράματα με αναστολείς έναντι της ηπατικής ισομορφής έδειξαν αναστολή της μυϊκής και εγκεφαλικής ισομορφής. Αυτές οι δύο ισομορφές εκφράζονται στο μυοκάρδιο και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου κατά τη διάρκεια ισχαιμίας μπορεί να συντελεί στην ανάπτυξη εμφράγματος. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου και ο αερόβιος μεταβολισμός της παραγόμενης γλυκόζης οδηγεί στην παραγωγή γαλακτικού οξέος και ιόντων υδρογόνου, τα οποία θεωρούνται ότι συμβάλουν στη βλάβη του μυοκαρδίου κατά την ισχαιμία. Δεδομένου ότι διαβητικοί ασθενείς διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιομυοπαθειών, θα ήταν ευεργετικό ένα φάρμακο το οποίο θα μειώνει τη γλυκόζη και θα επιδρά θετικά στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. (Treadway JL, et al., 2001)

Στο πεδίο του καρκίνου, πρόσφατες δημοσιεύσεις προτείνουν τη χρήση αναστολέων έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη όγκων, μία στρατηγική με μεγάλο θεραπευτικό παράθυρο. Καρκινικές κυτταρικές σειρές με μικρό ρυθμό αύξησης έχουν συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα γλυκογόνου σε σχέση με φυσιολογικούς ιστούς. Περαιτέρω ανάλυση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου έδειξε ότι το υψηλότερο ποσοστό γλυκογόνου παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα βρίσκονταν στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Η αναστολή διατηρεί τα κύτταρα στη φάση αυτή προκειμένου να εξασθενήσει η επανείσοδος των κυττάρων του όγκου στην κυτταρική διαίρεση και κατά συνέπεια η περαιτέρω αύξηση του όγκου. (Baker D.J, et al., 2006)

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η έρευνα αυτή, έχει ως στόχο τη μελέτη σημαντικών ενζύμων του μεταβολισμού του γλυκογόνου και την εύρεση ενώσεων που θα μπορούσαν να δράσουν ως αναστολείς των ενζύμων αυτών. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει το πρώτο στάδιο της γλυκογονόλυσης, αφού πρώτα ενεργοποιηθεί μέσω φωσφορυλίωσης από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Τα ένζυμα αυτά αποτελούν σημαντικούς μοριακούς φαρμακευτικούς στόχους για την αντιμετώπιση μεταβολικών διαταραχών όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2. Κατά συνέπεια, αναστολή των ενζύμων αυτών θα οδηγήσει σε μείωση της γλυκογονόλυσης κάτω από ανεπιθύμητες συνθήκες καθώς η αποικοδόμηση του γλυκογόνου οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη πρόσδεσης στην ανθρώπινη ηπατική κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και η αποτίμηση της δράσης δύο αναλόγων κουμαρίνης, προκειμένου να διαπιστωθεί αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντι-υπεργλυκαιμικοί παράγοντες. Οι κουμαρίνες είναι μία κατηγορία φαινολικών παραγώγων που απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή, δρουν ως δευτερογενείς μεταβολίτες και παράγονται κατά την αλληλεπίδραση του φυτού με το περιβάλλον. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως αντιμικροβιακοί, αντιβακτηριακοί, αντιμυκητιασικοί, αντιοξειδωτικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Οι κουμαρίνες αναστέλλουν διάφορες πρωτεΐνες στόχους και κυρίως ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των κινασών. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b, από σκελετικούς μυς κουνελιού (gmGPb) η οποία φωσφορυλιώθηκε με τη βοήθεια της γ καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης ηπατικής ισομορφής της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (hIPhK-γ). Στη συνέχεια, ακολούθησε προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της hIPhK-γ ως προς ATP και GPb και τέλος πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της IC<sub>50</sub> των δύο αναλόγων κουμαρίνης, προκειμένου να διερευνηθεί η ανασταλτική τους δράση έναντι της hIPhK-γ.

## 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 3.1 Υλικά – Όργανα

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
a-D-Glucose 1-phosphate dipotassium salt hydrate	Sigma
Acetic Acid (CH <sub>3</sub> COOH)	Sds
Acrylamide	Serva
Adenosine 5'-monophosphate monohydrate(AMP)	Sigma
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate(ATP)	Sigma
Ammonium Molybdate tetrahydrate	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Ammonium sulfate ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	ChemLab
β- Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
BES	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay	Biorad
Bromophenol Blue	Research Organics
Caffeine	Sigma
Calcium Chloride Dehydrate	Sigma
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	Serva
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)	Fermentas
Kanamycin monosulphate	Applichem
L-Ascorbic acid	Sigma
LB-Agar	Serva
Magnesium acetate tetrahydrate (CH <sub>3</sub> COOH) <sub>2</sub> Mg	Applichem
Pink prestained protein marker	Nippon Genetics
PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)	Applichem
Potassium bicarbonate	Sigma
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	Serva
Sodium Chloride (NaCl)	Applichem
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
TEMED ( <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine)	Invitrogen
Tris base	Merck
Zinc acetate	Sigma

Οργανολογία	Εταιρεία
Αυτόματες πιπέτες	Gilson
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης	BioRad
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Μετρητής pH	Metrohm
Σύστημα ÄKTA Purifier (FPLC)	GE Healthcare Life Sciences
Υδατόλουτρο	Wisebath
Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός/UV UV-1600PC Spectrophotometer	VWR
Φυγόκεντρος	HermLe Z36HK

Βακτηριακά στελέχη	Εταιρεία
E. coli BL-21 Gold (DE3)	Agilent Technologies

Ένζυμα	Εταιρεία
Benzonase	SIGMA

Στήλες χρωματογραφίας	Εταιρεία
HiTrap Blue sepharose HP	GE HeathCare
Protino GST/4B	Macherey-Magel

## 3.2 Παρασκευαστικές μέθοδοι

### 3.2.1 Καθαρισμός της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από μυϊκό ιστό κουνελιού.

Η μέθοδος απομόνωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από μυϊκό ιστό κουνελιών (*Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase b, rmGPb*) αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου Fisher and Krebs( *Meth in Enzymology Vol V, p 369-373, 1962*). Αντί για L-κυστεΐνη χρησιμοποιείται 2-μερκαπτο-αιθανόλη σε όλα τα στάδια της πορείας καθαρισμού.

Τα βήματα της απομόνωσης της rmGPb είναι τα εξής:

**A. Παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος:** Ο μυϊκός ιστός λαμβάνεται από τα πίσω πόδια και από τους ραχιαίους μυς κοντά στη σπονδυλική στήλη από 3-4 κουνέλια και τοποθετήθηκε αμέσως σε πάγο. Ακολουθεί ομογενοποίησή του σε κρεατομηχανή, ζύγισμα και επανατοποθέτησή του σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η ολική άλεση του ιστού. Μετά την ομογενοποίηση, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με απιονισμένο ύδωρ, εν ψυχρώ, τρεις φορές με συνολικό χρόνο εκχύλισης τα 30 λεπτά. Οι δύο πρώτες εκχυλίσεις έγιναν με όγκο απιονισμένου ύδατος ίσο με το βάρος του αλεσμένου μυϊκού ιστού ενώ κατά την τρίτη εκχύλιση ο όγκος του απιονισμένου ύδατος ήταν ίσος με το μισό του συνολικού βάρους του αλεσμένου κρέατος. Η διάρκεια της κάθε εκχύλισης αντιστοιχεί σε 10 λεπτά και η διήθηση του εκχυλίσματος έγινε μέσω διπλής γάζας. Στη συνέχεια, το εκχύλισμα διήθησε μέσω υαλοβάμβακα προς απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών.

**Β. Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον:** Το pH του ψυχρού εκχυλίσματος ρυθμίστηκε σε 5.1-5.2 με προσθήκη CH<sub>3</sub>COOH 1 N υπό ελαφριά ανάδευση. Η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνει κατά τη ρύθμιση του pH λόγω της κατακρήμνισης διαφόρων πρωτεϊνών. Στην συνέχεια, το εκχύλισμα αφήνεται στον πάγο για 5 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0-4 °C σε 5.000 rpm επί 30 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης απομακρύνονται οι πρωτεΐνες που καταβυθίστηκαν. Το υπερκείμενο υγρό διηθήθηκε με τη βοήθεια αντλίας κενού σε χωνί Buchner εν ψυχρώ προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα αιωρούμενου υλικού. Το pH του συνολικού πρωτεϊνικού διαλύματος ρυθμίστηκε σε 6.8 (ισοηλεκτρικό σημείο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου) με τη χρήση κεκορεσμένου διαλύματος KHCO<sub>3</sub>.

