

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

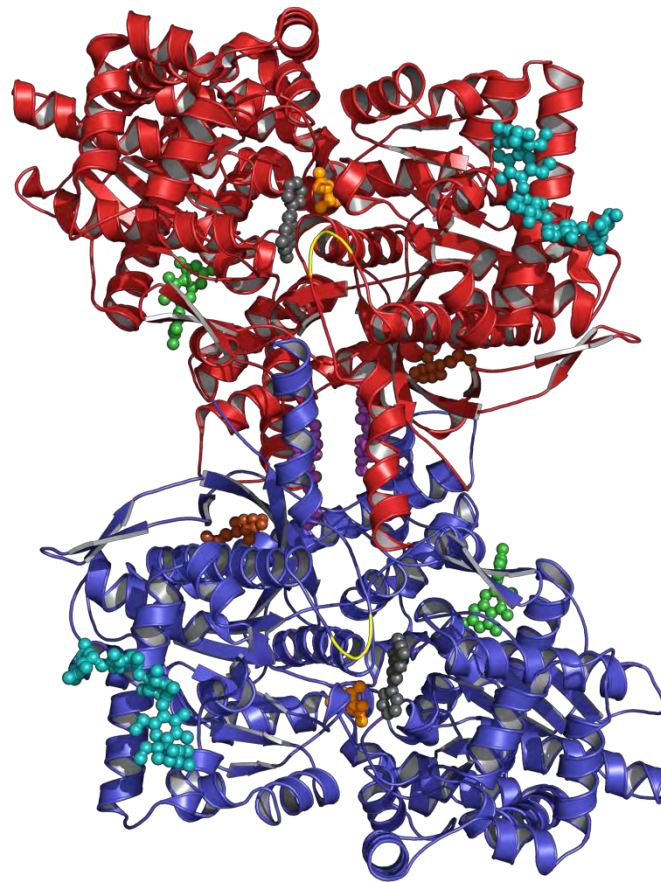
Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΜΥΪΚΗΣ  
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΚΟΝΙΚΛΟΥΣ

---

BIOCHEMICAL STUDIES ON INHIBITORS OF RABBIT  
MUSCLE GLYCOGEN PHOSPHORYLASE



Πατρασκάκη Μυρτώ  
Λάρισα 2016

Βιοχημικές μελέτες αναστολέων της μυϊκής  
φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κονίκλους

Biochemical studies on inhibitors of rabbit muscle  
glycogen phosphorylase

Τριμελής επιτροπή

- Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος (επιβλέπων)

Αναπληρωτής καθηγητής βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Σχολής Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

- Δρ. Ψαρρά Άννα – Μαρία

Επίκουρος καθηγήτρια βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Σχολής Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

- Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική

Λέκτορας βιοχημείας και μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Σχολής Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε την χρονική περίοδο Φεβρουάριος 2016- Μάιος 2016 στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Λεωνίδα για την όμορφη συνεργασία μας , καθώς και την εμπιστοσύνη και την βοήθεια που μου παρείχε καθ' ολη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Ευθύμιο Κυριάκη , τον Γιώργο Στραβοδήμο και την Χαρά Ψαχούλα για την αμέριστη καθημερινή βοήθειά τους κατά την διεξαγωγή όλων των πειραματικών διαδικασιών αλλά και για όλες τις γνώσεις που μου μετέδωσαν στο διάστημα που συνεργαζόμασταν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς έχουν δημιουργήσει το ιδανικό κλίμα εργασίας μέσα στο εργαστήριο.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	4
Abstract .....	5
1.Εισαγωγή.....	5
1.1Σακχαρώδης Διαβήτης .....	5
1.2 Ινσουλίνη.....	6
1.3 Γλυκαγόνη.....	7
2. Βασικές έννοιες .....	7
2.1 Γλυκόζη .....	7
2.2Γλυκογόνο.....	8
2.3 Σύντομη επισκόπηση του μεταβολισμού του γλυκογόνου .....	9
3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	10
3.1 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .....	11
3.2 Η φωσφορυλάση ρυθμίζεται από αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις και αντιστρεπτή φωσφορυλίωση.....	13
3.3 Ενζυμική αναστολή.....	16
3.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων .....	17
4.Πειραματικό μέρος.....	18
4.1Απομόνωση της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανασυνδυασμένα στελέχη <i>E.coli</i> .....	19
4.1.1 Εισαγωγή πλασμιδίου σε χημειο-δεκτικά κύτταρα- Καλλιέργεια βακτηρίων σε στερεό θρεπτικό μέσο .....	20
4.1.2 Εμβολιασμός- καλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό μέσο .....	20
4.1.3 Φυγοκέντρηση και λύση των κυττάρων.....	20
4.2.1 Απομόνωση και Καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία- έλεγχος της καθαρότητας με ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης.....	21
4.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης (SDS-PAGE).....	22
4.2.3 Πηκτή ακρυλαμίδου .....	23
4.2.4 Ποσοτικοποίηση πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford .....	23
4.2.5 Πειραματική Διαδικασία .....	24