**Γ. Καταβύθιση του ενζύμου με θειϊκό αμμώνιο (90 % w/v):** Η καταβύθιση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε, με αργή και υπό συνεχή ανάδευση, προσθήκη διαλύματος θειϊκού αμμωνίου στο πρωτεϊνικό διάλυμα ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pH 6,8. Ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος θειϊκού αμμωνίου για τη διαδικασία της καταβύθισης είναι ίσος με 0,837 επί του συνολικού όγκου του εκχυλίσματος Η ρύθμιση του pH του διαλύματος του θειϊκού αμμωνίου σε 6,8 έγινε με την προσθήκη μερικών σταγόνων πυκνής αμμωνίας (NH<sub>4</sub>OH) με τη χρήση πεχαμετρικού χαρτιού σε απαγωγό. Το μίγμα αφήνεται στον ψυκτικό θάλαμο για 16 ώρες. Ο μεγαλύτερος όγκος του εκχυλίσματος αποχύθηκε με τη χρήση αντλίας και συλλέχθηκε το ίζημα για φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 0-4 °C. 5.000 rpm επί 40 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος. Τέλος ακολούθησε διαπίδυση του διαλυτοποιημένου ενζύμου σε μεμβράνες διαπίδυσης οι οποίες εμβαπτίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001 M , pH 7.5 στους 4°C για μια νύχτα.

**Δ. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH:** Μετά το πέρας της διαπίδυσης έγινε συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος και πραγματοποιήθηκε διάγνωση με φυγοκέντρηση σε 34.540 rcf (ή 17.000 rpm για 10 λεπτά) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C με τη χρήση της μικρής κεφαλής. Έπειτα, συλλέχθηκε και ογκομετρήθηκε το υπερκείμενο υγρό (95 ml) και προστίθεται σε αυτό διάλυμα 2-μερκαπτο-αιθανόλης, 0,3 M, pH 7.0, όγκου ίσου με το 1/9 του πρωτεϊνικού διαλύματος (10,55 ml), διάλυμα EDTA 0,1 M , pH 7.0 όγκου ίσου με το 5/1000 του πρωτεϊνικού διαλύματος (527 μl) και διάλυμα Tris 2 M με σκοπό τη ρύθμιση του pH στο 8.8. Μετά από επώαση στους 37 °C επί 1 hr και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται CH<sub>3</sub>COOH 1 N για τη ρύθμιση του pH σε τιμή 7.0. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε σε 17000 rpm επί 15 min με τη χρήση της μικρής κεφαλής.

**Ε. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση της φωσφορυλάσης b:** Στο βήμα αυτό πραγματοποιήθηκαν μια κρυστάλλωση και δύο ανακρυστάλλώσεις του ενζύμου παρουσία AMP και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg. Επίσης πραγματοποιήθηκαν δύο ακόμα ανακρυστάλλώσεις χωρίς την παρουσία αυτών των δύο διαλυμάτων.

Κρυστάλλωση: Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετρείται (103,2 ml) και προστίθεται σε αυτό AMP 0.1 M και οξικό μαγνήσιο 1 M με pH 7.0 σύμφωνα με τους τύπους: **Όγκος AMP 0.1 M, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100** και **Όγκος (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg, pH 7.0 = πρωτεϊνικός όγκος X 1/100**. Και στις δύο περιπτώσεις ο όγκος που προστέθηκε ήταν 1,032 ml. Ακολούθως, το διάλυμα τοποθετείται σε μικρά tubes φυγοκέντρησης , ισοζυγίζεται, καλύπτεται με parafilm και αφήνεται στον πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για μία νύχτα για να κρυσταλλωθεί.

1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση: Οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 28710 rcf σε θερμοκρασία 0 – 4 °C επί 10 min με τη χρήση της μικρής κεφαλής. Το κρυσταλλικό ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 σε θερμοκρασία 30°C μέσα στο υδατόλουτρο. Έπειτα, επαναλαμβάνεται εκ νέου η διαδικασία της κρυστάλλωσης με τη διαφορά ότι το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα έχει όγκο 105 ml και ο όγκος AMP και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg που προστίθεται είναι 1050 μl. Έτσι λαμβάνει χώρα η 1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση. Μετά την προσθήκη, το διάλυμα παρέμεινε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο για 3-4 ώρες ώστε να πραγματοποιηθεί η κρυστάλλωση. Μετά το πέρας των 4 ωρών επαναλήφθηκε η διαδικασία της 1<sup>ης</sup> ανακρυστάλλωσης και το μίγμα αφέθηκε σε πάγο στον ψυκτικό θάλαμο όλη τη νύχτα. Έτσι έλαβε χώρα η 2<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση.

3<sup>η</sup> και 4<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση: Για να πραγματοποιηθεί η 3<sup>η</sup> και 4<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση επαναλήφθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε για την 1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση με τη διαφορά ότι στην 3<sup>η</sup> και 4<sup>η</sup> ανακρυστάλλωση δεν έγινε προσθήκη AMP και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg.

**ΣΤ. Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου:** Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης b μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση συλλέγονται και διαλυτοποιούνται. Η συγκέντρωση της φωσφορυλάσης b προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 280 nm (139mg/ml) και προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης οπότε η συγκέντρωση μειώθηκε κατά 50% (**69,5 mg/ml**). Τέλος, το ενζυμικό διάλυμα φυλάχθηκε στους -20 °C.

### **3.2.2 Παραγωγή και καθαρισμός της ανθρώπινης κολοβωμένης ηπατικής γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (hPhK-γ-trunc)**

Ο καθαρισμός της hPhK-γ-trunc πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε από μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας (Stravodimos G.A, *unpublished results*) και περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

#### **3.2.2.1 Παραγωγή της hPhK-γ-trunc**

##### **Βήμα 1<sup>ο</sup>: Κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου**

Το βελτιστοποιημένο γονίδιο της ανθρώπινης ηπατικής γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (hPhK-γ-trunc) κλωνοποιήθηκε στο φορέα έκφρασης pET-42a(+). Ο φορέας αυτός προσδίδει στην πρωτεΐνη μια επικράτεια γλουταθειόνης (GST) στο αμινοτελικό της άκρο, η οποία λειτουργεί ως ετικέτα συγγένειας κατά την απομόνωση της πρωτεΐνης.

##### **Βήμα 2<sup>ο</sup> : Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών**

Σε αυτό το βήμα, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* στελέχους BL21 Gold (DE3) με τη μέθοδο του θερμικού σοκ, προκειμένου το εξωγενές DNA να ενσωματωθεί στο βακτηριακό γονιδίωμα. Μέρος της υγρής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB Agar, στα οποία έχει προστεθεί το αντιβιοτικό καναμικίνη. Τα τρυβλία επωάζονται για 14-16 ώρες σε θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 37 °C. Από το τρυβλίο που επιστρώθηκε με κύτταρα και μετασχηματίστηκαν, έγινε επιλογή αποικιών και εμβολιασμός κάθε μοναδιαίας αποικίας σε υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth Handmade, όγκου 50 ml που περιέχει αντιβιοτικό καναμικίνη. Ακολούθησε επώαση των καλλιεργειών για 16 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανακίνηση 210 rpm.

##### **Βήμα 3<sup>ο</sup> : Ανακαλλιέργεια**

Στη συνέχεια μέρος της υγρής καλλιέργειας μεταφερθήκαν σε αποστειρωμένη φλάσκα με υγρό θρεπτικό μέσο LB-Broth Handmade, όγκου 1 L (σε αναλογία 1:100). Το θρεπτικό υλικό στο οποίο έγινε η ανακαλλιέργεια περιείχε τις ίδιες συγκεντρώσεις σε αντιβιοτικό. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) και παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά λαμβάνοντας 1mL καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να φτάσει να έχει OD<sub>600nm</sub> = 0,5-0,7 όπου και θεωρείται πως η καλλιέργεια θα βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Οι φλάσκες τοποθετούνται σε πάγο έως ότου η θερμοκρασία τους φτάσει περίπου τους 18°C.

##### **Βήμα 4<sup>ο</sup>: Επαγωγή υπερέκφρασης**

Ακολούθως, προστίθενται ο παράγοντας επαγωγής της υπερέκφρασης IPTG, σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM. Η υπερέκφραση έγινε σε ψυχόμενο ανακινούμενο επωαστήριο σε θερμοκρασία 18 °C, 210 rpm για 16 ώρες. Μετά το πέρας της υπερέκφρασης οι υγρές καλλιέργειες φυγοκεντρώνονται σε μεγάλα δοχεία φυγοκέντρησης (250 mL) σε 5000 rpm, για 30 min, σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και συλλέχθηκε το ίζημα.

### **Βήμα 5<sup>ο</sup>: Λύση των κυττάρων**

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε μετά την υπερέκφραση διαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, έπειτα τα διαλυτοποιημένα κύτταρα παραμένουν για 10 λεπτά σε πάγο παρουσία βενζονάσης στη συνέχεια το διάλυμα υποβλήθηκε σε μηχανική λύση με υπερήχους. Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 1,5 h, 4°C, 20.000 g. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης φιλτράρεται το υπερκείμενο από αποστειρωμένο φίλτρο Η απομόνωση της hIPhK-γ-trunc γίνεται σε 3 βήματα με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος ΆΚΤΑ-FPLC.

#### **3.2.2.1 Απομόνωση της hIPhK-γ-trunc**

A. Στήλη συγγένειας GST (Protino GST 4B, Macherey-Nagel): Το βήμα αυτό περιλαμβάνει εξισορρόπηση της στήλης με το επιθυμητό διαλυμα πρόσδεσης της στήλης, εισαγωγή του δείγματος στη στήλη υπό συνθήκες που ευνοούν τη σύνδεση της πρωτεΐνης-στόχου στη στήλη, πλύση της στήλης για την απομάκρυνση των μη προσδεμένων πρωτεϊνών και τέλος έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη με διάλυμα που περιέχει GSH. Έπειτα προστίθενται η πρωτεάση 3C σε αναλογία 1mg 3C ανά 20mg πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, το πρωτεϊνικό μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία 4°C, για 16 ώρες. Αφού γίνει τμήση της ετικέτας συγγένειας, παράγεται GST, GST-hIPhK-γ-trunc άτμητη, και hIPhK-γ-trunc τμημένη.

B. Στήλη συγγένειας HiTrap Blue sepharose HP (Cibacron Blue F3G-A, GE HeathCare). Το βήμα αυτό περιλαμβάνει τα στάδια που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο δηλαδή εξισορρόπηση και πλύση της στήλης με κατάλληλα διαλύματα. Ταυτόχρονα, πραγματοποιείται αραιώση του δείγματος ώστε η πρωτεΐνη να μπορέσει να προσδεθεί στη στήλη. Ακολουθεί έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη σε δύο βήματα που περιλαμβάνουν διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος. (1 M NaCl στην πρώτη περίπτωση και 2 M NaCl στη δεύτερη περίπτωση). Τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη συγκεντρώνονται και εφαρμόζονται σε στήλη βαρύτητας GST, όπως αναλύεται παρακάτω.

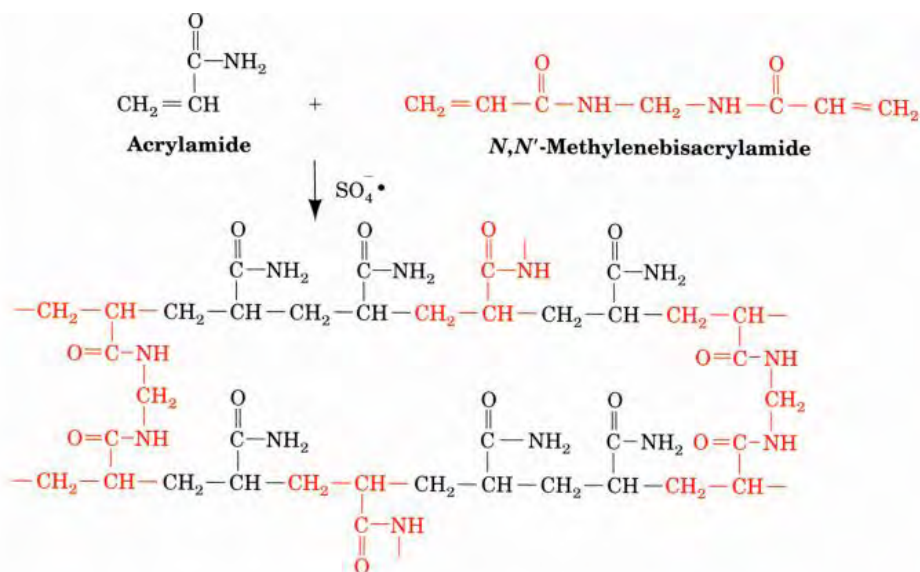
#### Γ: Στήλη συγγένειας GST βαρύτητας (Macherey-Nagel)

Το πρωτεϊνικό διάλυμα από το δεύτερο βήμα εφαρμόζεται σε στήλη βαρύτητας της οποίας το υλικό αποτελείται από σφαιρίδια που έχουν προσροφημένη. Η hIPhK-γ-trunc περιμένουμε να μην προσδεθεί στα σφαιρίδια και να απομακρυνθεί στο flow through, ενώ η πρωτεάση 3C, η οποία διαθέτει ετικέτα GST, θα πρέπει να συνδεθεί πάνω στη στήλη. Στη συνέχεια γίνεται πλύση της στήλης και έκλουση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών και ακολουθεί συμπύκνωση του κλάσματος που περιείχε την hIPhK-γ-trunc με φίλτρο και στη συμπυκνωμένη πρωτεΐνη προστίθενται ίσος όγκος γλυκερόλης (50 % τελική συγκέντρωση) και αποθήκευσή της στους -20 °C,

## **3.3 Αναλυτικές μέθοδοι**

### **3.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)**

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων καθ'όλη τη διαδικασία απομόνωσης και οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται, κυρίως, με βάση το μοριακό τους βάρος. Η ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) να αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο και το βασικότερο συστατικό της, είναι το πήκτωμα κατά μήκος του οποίου μετακινούνται οι πρωτεΐνες έπειτα από την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Για τη μέθοδο αυτή απαιτείται η παρασκευή μιας πηκτής πολυακρυλαμιδίου, η οποία αποτελείται από δύο φάσεις. Η φάση επιστοιβάσης (stacking) είναι το ανώτερο τμήμα της πηκτής και έχει συνήθως περιεκτικότητα 4- 4,5% w/v σε ακρυλαμίδη. Στη φάση αυτή οι πρωτεΐνες επιστοιβάζονται για να διαχωριστούν ακολούθως. Η κατώτερη φάση καλείται φάση διαχωρισμού (separating) και η περιεκτικότητά της σε ακρυλαμίδιο ποικίλει ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θα ηλεκτροφορηθούν. Για τον σχηματισμό του πηκτώματος, αναμιγνύονται το ακρυλαμίδιο με το Ν'-Ν' methylbisacrylamide (bis) και ξεκινούν να συν-πολυμερίζονται παρουσία ελευθέρων ριζών, όπως φαίνεται και στην εικόνα 15.



Εικόνα 15: Η αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου (Voet and Voet, 1995)

Κατά την παρασκευή της πηκτής προστίθενται και δύο επιταχυντές του πολυμερισμού, το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) που είναι ένα αντιδραστήριο σχηματισμού ελευθέρων ριζών και η N,N,N',N' τετραμέθυλ-αιθυλεν-διαμίνη (TEMED), που είναι ένα αντιδραστήριο καταλύτης. Τα συστατικά TEMED και υπερθειικό αμμώνιο προστίθενται τελευταία και ταυτόχρονα, αφού είναι αυτά που επάγουν τον πολυμερισμό.

Η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- I. Παρασκευή πηκτώματος διαχωρισμού 10 % w/v
- II. Παρασκευή πηκτώματος επιστοίβαξης
- III. Ηλεκτροφόρηση
- IV. Χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Η σύσταση για την παρασκευή των πηκτωμάτων φαίνεται στον πίνακα 1:

Συστατικά	Πηκτή διαχωρισμού 10% (15 ml)	Πηκτή επιστοίβαξης 5% (5 ml)
dH <sub>2</sub> O	5.9 ml	3.4 ml
30% Acrylamide mix	5 ml	0.83 ml
Tris 1.5 M, pH8.8	3.8 ml	-
Tris 1.0 M, pH 6.8	-	0.63 ml
SDS (10%)	0.15 ml	0.05 ml
APS 10%	0.15 ml	0.05 ml
TEMED	0.006 ml	0.005 ml

Πίνακας 1: Αναλογία των συστατικών για την παρασκευή των πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε συσκευή στην οποία εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα συγκεκριμένης τάσης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ( **running buffer**: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS). Το SDS είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας που καταργεί τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων φορτίζοντάς τες αρνητικά. Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες θα διαχωριστούν αποκλειστικά βάσει μεγέθους. Ακολούθως, στα δείγματα προστίθενται 5 μl loading buffer 4X (10 % glycerol, 1.25 % β-μερκαπτοαιθανόλη, 0.01 % bromophenol blue, 2 % SDS, 60 mM Tris) και τοποθετούνται στους 95 °C προκειμένου να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες που περιέχονται σε αυτά. Το SDS συμβάλει στις αποδιατακτικές συνθήκες, η γλυκερόλη προσθέτει βάρος στο δείγμα ώστε να τοποθετηθεί σωστά στη θέση του στην πηκτή και να μην



ξεφύγει, ο έγχρωμος δείκτης μας δείχνει την πρόοδο της ηλεκτροφόρησης, η β-μερκαπτοαιθανόλη είναι ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας που συμβάλει στο σπάσιμο των δισουλφιδικών δεσμών ενώ το Tris προσδίδει σταθερό pH. Τέλος, τα δείγματα φορτώνονται στα «πηγάδια», και σε ένα πηγάδι προστίθεται μάρτυρας μοριακών βαρών. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 130 Volt μέχρι οι πρωτεΐνες να περάσουν το stacking και να φθάσουν στο separating και στη συνέχεια η τάση ρυθμίζεται στα 180 Volt.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί χρώση των πηκτωμάτων σύμφωνα με την εξής διαδικασία: Το πήκτωμα, τοποθετείται σε διάλυμα οξικού οξέως μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 λεπτό. Στη συνέχεια αποχύνεται το διάλυμα οξικού οξέως και προστίθεται το διάλυμα χρώσης το οποίο περιείχε 0.1 % Coomassie Blue R250, 10 % οξικό οξύ και 50 % μεθανόλη. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3-4 φορές.