4.3 Φωσφορυλίωση της rmGPb για την παραγωγή rmGPa .....	26
4.4 Κινητικές μελέτες έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου a.....	28
4.4.1 Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος.....	29
4.4.3 Πειραματική διαδικασία .....	30
4.4.4 Προσδιορισμός του φωσφόρου .....	31
4.4.5 Προσδιορισμός Km .....	32
4.4.6 Προσδιορισμός της σταθεράς $K_i$ των αναστολέων .....	33
5.Αποτελέσματα.....	34
5.1 Απομόνωση της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .....	34
5.2 Προσδιορισμός της σταθεράς $K_m$ .....	36
5.3 Προσδιορισμός των σταθερών $K_i$ .....	37
6. Συζήτηση αποτελεσμάτων .....	39
Βιβλιογραφία .....	43

## Περίληψη

Το ποσοστό των ατόμων που πάσχουν από Σακχαρώδη διαβήτη έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια και αναμένεται ακόμη μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού μέσα στην επόμενη δεκαετία. Με σκοπό την εύρεση αποτελεσματικότερων φαρμάκων έναντι της νόσου, η έρευνα επικεντρώνεται σε ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Απώτερος στόχος είναι η εύρεση ή ο σχεδιασμός ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για κάποιο κέντρο σύνδεσης των σχετιζόμενων με το μεταβολισμό ενζύμων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει αντι-υπεργλυκαιμικά φάρμακα. Η φωσφορυλίωση του γλυκογόνου (EC 2.4.1.1) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων αντι-υπεργλυκαιμικών φαρμάκων, μιας και καταλύει το πρώτο βήμα της αποικοδόμησης του γλυκογόνου με αποτέλεσμα να ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα .

Στο πλαίσιο της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, στην παρούσα διπλωματική εργασία απομονώθηκε η καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από βακτηριακά στελέχη *E.coli*, BL 21 Gold ώστε να χρησιμοποιηθεί για την φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (GPb), η οποία είχε απομονωθεί από σκελετικούς μύες κουνελιών. Στη συνέχεια με κινητικές μελέτες

εξετάστηκε η επίδραση τριών ενώσεων, αναλόγων γλυκόζης, στη δραστηριότητα της rmGPa.

## Abstract

The percentage of people suffering from diabetes has increased in recent years and the rate is expected to rise even higher within the next decade. In order to find more effective drugs against the disease , research is focused in enzymes and receptors involved in the regulation of glucose levels in blood. The ultimate goal is the identification or the design of compounds which exhibit high affinity for enzymes associated with metabolism , and may be used as potential anti-hyperglycemic drugs. The glycogen phosphorylase consists one of the most important molecular targets for the design of new anti –hyperglycemic drugs, as it catalyses the first step of glycogen degradation and thereby regulates glucose levels in blood.

Within the general research conducted in the laboratory , in the present diplomatic assay the catalytic subunit of glycogen phosphorylase’s kinase was isolated from bacterial strains of E.coli BL 21 Gold , to be used for the phosphorylation of glycogen phosphorylase b , which had been isolated from rabbit skeletal muscle. Subsequently with kinetic studies, was examined the effect of three compounds in the activity of glycogen phosphorylase

## 1.Εισαγωγή

### 1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο Σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια μεταβολική νόσος που χαρακτηρίζεται από την προδιάθεση για σημαντική αύξηση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα και από την διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης. Ο διαβήτης δεν είναι μια μεμονωμένη διαταραχή αλλά ένα σύνολο διαταραχών που όλες έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Υπάρχουν 2 κύριοι τύποι διαβήτη που ευθύνονται για το 95% του συνόλου των περιπτώσεων της νόσου.