### 3.3.2 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford (*Bradford 1976*) είναι μία χρωματική μέθοδος ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών που βασίζεται στην αλλαγή χρώματος της χρωστικής brilliant blue G-250 από κόκκινο – καφέ σε μπλέ κατά τη σύνδεσή της σε πρωτεΐνες, υπό όξινες συνθήκες. Έτσι δημιουργείται ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής που απορροφά στα 595nm. Σε όλες τις περιπτώσεις, η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης. Η αρχή της μεθόδου έχει ως εξής: Η κόκκινη μορφή του αντιδραστηρίου Bradford δίνει τα ελεύθερα ηλεκτρόνια της στις ιονισμένες ομάδες της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να αλλάζει η δομή της πρωτεΐνης και να εκθέτει τις υδρόφοβες περιοχές.

Αυτές οι υδρόφοβες περιοχές φτιάχνουν δεσμούς van der Waals με τις μη πολικές περιοχές της χρωστικής σταθεροποιώντας τη μπλε μορφή της χρωστικής. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, παρασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα πρωτεΐνης BSA γνωστής συγκέντρωσης. 20 μl από το εκάστοτε δείγμα προστίθενται σε 780 μl απιονισμένο νερό και 200 μl αντιδραστηρίου Bradford ενώ ετοιμάστηκε και ένας τυφλός μάρτυρας για τον μηδενισμό του φωτομέτρου (800 μl H<sub>2</sub>O και 200 μl αντιδραστήριο Bradford). Έπειτα ακολουθεί ανάδευση των δειγμάτων και επώασή τους σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 10 min. Τέλος, έγινε φασματοφωτομέτρησή τους σε μήκος κύματος 595 nm και υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με βάση την πρότυπη καμπύλη.

### 3.3.3 Κινητική μελέτη hIPhKγ

#### 3.3.3.1 Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων- σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ) και μέγιστης ταχύτητας της αντίδρασης ( $V_{max}$ )

Η σταθερά Michaelis-Menten ( $K_M$ ) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης ( $V_{max}$ ). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ATP και GPb.

#### Προσδιορισμός της δραστηριότητας της hIPhKγ ως προς ATP

Πριν την εκτέλεση του βασικού πειράματος, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες κινητικές μελέτες προκειμένου να βρεθούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις ATP, PhK και GPb που θα χρησιμοποιηθούν. Πιο συγκεκριμένα, για να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση hIPhKγ, δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις: 10 ng/ml, 20 ng/ml και 40 ng/ml με το ATP να βρίσκεται σε κορεσμό (0.5 mM) και με συγκέντρωση GPb 3 mg/ml. Αυτή η συγκέντρωση GPb επιλέχθηκε έπειτα από ένα πείραμα στο οποίο ετοιμάστηκαν 6 τυφλοί μάρτυρες όπου αντί για hIPhKγ, προστίθεται ίσος όγκος buffer αραίωσης κινάσης σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις GPb: 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2

mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml και 5 mg/ml. Ακολούθως, βάσει των απορροφήσεων που προέκυψαν από τη φωτομέτρηση στα 850 nm, επιλέχθηκαν τα 3 mg/ml ως η καταλληλότερη συγκέντρωση. Επιπλέον, ελέγχθηκε ο καταλληλότερος όγκος αντίδρασης που μεταφέρεται σε 10 μl SDS προκειμένου να τερματιστεί η αντίδραση. Αρχικά, μεταφέρθηκαν 40 μl από την αντίδραση στο SDS και έπειτα 20 μl από την αντίδραση μαζί με 20 μl H<sub>2</sub>O σε 10 μl SDS. Τελικά εφαρμόστηκε η δεύτερη περίπτωση.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C και ο συνολικός της όγκος ήταν 100μl. Αρχικά, ετοιμάζονται τα υποστρώματα όγκου 80 μl που περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Hepes buffer), φωσφορυλάση του γλυκογόνου, και διάφορες συγκεντρώσεις ATP και τοποθετούνται για επώαση στους 30°C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 20μl h1PhKγ. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης (**πίνακας 2**)

Συστατικά	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Hepes buffer	4x	1x
rmGPb	69.5 mg/ml	3 mg/ml
ATP	0.1 M	0.05mM- 0.1mM- 0.15mM-0.3mM-0.5 mM
h1PhKγ	5.5 mg/ml	20 ng/ml

ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ

100 μl

**Πίνακας 2:** Αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης

Τα υποστρώματα ετοιμάζονται με τη μορφή mix συνολικού όγκου 600μl και αποτελείται από rmGPb, Hepes buffer και H<sub>2</sub>O μέχρι τον τελικό όγκο. Από αυτό το mix μοιράζουμε 70 μl στα υποστρώματα ενώ παράλληλα ετοιμάζονται και τυφλοί μάρτυρες για την μικρότερη και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ATP οι οποίοι αντί για κινάση περιέχουν buffer αραιώσης κινάσης. Έπειτα, από stock ATP 0.1 M πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις ώστε να προκύψουν οι ζητούμενες συγκεντρώσεις και από αυτές προστίθενται 10 μl στα υποστρώματα Αναλυτικότερα:

	0.05mM	0.1mM	0.15mM	0.3mM	0.5mM
ATP 1mM	5 μl	10 μl	-	-	-
ATP 5mM	-	-	3 μl	6 μl	10 μl
dH <sub>2</sub> O	5 μl	-	7 μl	4 μl	-

**Πίνακας 3:** Σύσταση για την παρασκευή διαφορετικών συγκεντρώσεων

Αφού επωαστούν τα υποστρώματα για 2 λεπτά, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 20 μl h1PhKγ και στους τυφλούς μάρτυρες προστίθεται buffer αραιώσης κινάσης η σύσταση του οποίου είναι: 50mM Tris pH 8.2, 50mM Hepes, 0,5mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 10mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg και 5mg/ml BSA.

Σε χρονικά διαστήματα 3min- 6min- 9min-12min, λαμβάνονται 20μl από την ενζυμική αντίδραση και αραιώνονται σε 980 μl ρυθμιστικού διαλύματος TEA buffer το οποίο περιέχει 100mM TEA/HCl pH 6.8, 1,5mM EDTA και 2mM DTT, στον πάγο προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση.

Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της δραστηριότητας της GPα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου προς απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης και γλυκογόνου με ένα λιγότερο κατάλοιπο γλυκόζης. Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης αντιδρούν με το γλυκογόνο και απελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi) τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν φασματοφωτομετρικά.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30ο C. Αρχικά ετοιμάζονται τα υποστρώματα της αντίδρασης που περιέχουν 100 μl GIP mix η σύσταση του οποίου είναι:

Συστατικά	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Caffeine	50 mM	1 mM
AMP	1 mM	20 μM
GIP	400 mM	20 mM
Glycogen	10 %	0.4 %

Πίνακας 4: Σύσταση του G1P mix.

Τα υποστρώματα τοποθετούνται για επώαση στους 30°C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 100 μl από την προηγούμενη αντίδραση στα υποστρώματα. Μετά από χρόνο αντίδρασης 12min λαμβάνονται 20μl από την αντίδραση και προστίθενται σε erpendorf που περιέχουν 10μl SDS 1% (απορρυπαντικό για τον τερματισμό της αντίδρασης) και 20μl H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί ισχυρή ανάμειξη με vortex.

Το επόμενο βήμα είναι ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων που απελευθερώθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο του **ασκορβικού-μολυβδενικού οξέος**. (Saheki et al, 1985). Γίνεται παρασκευή των διαλυμάτων: α) Μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου και 100 mM οξικού ψευδαργύρου. Το pH του μίγματος ρυθμίζεται στο 5.0 με πυκνό HCl και φυλάγεται σε αδιαφανές μπουκάλι και μακριά από ηλιακή ακτινοβολία σε θερμοκρασία δωματίου. β) Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με πυκνό NaOH και το διάλυμα φυλάγεται σε αδιαφανές μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου.

Πριν τη φωτομέτρηση, τα διαλύματα α και β αναμειγνύονται σε αναλογία 4:1 σε ένα αδιαφανές σκούρο δοχείο και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min ώστε να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση. Στη συνέχεια προστίθενται στα δείγματα και στα διαλύματα αναφοράς 700 μl από το διάλυμα φωτομέτρησης και γίνεται επώαση σε θερμοκρασία 30o C για άλλα 15 min σε υδατόλουτρο.

**Παρασκευή διαλυμάτων αναφοράς:** Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάστηκαν εις διπλούν και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος αυτών

- Διάλυμα H<sub>2</sub>O: 40 μl H<sub>2</sub>O και 10 μl SDS 1% w/v (χρησιμοποιείται για το μηδενισμό του φωτομέτρου)
- Διάλυμα φωσφορικών : 30 μl H<sub>2</sub>O, 10 μl SDS και 10 μl Pi 1 mM, pH=6,8

Ο ανόργανος φώσφορος που υπάρχει σχηματίζει σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου (Zn<sup>2+</sup>) το οποίο ανάγεται από το ασκορβικό οξύ και παράγεται ένα χρωμοφόρο που έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm.