Ο Σακχαρώδης διαβήτης Τύπου 1 (ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης) : Χαρακτηρίζεται από μερική ή ολική ανεπάρκεια ινσουλίνης , οφειλόμενη σε αυτοάνοση μόνιμη καταστροφή των β-κυττάρων των παγκρεατικών νησίδων του Langerhans που είναι υπεύθυνα για την έκκριση της ινσουλίνης. Ο διαβήτης τύπου 1 εμφανίζεται συνήθως απότομα και οδηγεί συχνά στην ανάπτυξη κέτωσης και

διαβητικής κετοξέωσης εάν το έλλειμμα ινσουλίνης δεν καλυφθεί. Οι ασθενείς είναι απόλυτα εξαρτημένοι από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης προκειμένου τα επίπεδα σακχάρου του αίματος να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα.

*Ο Σακχαρώδης διαβήτης Τύπου 2 (μη ινσουλινοεξαρτώμενος):* Αντιπροσωπεύει περίπου το 85% του διαβητικού πληθυσμού και χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης και ελαττωμένης ευαισθησίας των κυττάρων στη δράση της (φαινόμενο ανοχής στην ινσουλίνη). Στα πρώτα στάδια της νόσου, η ελαττωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη είναι η κύρια διαταραχή, ενώ τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα είναι αυξημένα. Ο διαβήτης τύπου 2 είναι η συχνότερη αιτία διαβήτη στους ενήλικους. Σπουδαίος προδιαθεσικός παράγοντας για την ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2 είναι η παχυσαρκία. Η παχυσαρκία προδιαθέτει στην ανάπτυξη ανοχής στην ινσουλίνη, πιθανόν λόγω της παραγωγής από το λιπώδη ιστό ουσιών που ελαττώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Άλλοι προδιαθεσικοί παράγοντες είναι η ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό. (Kurukulasuriyaetal, 2003)

Παγκοσμίως, υπολογίστηκε ότι μέχρι και το 2014, 422 εκατομμύρια ενήλικες ζούσαν με διαβήτη σε σύγκριση με 108 εκατομμύρια ενήλικες το 1980. Η παγκόσμια επικράτηση του σακχαρώδη διαβήτη έχει σχεδόν διπλασιαστεί από το 1980, καθώς αυξήθηκε από 4,7% σε 8,5% στον ενήλικο πληθυσμό. Η εξέλιξη αυτή αντανάκλα την αύξηση των σχετιζόμενων παραγόντων κινδύνου, όπως το υπερβολικό βάρος ή η παχυσαρκία. Κατά την τελευταία δεκαετία, ο επιπολασμός του διαβήτη έχει αυξηθεί ταχύτερα σε χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος χώρες από ό, τι σε χώρες υψηλού εισοδήματος. Για το 2030 εκτιμάται ότι 552 εκατομμύρια άνθρωποι θα πάσχουν από διαβήτη σύμφωνα με πληροφορίες της Διεθνούς Ομοσπονδίας για το Διαβήτη. (Global report o ndiabetes-World Health Organization 2016). Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν την επιτακτική ανάγκη έρευνας αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων για τη θεραπεία του διαβήτη ή έστω για τον καλύτερο έλεγχο της εξέλιξης της νόσου.

## 1.2 Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι κύριος ρυθμιστής της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα και δρα σε συνεργασία με την γλυκαγόνη, η οποία έχει αντίθετη δράση, για τη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης. Κατά τη διάρκεια νηστείας, τα επίπεδα της ινσουλίνης είναι χαμηλά και η συγκέντρωση γλυκόζης του αίματος διατηρείται σε σταθερά επίπεδα από τα αποθέματα γλυκόζης του ήπατος. Μετά την κατανάλωση γεύματος (που περιέχει και υδατάνθρακες) τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα αυξάνονται και επάγουν την απελευθέρωση ινσουλίνης από τα β παγκρεατικά κύτταρα. (Kurukulasuriya et al, 2003) Αναλόγως της θέσης δράσης της, η ινσουλίνη εκτελεί και διαφορετικές διαδικασίες:

- Στους σκελετικούς ιστούς: Αυξάνει τη μεταφορά της γλυκόζης, αυξάνει την πρόσληψη της γλυκόζης και ενεργοποιεί την σύνθεση του γλυκογόνου
- Στο ήπαρ: Επάγει την σύνθεση του γλυκογόνου και της *de novo* λιπογένεσης καθώς αναστέλλει την γλυκονεογένεση
- Στο λιπώδη ιστό: Καταστέλλει την λιπόλυση και προωθεί την λιπογένεση, οδηγώντας σε καθαρή συσσώρευση λίπους

Η ινσουλίνη προκειμένου να επιφέρει το βιολογικό της αποτέλεσμα πρέπει να δράσει μέσω του διαμεμβρανικού της υποδοχέα ο οποίος είναι ένας υποδοχέας κινάσης τυροσίνης. Ο προσδέτης συνδέεται στον υποδοχέα της ινσουλίνης ενεργοποιώντας τη δραστηριότητα της ενδογενούς κινάσης τυροσίνης, και στη συνέχεια ενεργοποιείται ένας καταρράκτης φωσφορυλιώσεων που οδηγεί σε διαφορετικές βιολογικές αποκρίσεις (Chiu S-L., 2010).

### 1.3 Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη είναι μια κύρια (αντί)-ρυθμιστική πολυπεπτιδική ορμόνη η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα α του παγκρέατος όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλή. Η γλυκαγόνη είναι υπεύθυνη για τη διέγερση της παραγωγής της γλυκόζης από το ήπαρ και προκαλεί αναστολή του μεταβολισμού της γλυκόζης προωθώντας την σύνθεση του γλυκογόνου. Η δράση της στοχεύει κυρίως το ήπαρ. Η γλυκαγόνη προσδένεται στον υποδοχέα της στην κυτταρική μεμβράνη των ηπατικών κυττάρων και ενεργοποιεί μια σειρά ενδοκυτταρικών διαδικασιών που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (μέσω φωσφορυλίωσης από την PKA) η οποία με τη σειρά φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου ώστε να ξεκινήσει η αποικοδόμηση του (Berg , Tymoczko , Stryer – *Biochemistry 5<sup>th</sup> edition*).

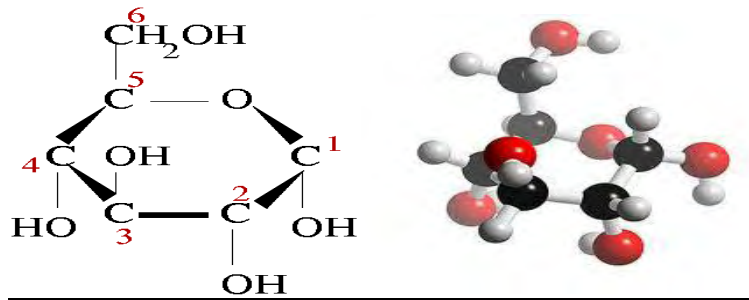
## 2. Βασικές έννοιες

### 2.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη (Εικόνα 1) είναι ένας μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα τα οποία συνδέονται με δώδεκα άτομα υδρογόνου και έξι άτομα οξυγόνου. Ο γενικός τύπος της γλυκόζης είναι C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>. Η γλυκόζη παράγεται σύμφωνα με τον κύκλο του Κάλβιν κατά τη φωτοσύνθεση και αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τα κύτταρα τόσο των φυτών όσο και των ζώων. Υπάρχει ως φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ παράγεται και στον ίδιο τον οργανισμό από καταβολικές διαδικασίες πιο περίπλοκων υδατανθράκων Αποτελεί τον σημαντικότερο υδατάνθρακα στη βιολογία, αφού τα κύτταρα την χρησιμοποιούν ως την πρωταρχική πηγή ενέργειας. Η γλυκόζη είναι ένα από τα