### Προσδιορισμός της δραστηριότητας της h1PhKγ ως προς GPb

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C και ο συνολικός της όγκος ήταν 100μl. Αρχικά, ετοιμάζονται τα υποστρώματα όγκου 80 μl που περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Hepes buffer), ATP και διάφορες συγκεντρώσεις GPb και τοποθετούνται για επώαση στους 30°C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 20μl h1PhKγ. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης:

Συστατικά	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Hepes buffer	4x	1x
rmGPb	69.5 mg/ml	0.25 mg/ml- 0.5 mg/ml- 0.8 mg/ml- 1 mg/ml- 1.6 mg/ml 3 mg/ml
ATP	0.1 M	0.5 mM
h1PhKγ	5.5 mg/ml	20 ng/ml

ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ

100 μl

Πίνακας 5: Αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης.

Από το stock rmGPb 69.5 mg/ml, πραγματοποιείται μία ενδιάμεση αραιώση από την οποία θα προκύψουν οι ζητούμενες συγκεντρώσεις rmGPb. Έτσι λοιπόν, 90 μl από το stock αραιώνονται σε 45 μl ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 και 45 μl H<sub>2</sub>O οπότε η νέα συγκέντρωση της rmGPb είναι 34.8 mg/ml. Επιπλέον, από το stock ATP 0.1 M, πραγματοποιείται μία ενδιάμεση αραιώση 10 mM από την οποία θα προκύψει η τελική συγκέντρωση 0.5 mM που θα χρησιμοποιηθεί στο πείραμα.

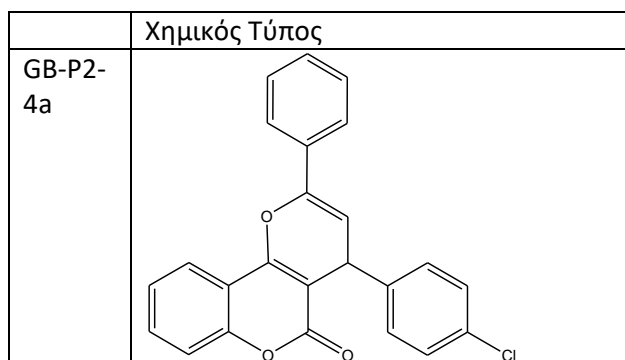
Τα υποστρώματα ετοιμάζονται με τη μορφή mix που αποτελείται από rmGPb, Hepes buffer, ATP και H<sub>2</sub>O μέχρι τον τελικό όγκο. Από αυτό το mix μοιράζουμε 80 μl στα υποστρώματα ενώ παράλληλα ετοιμάζονται και τυφλοί μάρτυρες για όλες τις συγκεντρώσεις rmGPb οι οποίοι αντί για κινάση περιέχουν buffer αραιώσης κινάσης. Αφού επωαστούν τα υποστρώματα για 2 λεπτά, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 20 μl h1PhKγ και στους τυφλούς μάρτυρες προστίθεται buffer αραιώσης κινάσης η σύσταση του οποίου είναι: 50mM Tris pH 8.2, 50mM Hepes, 0,5mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 10mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg και 5mg/ml BSA.

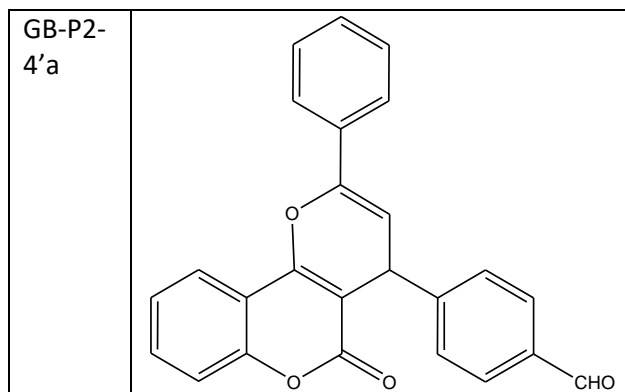
Σε χρονικά διαστήματα 3min- 6min- 9min-12min, λαμβάνονται 20μl από την ενζυμική αντίδραση και αραιώνονται σε 980 μl ρυθμιστικού διαλύματος TEA buffer το οποίο περιέχει 100mM TEA/HCl pH 6.8, 1,5mM EDTA και 2mM DTT, στον πάγο προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση. Έπειτα, η διαδικασία είναι ίδια με αυτή του προσδιορισμού των κινητικών παραμέτρων της h1PhKγ ως προς ATP. Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης που πραγματοποιείται στο υδατόλουτρο στους 30 °C, ετοιμάζονται τα υποστρώματα της που περιέχουν 100 μl GIP mix η σύσταση του οποίου φαίνεται στον πίνακα 4

Τα υποστρώματα τοποθετούνται για επώαση στους 30°C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 100 μl από την προηγούμενη αντίδραση στα υποστρώματα. Μετά από χρόνο αντίδρασης 12min λαμβάνονται 20μl από την αντίδραση και προστίθενται σε erpendorf που περιέχουν 10μl SDS 1% (απορρυπαντικό για τον τερματισμό της αντίδρασης) και 20μl H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί ισχυρή ανάμειξη με vortex. Ταυτόχρονα, γίνεται η προετοιμασία του διαλύματος φωτομέτρησης σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στη σελίδα 35 , και 700 μl από αυτό εισάγονται σε καθένα από τα δείγματα συμπεριλαμβανομένων και των διαλυμάτων αναφοράς νερού και φωσφορικών. Έπειτα από επώαση για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 850 nm.

### 3.3.3.2 Προσδιορισμός των IC<sub>50</sub> αναστολέων

Η σταθερά IC<sub>50</sub> ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50 % αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκαν οι ενώσεις με κωδική ονομασία **GB-P2-4a** και **GB-P2-4'a** σε συγκεντρώσεις 30 μM, 50 μM, 70 μM, 100 μM, 140 μM, 180 μM και 250 μM.





**Πίνακας 6:** Δομές των ενώσεων που εξετάστηκαν για την αξιολόγηση της ανασταλτικής τους δράσης έναντι της hIPhK-γ-trunc

Πριν την εκτέλεση του βασικού πειράματος, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες κινητικές μελέτες προκειμένου να βρεθούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις ATP, PhK και gmGPb που θα χρησιμοποιηθούν, καθώς και οι κατάλληλες συγκεντρώσεις αναστολέων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ένα κινητικό πείραμα με συνθήκες όμοιες με αυτές του προσδιορισμού των κινητικών παραμέτρων δηλαδή: ATP 0.5 mM, hIPhKγ 20 ng/ml και GPb 3 mg/ml. Η συγκέντρωση αναστολέα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 50 μM. Ωστόσο, οι συνθήκες αυτές δεν ήταν οι καταλληλότερες βάσει των απορροφήσεων που προέκυψαν από φωτομέτρηση στα 850 nm, οπότε οι νέες συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν: ATP 0.1 mM, hIPhKγ 10 ng/ml και gmGPb 1 mg/ml. Η συγκέντρωση αναστολέα που χρησιμοποιήθηκε παρέμεινε στα 50 μM. Σε κάθε σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 2 control, 2 τυφλοί μάρτυρες και 2 δείγματα για τον κάθε αναστολέα.

Οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις είναι : ATP 0.1mM, gmGPb 1 mg/ml, hIPhKγ 10 ng/ml. Ταυτόχρονα, προετοιμάζεται ένας τυφλός μάρτυρας για τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αναστολέα (250 μM) όπου αντί για hIPhKγ προστίθεται buffer αραίωσης κινάσης, ένας τυφλός μάρτυρας DMSO όπου αντί για αναστολέα προστίθεται DMSO 5% και αντί για hIPhKγ, buffer αραίωσης κινάσης και δύο control που περιέχουν DMSO 5% αντί για αναστολέα.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C και ο συνολικός της όγκος ήταν 100μl. Αρχικά, ετοιμάζονται τα υποστρώματα όγκου 80 μl που περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Hepes buffer), φωσφορυλάση του γλυκογόνου, ATP (σε μορφή mix 60 μl) και αναστολέα (20 μl) και τοποθετούνται για επώαση στους 30°C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 20μl\_hIPhKγ. Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται οι ποσότητες των υποστρωμάτων και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης.

	control	30 $\mu$ M	50 $\mu$ M	70 $\mu$ M	100 $\mu$ M	140 $\mu$ M	180 $\mu$ M	250 $\mu$ M	T <sub>250</sub>	T <sub>DMSO</sub>
Mix( ATP, rmGPb, Hepes buffer, H <sub>2</sub> O)	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l
αναστολέας	-	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	-
DMSO 5%	20 $\mu$ l	-	-	-	-	-	-	-	-	20 $\mu$ l
Τελικός όγκος υποστρωμάτων	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l	80 $\mu$ l

**Πίνακας 7:** Σύσταση υποστρωμάτων

Συστατικά	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Hepes buffer	4x	1x
rmGPb	69.5 mg/ml	1 mg/ml
ATP	0.1 M	0.1 mM
hIPhKy	3 mg/ml	10 ng/ml

ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ 100  $\mu$ l

**Πίνακας 8:** Αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις συστατικών της αντίδρασης.

Όσον αφορά τους αναστολείς, προετοιμάζουμε πυκνά stock συγκεντρώσεων:

- 3 mM, 5 mM, 7 mM, 9 mM, 15 mM για τον αναστολέα 4α, από τις οποίες γίνεται μία ενδιάμεση αραιώση τέτοια ώστε όταν λαμβάνονται 20  $\mu$ l από αυτή, οι τελικές συγκεντρώσεις του αναστολέα στην αντίδραση να είναι: 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 70  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 140  $\mu$ M, 180  $\mu$ M και 250  $\mu$ M.
- 3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 14 mM, 18 mM για τον αναστολέα 4'α, από τις οποίες γίνεται μία ενδιάμεση αραιώση τέτοια ώστε όταν λαμβάνονται 20  $\mu$ l από αυτή, οι τελικές συγκεντρώσεις του αναστολέα στην αντίδραση να είναι: 30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 70  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 140  $\mu$ M, 180  $\mu$ M και 250  $\mu$ M.

Σε χρονικά διαστήματα 3min- 6min- 9min-12min, λαμβάνονται 20 $\mu$ l από την ενζυμική αντίδραση και αραιώνονται σε 980  $\mu$ l ρυθμιστικού διαλύματος TEA buffer το οποίο περιέχει 100mM TEA/HCl pH 6.8, 1,5mM EDTA και 2mM DTT, στον πάγο προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση. Έπειτα, η διαδικασία είναι ίδια με αυτή του προσδιορισμού των κινητικών παραμέτρων της hIPhKy ως προς ATP και GPb. Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης που πραγματοποιείται στο υδατόλουτρο στους 30 °C, ετοιμάζονται τα υποστρώματα της που περιέχουν 100  $\mu$ l GIP mix η σύσταση του οποίου φαίνεται στον πίνακα 4.

Τα υποστρώματα τοποθετούνται για επώαση στους 30°C για 2 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 100  $\mu$ l από την προηγούμενη αντίδραση στα υποστρώματα. Μετά από χρόνο αντίδρασης 12min λαμβάνονται 20 $\mu$ l από την αντίδραση και προστίθενται σε erpendorf που περιέχουν 10 $\mu$ l SDS 1% (απορρυπαντικό για τον τερματισμό της αντίδρασης) και 20 $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί ισχυρή ανάμειξη με vortex. Ταυτόχρονα, γίνεται η προετοιμασία του διαλύματος φωτομέτρησης σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στη σελίδα 35, και 700  $\mu$ l από αυτό εισάγονται σε καθένα από τα δείγματα συμπεριλαμβανομένων και των διαλυμάτων αναφοράς νερού και φωσφορικών. Έπειτα από επώαση για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 850 nm.

### 3.3.3.3 Επεξεργασία των κινητικών δεδομένων με το πρόγραμμα GraFit (Leatherbarrow RJ, 1998)

Για τον υπολογισμό των ταχυτήτων χρησιμοποιείται η εξίσωση **linear fit**  $\rightarrow y = a + \beta x$  ενώ για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων χρησιμοποιείται η εξίσωση **enz\_ki** σύμφωνα με τον τύπο που πρότειναν οι Michaelis-Menten.

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς IC50, βάσει των ταχυτήτων της αντίδρασης παρουσία και απουσία αναστολέα υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{S \cdot a_{\text{control}} - S \cdot a_i}{S \cdot a_{\text{control}}} \times 100\%$$

Ακολούθως, η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα μετατρέπεται σε επί τις εκατό δραστηριότητα και τα δεδομένα εισάγονται στο πρόγραμμα GraFit για τον υπολογισμό της σταθεράς IC50.

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC50 θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC50 προκύπτει από το διάγραμμα %αναστολή=f([I]). Από την τιμή της IC50 προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής  $K_i$  που αποτελεί όπως και η  $K_m$  έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

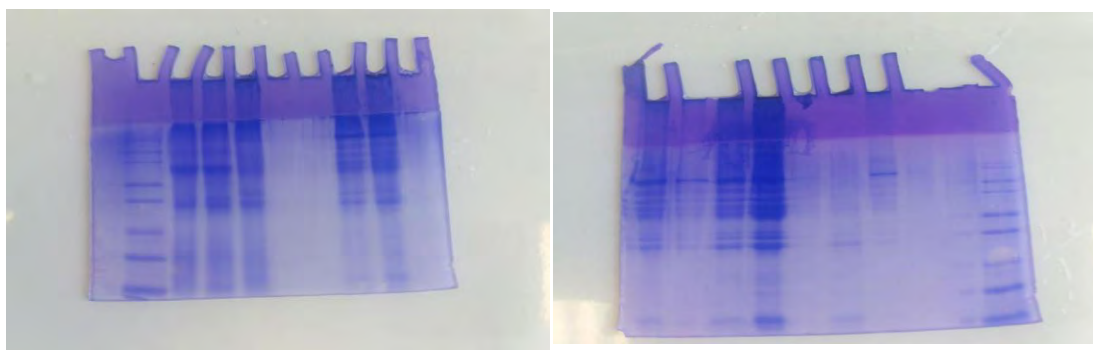
$$IC_{50} = \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

Όπου: [S] η συγκέντρωση του υποστρώματος ως προς το οποίο εξετάζεται η hIPhk-γ, δηλαδή η συγκέντρωση του ATP.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

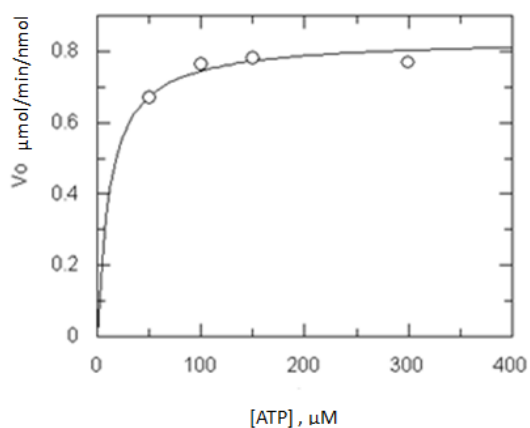
Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μύς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος.



**Εικόνα 16:** Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου, των δειγμάτων σε διάφορα στάδια της απομόνωσης της GPb. Αρχικά, εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή, εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά τη διήθηση με τον υαλοβάμβακα. Στη δεύτερη διαδρομή, εμφανίζεται το δείγμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην τρίτη διαδρομή, εμφανίζεται το δείγμα μετά τη διαπίδυση. Στην τέταρτη διαδρομή, εμφανίζεται το δείγμα μετά τη θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη διαδρομή, εμφανίζεται το δείγμα μετά την κρυστάλλωσις. Στην έκτη διαδρομή, εμφανίζεται το δείγμα μετά την 1<sup>η</sup> ανακρυστάλλωσις. Στην έβδομη διαδρομή, εμφανίζεται το δείγμα μετά τη 2<sup>η</sup> ανακρυστάλλωσις. Στην όγδοη διαδρομή, εμφανίζεται το δείγμα μετά την 3<sup>η</sup> ανακρυστάλλωσις. Στην ένατη διαδρομή, εμφανίζεται το δείγμα μετά την 4<sup>η</sup> ανακρυστάλλωσις. Τέλος, στη δέκατη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

### 4.2 Κινητική μελέτη της hIPhKγ

4.2.1 Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων- σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ) και μέγιστης ταχύτητας της αντίδρασης ( $V_{max}$ ) ως προς ATP.



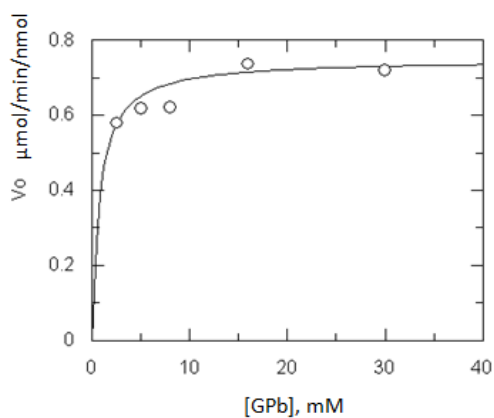
$$K_m = 12.1 \pm 2.3 \mu\text{M}$$

$$V_{max} = 0.8 \pm 0.02 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{nmol}$$

**Διάγραμμα 1:** Καμπύλη Michaelis-Menten ως προς ATP.



#### 4.2.2 Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων- σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ) και μέγιστης ταχύτητας της αντίδρασης ( $V_{max}$ ) ως προς GPb.