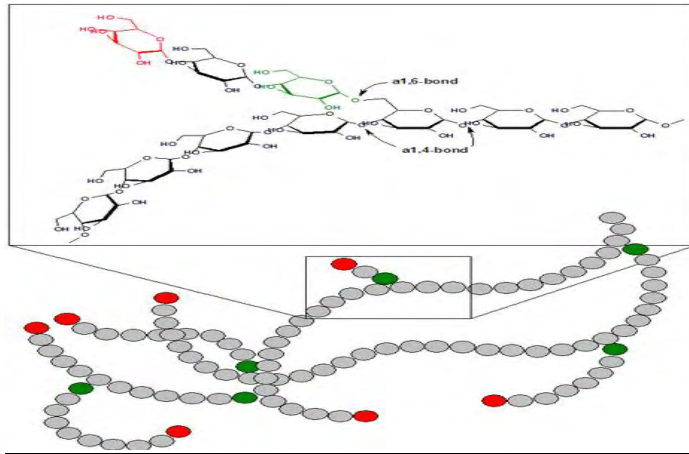
κύρια προϊόντα της φωτοσύνθεσης και χρησιμοποιείται ως καύσιμο για την κυτταρική αναπνοή. Στα θηλαστικά η γλυκόζη είναι το μοναδικό καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος κάτω από συνθήκες επάρκειας τροφής, και το μοναδικό καύσιμο που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε οποιαδήποτε περίπτωση.



Εικόνα 1 Δομή γλυκόζης σε απλή και τρισδιάστατη μορφή

## 2.2 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο (Εικόνα 2) είναι μια άμεσα κινητοποιημένη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει γλυκόζη όταν απαιτείται ενέργεια. Τα περισσότερα κατάλοιπα γλυκόζης στο γλυκογόνο συνδέονται μεταξύ τους με  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις που απαντώνται σε περίπου κάθε δέκατο κατάλοιπό σχηματίζονται από  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η δομή του γλυκογόνου είναι κατάλληλη να αποθηκεύει μεγάλα ποσά γλυκόζης, τα οποία μπορούν να γίνουν άμεσα διαθέσιμα. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση της γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς το γλυκογόνο ρυθμίζει την διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Ο ρόλος αυτός του γλυκογόνου είναι ιδιαίτερα σημαντικός, διότι η γλυκόζη είναι ουσιαστικά το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιείται από τον εγκέφαλο, επιπλέον η γλυκόζη όπως προαναφέρθηκε, κινητοποιείται άμεσα από το γλυκογόνο και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα.



Εικόνα 1: Δομή Γλυκογόνου

Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου στα θηλαστικά είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ σε σχέση με τους μύς, αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύς συνολικά, λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους. Στο ήπαρ, η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως συνόλου. Αντίθετα στους μύς οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών μονό. (Berg, Tymoczko, Stryer – Biochemistry 5<sup>th</sup> edition. Κεφαλαίο 21).

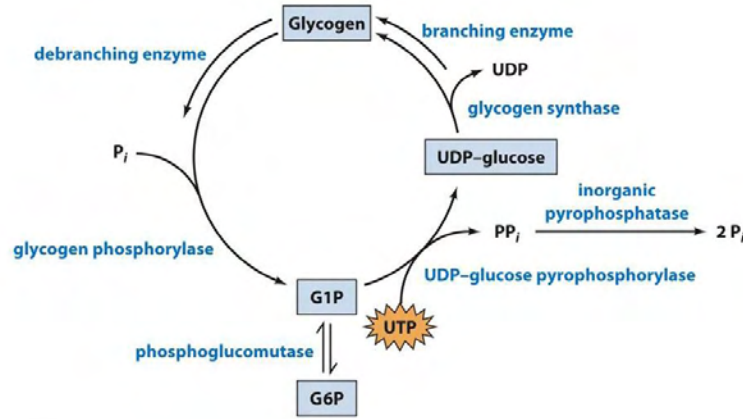
### 2.3 Σύντομη επισκόπηση του μεταβολισμού του γλυκογόνου

Η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι σχετικά απλές βιοχημικές διεργασίες. Η σύνθεση του γλυκογόνου, απαιτεί μια ενεργοποιημένη μορφή γλυκόζης, την ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη), η οποία παράγεται από την αντίδραση της UTP και της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η UDP-γλυκόζη προστίθεται στο μη αναγωγικό άκρο των μορίων γλυκογόνου, σε μια αντίδραση που καταλύεται από την συνθάση του γλυκογόνου. (Εικόνα 3)

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου συνίσταται σε τρία βήματα: 1) την απελευθέρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο, 2) την ανακατασκευή του υποστρώματος γλυκογόνου για νέα αποικοδόμηση και 3) τη μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό.

Η ρύθμιση των διαδικασιών αυτών είναι αρκετά πολύπλοκη. Διάφορα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στον μεταβολισμό του γλυκογόνου υπόκεινται σε αλλοστερική ρύθμιση από μεταβολίτες που σηματοδοτούν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Επιπλέον ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται και από ορμονικά διεγερόμενους καταρράκτες. Οι αλλοστερικές αποκρίσεις επιτρέπουν

την ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας, ώστε να ικανοποιούνται οι ανάγκες του κυττάρου στο οποίο τα ένζυμα αυτά εκφράζονται, ενώ η ορμονική ρύθμιση επιτρέπει στον μεταβολισμό του γλυκογόνου να προσαρμόζεται στις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού (L.Stryeretal. – Biochemistry 5<sup>th</sup> edition. Κεφαλαίο21).



Εικόνα 3 Σύνοψη της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου

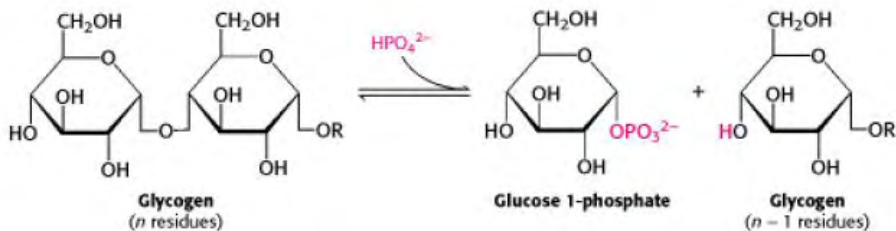
### 3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP, EC 2.4.1.1) αποτελεί το καθοριστικό ένζυμο του καταβολισμού του γλυκογόνου καθώς καταλύει την φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διασπά το γλυκογόνο με την προσθήκη ορθοφωσφορικού προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης (Εικόνα 4)



(n κατάλοιπα)

(n-1 κατάλοιπα)

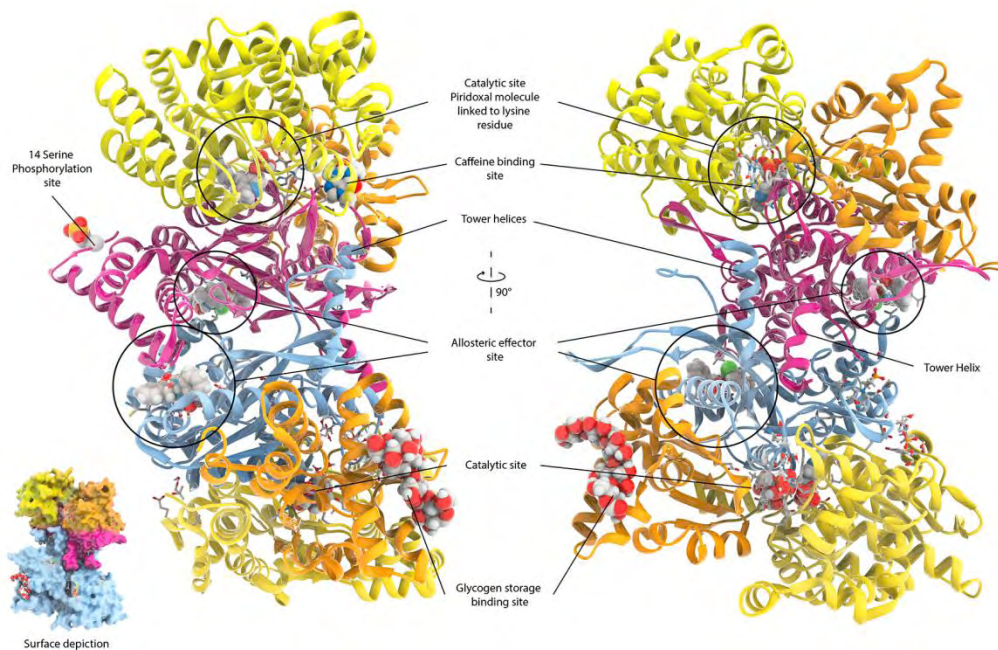


Εικόνα 2: Αντίδραση φωσφορύλωσης (Stryer, Biochemistry 5th edition)

Η φωσφορυλάση καταλύει την διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του C-1 του τελικού καταλοίπου και του C-4 του γειτονικού καταλοίπου διασπάται από το ορθοφωσφορικό. Η αντίδραση που κατάλύεται από την φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6,8 ο λόγος ισορροπίας  $\frac{[P_i]}{[1-φωσφορική\ γλυκοζη]}$  ισούται με 3,6.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου: 1) η φωσφορυλάση του εγκεφάλου 2) η φωσφορυλάση του ήπατος και 3) η φωσφορυλάση των μυών. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών παρέχει ενέργεια στους μύες, ενώ η αντίστοιχη του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακούς σκοπούς των ίδιων των ιστών. Αντίθετα η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης.