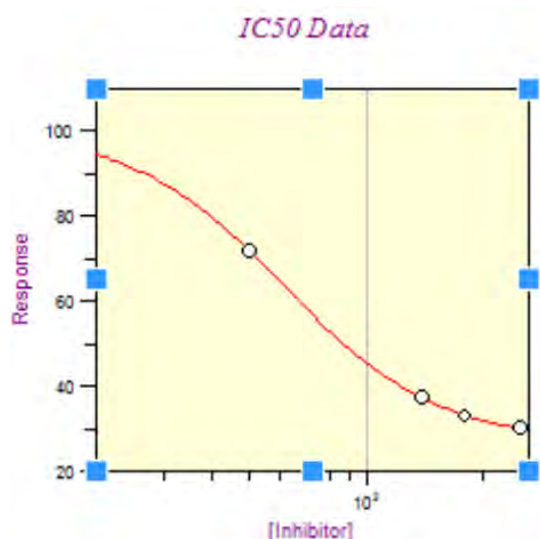
$K_m$	$0.84 \pm 0.02$ mM
$V_{max}$	$0.76 \pm 0.02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{nmol}$

**Διάγραμμα 2:** Καμπύλη Michaelis-Menten ως προς GPb.

#### 4.3 Κινητική μελέτη των αναστολέων

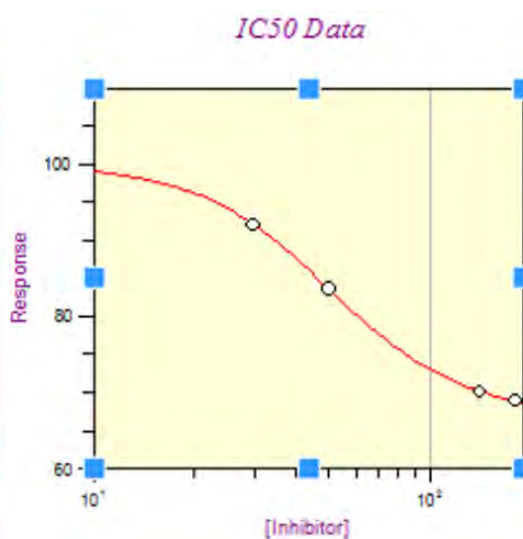
Για τον προσδιορισμό των  $IC_{50}$  των αναστολέων πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.3.2 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των αναστολέων. Η τιμή της  $IC_{50}$  που προέκυψε για τον αναστολέα **GB-P2-4a** είναι  $61.5 \pm 0.47$   $\mu\text{M}$  ενώ για τον αναστολέα **GB-P2-4'a** είναι  $50.5 \pm 0.35$   $\mu\text{M}$ . Οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν έπειτα από την επεξεργασία των κινητικών δεδομένων με το πρόγραμμα GraFit είναι οι εξής:

**Αναστολέας GB-P2-4a**



Parameter	Value	Std.Error
$IC_{50}$	61.5	0.47
Slope Factor	2.20	0.03

**Αναστολέας GB-P2-4'a**



Parameter	Value	Std.Error
$IC_{50}$	50.5	0.35
Slope Factor	2.17	0.03

#### 4.4 Συζήτηση

Συμπερασματικά, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας αξιολογήθηκε η αντι-υπεργλυκαιμική δράση των αναλόγων κουμαρίνης **GB-P2-4a** και **GB-P2-4'a** μέσω αναστολής της ανθρώπινης κολοβωμένης ηπατικής γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (h1PhK-γ-trunc). Πιο συγκεκριμένα, η ένωση GB-P2-4a έχει  $IC_{50}=61.5 \pm 0.47\mu M$  ενώ η ένωση GB-P2-4'a έχει  $IC_{50}= 50.5 \pm 0.35\mu M$ . Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι και οι δύο ενώσεις έχουν μέτρια ανασταλτική δράση σε σχέση με τα ανάλογα σταυροσπορίνης και ινδουβιδίνης που αναστέλλουν πολύ ισχυρά την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Το επόμενο βήμα είναι να πραγματοποιηθούν *in silico* μελέτες για να επιβεβαιωθεί ότι συνδέονται στο κέντρο πρόσδεσης του ATP καθώς και προσδιορισμός των σταθερών αναστολής ( $K_i$ ) των παραπάνω αναλόγων κουμαρίνης. Η παραπάνω μελέτη εντάσσεται στο πλαίσιο της γενικότερης έρευνας του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την εύρεση ενώσεων φυτικής προέλευσης οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα. Μακροπρόθεσμα, οι ενώσεις αυτές μπορούν να αποτελέσουν συστατικά διάφορων σκευασμάτων τα οποία μπορούν να καταναλωθούν από διαβητικούς προκειμένου να επιτευχθεί ένας αποτελεσματικότερος έλεγχος των επιπέδων γλυκόζης του αίματος.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων- Ενζυμική αναστολή

Τα ένζυμα είναι εξειδικευμένες πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την κατάλυση των βιολογικών αντιδράσεων. Η δράση των ενζύμων είναι απαραίτητη σχεδόν σε κάθε αντίδραση που πραγματοποιείται μέσα στο κύτταρο διότι σε διαφορετική περίπτωση, οι αντιδράσεις θα λάμβαναν χώρα κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας, pH και ιοντικού περιβάλλοντος. Περίπου το ένα τέταρτο των γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιούν ένζυμα, και το γεγονός αυτό υποδεικνύει την σπουδαιότητά τους στα βιολογικά συστήματα. Ο σημαντικότερος ρόλος που επιτελούν τα ένζυμα είναι η επιτάχυνση των αντιδράσεων κατά ένα εκατομμύριο ή περισσότερες φορές. Ένα ένζυμο καταλύει συνήθως μία μόνο χημική αντίδραση ή μία σειρά από πολύ συγγενικές αντιδράσεις. (Stryer et al., 2012)

Το 1913, οι Michaelis και Menten πρότειναν ένα μοντέλο που εξηγεί τα κινητικά χαρακτηριστικά:

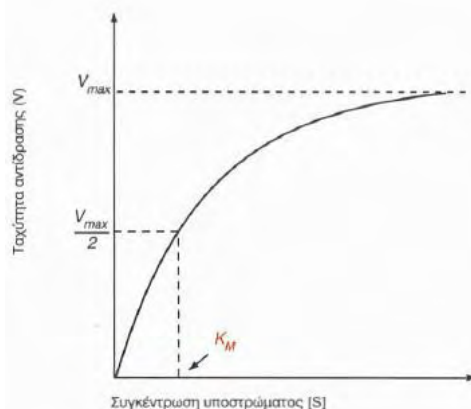


Έτσι ένα ένζυμο E όταν αντιδράσει με το υπόστρωμα S σχηματίζει ένα σύμπλοκο ES με μια κινητική σταθερά  $k_1$ . Το σύμπλοκο ES μπορεί είτε να διασπαστεί ξανά σε E και S με μια σταθερά  $k_{-1}$  είτε να σχηματίσει προϊόν P με μια σταθερά  $k_2$ . Οι Michaelis και Menten κατέληξαν στη μαθηματική σχέση:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Όπου  $V_0$ : η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης,  $V_{\max}$ : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης,  $[S]$ , η συγκέντρωση του υποστρώματος και  $K_M$  η σταθερά Michaelis Menten.

Η  $K_M$  αποτελεί τη σταθερά Michaelis Menten που ορίζεται ως  $K_m = k_{-1} + k_2 / k_1$  και αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η  $K_m$  έχει μονάδες συγκέντρωσης και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος. Η τιμή  $K_M$  για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα, καθώς επίσης και από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως π.χ. το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. Όταν  $[S] = K_M$ , τότε  $V_0 = V_{\max}/2$ . Έτσι η  $K_M$  είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της. (Stryer et al., 2012)

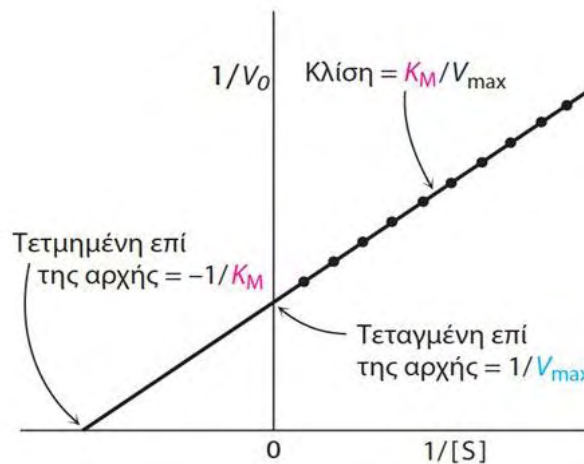


**Εικόνα 17** : Κινητική Michaelis-Menten. Η ταχύτητα ( $V_0$ ) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten (Stryer et al., 2012).

Αν η εξίσωση Michaelis-Menten γραφεί με τη μέθοδο του διπλού αντιστρόφου τότε προκύπτει:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

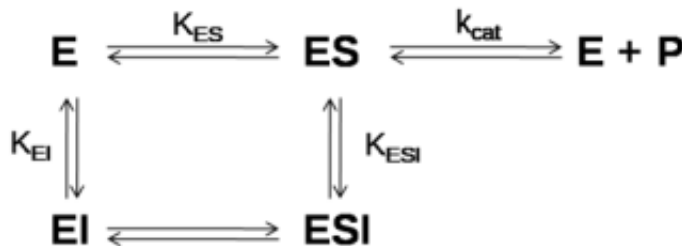
Η σταθερά Michaelis-Menten  $K_M$  προσδιορίζεται συνήθως με τη μέθοδο των Lineweaver και Burk. Η σχέση περιγράφει την ευθεία η οποία λαμβάνεται από τη γραφική παράσταση των Lineweaver-Burk, και η οποία προκύπτει εάν παραστήσουμε γραφικά τις τιμές  $1/V$  στον άξονα των τεταγμένων και  $1/[S]$  στον άξονα των τετμημένων. Η κλίση της ευθείας ισούται με  $K_M/V_{\max}$ . Το σημείο στο οποίο η ευθεία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων ισούται με  $1/V_{\max}$  και το σημείο στο οποίο τέμνει τον άξονα των τετμημένων ισούται με  $-1/K_M$ . (Stryer et al., 2012)



**Εικόνα 18:** Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου ή διάγραμμα Lineweaver-Burk. (Stryer et al., 2012).

### Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων

Η ενεργότητα ενός ενζύμου μπορεί να μειωθεί με τη δράση ορισμένων ουσιών που καλούνται **αναστολείς** και προσδέονται στο ελεύθερο ένζυμο ή το σύμπλοκο ES επηρεάζοντας την ταχύτητα της αντίδρασης. Η δράση ενός αναστολέα μπορεί να είναι είτε **αντιστρεπτή** είτε **μη αντιστρεπτή** ανάλογα με το αν ο αναστολέας αποσυνδέεται ή όχι από το ένζυμο.



**Εικόνα 19:** Γενικό διάγραμμα αναστολής ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων. Τα  $K_{ES}$ ,  $K_{EI}$ ,  $K_{ESI}$ , αποτελούν τις σταθερές διάστασης. Το  $ESI$  θεωρείται ότι είναι ανενεργό. (Price NC et al., 1999)

Οι κυριότεροι τύποι αναστολής διακρίνονται σε:

- Συναγωνιστική αναστολή
- Μη συναγωνιστική αναστολή
- Μικτή αναστολή
- Ανταγωνιστική αναστολή

Στη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας, επειδή μοιάζει με το υπόστρωμα, το συναγωνίζεται για την κατάληψη θέσεων του ενεργού κέντρου. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα σε ένα υπόστρωμα.

Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας προσδέεται σε περιοχή του ενζύμου διαφορετική από το ενεργό κέντρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να τροποποιείται η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου και να μην μπορεί να δεσμεύσει το υπόστρωμα αποτελεσματικά. Δεν είναι αναγκαίο ο μη-συναγωνιστικός αναστολέας να έχει παρόμοια δομή με αυτή του υποστρώματος.

Στη μικτή αναστολή, ο αναστολέας επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου.

Στην ασυναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας προσδέεται μόνο στο σύμπλοκο ενζύμου- υποστρώματος. (Stryer et al., 2012)

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- Adeva-Andany M. M., M. González-Lucán, C. Donapetry-García, C. Fernández-Fernández, E. Ameneiros-Rodríguez, (2016) Glycogen metabolism in humans, *BBA Clinical* 5 **85–100**.
- American Diabetes A. (2010) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* ;33 Suppl 1: **S62-9**
- Baker D.J, Greenhaff P.L, Timmons J.A (2006) Glycogen phosphorylase inhibition as a therapeutic target: a review of the recent patent literature 10.1517/13543776.16.4.459 Ashley Publications
- Bollen M, Keppens S, Stalmans W (1998) Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 336(Pt 1): **19–31**
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: **248-54**.
- Brushia Robert J. and Walsh Donal A., (1999) Phosphorylase Kinase: The complexity of its Regulation is Reflected in the Complexity of its Structure, *Frontiers in Bioscience* 4, d618-641
- Burger, P., Stein, E.A and Cox, J.A. (1983) Free energy coupling in the interactions between Ca<sup>2+</sup>, calmodulin, and phosphorylase kinase. *J. Biol. Chem.*, **258**, 14733 – 14739
- Camus S., *et al.*, (2012) “Identification of phosphorylase kinase as a novel therapeutic target through high-throughput screening for anti-angiogenesis compounds in zebrafish” *Oncogene* **31**, 4333–4342
- Carl Branden & John Tooze Εισαγωγή στη δομή των πρωτεϊνών ,*Δεύτερη Έκδοση* , *Garland Ακαδημαϊκές Εκδόσεις*
- Gibbons BJ, Roach PJ, Hurley TD (2002) Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *J.Mol.Biol* **319** (2) :463-77
- Graham TE, Yuan Z, Hill AK, Wilson RJ (2010) The regulation of muscle glycogen: the granule and its proteins. *Acta Physiol* **199**:489–98
- Guyton AC, Hall JE. (2013) Textbook of medical physiology. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders;
- Gomperts B, Kramer I, Tatham P., (2009) Signal Transduction, 2nd edition Elsevier

- Grand R, S. Shenolikar & P. Cohen (1981) The amino acid sequence of the delta subunit (calmodulin) of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* **113**, 359-367
- Gropper S.S et al., (2008) Διατροφή & Μεταβολισμός Μέρος 1<sup>ο</sup> , Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης.
- Hayes JM, Kantsadi AL, Leonidas DD. (2014) Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochemistry Reviews*; **13**:471-98
- Johnson L.N (2009) The regulation of protein phosphorylation, *Biochem. Soc. Trans* **37**, 627–64
- Kantsadi, A. L., Apostolou, A., Theofanous, S., Stravodimos, G. A., Kyriakis, E., Gorgogietas, V. A., Chatzileontiadou, D. S.M., Pegiou, K., Skamnaki, V. T., Stagos, D., Kouretas, D., Psarra, A.-M. G., Haroutounian, S. A., Leonidas, D. D.(2014) Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase, *Food and Chemical Toxicology* **67** 35–43
- Kantsung B.G (2009) Βασική και Κλινική Φαρμακολογία, Broken Hill Publishers
- Karlson P. et al., (2005) Βιοχημεία, 14<sup>η</sup> έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.
- Kilimann M, N. F. Zander, C. C. Kuhn, J. W. Crabb, H. E. Meyer & L. M. G. Heilmeyer, Jr. (1988) The alpha and beta subunits of phosphorylase kinase are homologous: cDNA cloning and primary structure of the beta subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 9381-9385
- Kyriakis E., Solovou T.G.A , Kun S , Czifrák K, Szjocs B, , Juhász L Bokor E., Stravodimos G.A Kantsadi A.L ,. Chatzileontiadou D.S.M Skamnaki V.T, Somsák L. Demetres D. Leonidas D.D (2018) “Probing the β-pocket of the active site of human liver glycogen phosphorylase with 3-(C-b-D-glucopyranosyl)-5-(4-substituted-phenyl)-1, 2, 4-triazole inhibitors. *Bioorganic Chemistry* **77** 485–493
- Kyriakis, E., Stravodimos, G. A., Kantsadi, A. L., Chatzileontiadou, D. S.M., Skamnaki, V. T., Leonidas, D. D(2015), Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b, *FEBS Letters*,
- Leatherbarrow RJ. GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines 1998
- Lowe E.D., Noble M.E.M., Skamnaki V.T., Oikonomakos N.G., Owen D.J. and Johnson L.N., (1997) The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition, *The EMBO Journal* **Vol.16**, pp.6646–6658
- Marshall William & Bangert K. Stephen (2011) Κλινική Χημεία Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης

- Moller, D. E. (2001). "New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome." *Nature* 414(6865): 821-827.
- Monod J. *et al.*, (1965) "On the nature of allosteric transitions: A plausible model", *Journal of Molecular Biology* Vol.12, 88-118
- Oikonomakos, N. G. and L. Somsak (2008). "Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design." *Current Opinion in Investigational Drugs* 9(4): 379-395.
- Pickett-Gies C & D. Walsh: (1986) Phosphorylase kinase. In: *The Enzymes*. Academic Press, NY
- Price NC, Stevens L. (1999) Fundamentals of enzymology : the cell and molecular biology of catalytic proteins. 3rd ed. Oxford ; New York: Oxford University Press
- Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS 9(2012). Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J*;441:763-87.
- Saheki, S., A. Takeda and T. Shimazu (1985). "Assay of inorganic phosphate in the mild of pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity." *Anal. Biochem.* 148: 277-281.
- Skamnaki, V. T., Kantsadi, A. L., Chatzileontiadou, D. S. M., Stravodimos, G., and Leonidas, D. D. (2013) Glycogen metabolism enzymes as molecular targets for drug development, In *Glycogen Structure, Functions in the body and role in disease* (Weiss, P. L., and Faulkner, B. D., Eds.), pp 109-135, Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Skamnaki, V. T., D. J. Owen, M. E. Noble, E. D. Lowe, G. Lowe, N. G. Oikonomakos and L. N. Johnson (1999). "Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies." *Biochemistry* 38(44): 14718-14730.
- Stryer L. *et al.*, (2012) Biochemistry, 5th Edition , Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Treadway JL, Mendys P, Hoover DJ. (2001) Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. *Expert Opin Investig Drugs* 10:439-54.
- Van Schaftingen Emile (1995) "Involvement of phosphorylase kinase inhibition in the effect of resorcinol and proglycosyn on glycogen metabolism in the liver. *Eur. J. Biochem.* 234, 301 -307
- Venien-Bryan Catherine, Jonic Slavica, Skamnaki Vasiliki, Brown Nick, Bischler Nicolas, Oikonomakos Nikos G., Boisset Nicolas, and Johnson Louise N., (2009), The Structure of Phosphorylase Kinase Holoenzyme at 9.9 Å Resolution and Location of the Catalytic Subunit and the Substrate Glycogen Phosphorylase, *Structure* 17, 117-127
- Voet and Voet, Biochemistry 2nd Edition. John Wiley and Sons, 1995



- Youngren JF. (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* **64**:873-91.
- Young FG (1957) Claude Bernard and the discovery of glycogen; a century of retrospect. *Br Med J* **1**:1431-7
- Zois C.E & Harris A.L (2016) Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *J Mol Med* **94**:137-154