### 3.1 Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου



**Εικόνα 3:** Η Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (3dciencia ,visual life sciences, wordpress.com)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα διμερές που αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες μοριακού βάρους 97 kDa. Η δομή της κάθε υπομονάδας του ενζύμου είναι χαρακτηριστική της α/β τάξης των πρωτεϊνών

(δηλαδή των πρωτεϊνών των οποίων η δευτεροταγής δομή αποτελείται από α-έλικες και β-πτυχωτά φύλλα) , κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε δύο περιοχές : 1) μια αμινοτελική περιοχή που αποτελείται από τα κατάλοιπα 1-484 και περιέχει μια θέση πρόσδεσης γλυκογόνου και 2) μια καρβοξυτελική περιοχή αποτελούμενη από τα κατάλοιπα 485-842.Οι δύο υπομονάδες του λειτουργικού διμερούς συνδέονται μεταξύ τους σε δύο θέσεις που βρίσκονται στις αντίθετες πλευρές του ενζύμου.Η μια επαφή σχηματίζεται από την σύνδεση μιας περιοχής που ονομάζεται επικάλυμμα (cap) (κατάλοιπα 35-46 , αποτελείται από μια θηλιά που ενώνει τις έλικες α1 και α2 μεταξύ τους) της μιας υπομονάδας με την αλυσίδα B7 (κατάλοιπα 191-193) και την έλικα α2 (κατάλοιπα 47-78) της άλλης υπομονάδας. Σε αυτή τη θέση διεπαφής βρίσκεται το κέντρο σύνδεσης των αλλοστερικών τελεστών , καθώς και η θέση αναγνώρισης για τη φωσφορυλιωμένη σερίνη. Η άλλη επαφή μεταξύ των δύο υπομονάδων σχηματίζεται από την επαφή μιας περιοχής που ονομάζεται πύργος (tower) και σχηματίζεται από την σύνδεση αντιπαράλληλων ελίκων (κατάλοιπα 262-276) που ενώνουν την υπομονάδα με το καταλυτικό κέντρο. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται σε μία εσωτερική σχισμή που απέχει 15 Å από την επιφάνεια του μορίου και που δημιουργείται μεταξύ της αμινο-τελικής και της καρβοξυτελικής περιοχής και είναι κοντά στον συμπαράγοντα PLP του ενζύμου (*D. Barford et al 1990*)

Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και είναι απαραίτητος συμπαράγοντας για την δραστηριότητα του ενζύμου. Η αλδεϋδική ομάδα της PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης 680 (Lys680) του ενζύμου. Η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μια θέση μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό ιόν λειτουργώντας ως δότης πρωτονίων και στη συνέχεια ως δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό ιόν δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο που είναι συνδεδεμένο στον C-4 της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ιόν προς σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης , με την επακόλουθη επιστροφή ενός ατόμου υδρογόνου στην PLP. Ο κύριος ρόλος του συνενζύμου της PLP είναι να διευκολύνει την φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου, έναντι της υδρολυτικής διάσπασης (*L.Stryer et al. – Biochemistry 5th edition. Κεφαλαίο 21*).

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα μόριο "μετατροπέας" το οποίο δέχεται θετικά σήματα (νευρική ή ορμονική διέγερση, G-1-P , AMP, Pi , γλυκογόνο) αλλά και αρνητικά σήματα (σήματα επαγόμενα από

την ινσουλίνη, γλυκόζη, ATP, καφεΐνη και κάποιους αδιευκρίνιστους προς το παρόν προσδέτες) και ανταποκρίνεται σε αυτά είτε αποικοδομώντας το γλυκογόνο για να παρέχει καύσιμα στον οργανισμό, είτε σταματώντας την αποικοδόμηση με σκοπό να επιτρέψει την κυτταρική αποθήκευση της γλυκόζης υπό μορφή γλυκογόνου για μεταγενέστερη χρήση. (Fletcherick and Sprang 1982).

Συνοπτικά οι ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι οι εξής:

- 1) Η θέση αναγνώρισης για την φωσφορυλιωμένη σερίνη 14 (Ser14-phosphate),
- 2) Το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης (όπου προσδέεται η AMP και ο αναστολέας 6-φωσφορική γλυκόζη)
- 3) Το καταλυτικό κέντρο όπου προσδέεται η γλυκόζη και η 1-φωσφορική γλυκόζη,
- 4) Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου
- 5) Το κέντρο αναστολής όπου προσδέεται η καφεΐνη και σχετικές ενώσεις.
- 6) Το κέντρο πρόσδεσης της κερσεΐνης
- 7) Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο απέχει 35 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 45 Å από τη θέση αναγνώρισης της φωσφορυλιωμένης σερίνης και 15 Å από το κέντρο αναστολής. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσεΐνης βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Η θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου απέχει 30 Å από το καταλυτικό κέντρο αλλά επικοινωνεί με αυτό μέσω μίας στενής σχισμής ικανής να χωρέσει 4-5 μονάδες γλυκόζης. Με αυτό τον τρόπο το ένζυμο φωσφορολύει πολλά κατάλοιπα χωρίς να απαιτείται σύνδεση και αποσύνδεση μετά από κάθε κύκλο. (Fletcherick et al. 1976, Leonidas et al 2014)

### 3.2 Η φωσφορυλάση ρυθμίζεται από αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις και αντιστρεπτή φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτέλεσε ένα από τα πρώτα παραδείγματα ενζύμου του οποίου η ρύθμιση εξαρτάται από έναν προσδέτη που δεν αποτελεί υπόστρωμα (AMP) (Helmreich and Cori 1964). Στην κλασική τους μελέτη "defining the fundamental concepts of allostery" οι Jacob, Monod και Changeux, ερμήνευσαν αυτό το φαινόμενο ως μια εναρμονισμένη μετάβαση μεταξύ αλληλομετατροπόμενων μορφών. Η δραστηριότητα του ενζύμου ρυθμίζεται από την αλληλομετατροπή του σε δύο εναλλακτικές μορφές, η οποία εξαρτάται από αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις και αντιστρεπτή φωσφορυλίωση (D. Barford et al).

Από την φύση τους τα αλλοστερικά φαινόμενα δεν θα πρέπει να ερμηνεύονται με τους όρους των κλασικών θεωριών για την ενζυμική δράση. Οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται κατά τον αλλοστερισμό, μεσολαβούνται από μια μοριακή μετάπτωση (αλλοστερική μετάπτωση) η οποία προκαλείται ή σταθεροποιείται , όταν η πρωτεΐνη συνδέεται με έναν αλλοστερικό προσδέτη.

Ως αλλοστερικές χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τουλάχιστον δυο διακριτικά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο ευθύνεται για την βιολογική δράση της πρωτεΐνης, συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ στο αλλοστερικό συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση ένας άλλος προσδέτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ενζυμο-αλλοστερικός τροποποιητής προκαλεί μια διακριτή, αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται αλλοστερική μετάπτωση. Αυτή τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή. Γενικά, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση απορρέει αποκλειστικά από την συγκεκριμένη δομή του ιδίου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή είναι που του επιτρέπει να μεταβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωση του που επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Δηλαδή, το μόριο να έχει ένα τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δύο διαμορφώσεις την T και την R, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που ρυθμίζεται από την αλλοστερική σταθερά L. (*Monod, Changeux, Wyman , 1965*)

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: μια συνήθως ενεργό φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργό φωσφορυλάση b. Κάθε μια από τις δύο μορφές της, δηλαδή τη μορφή a και b, βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγου ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για τη φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η φωσφορυλάση b μετατρέπεται στην μορφή a όταν φωσφορυλιώνεται σε ένα κατάλοιπο σερίνης (Ser 14) σε κάθε υπομονάδα. Αυτή η ομοιοπολική τροποποίηση καταλύεται από το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης.

Η μετάβαση από τη κατάσταση T στην R συνεπάγεται μια στροφή 10 μοιρών γύρω από τον άξονα συμμετρίας δευτέρας τάξεως του διμερούς και επιπλέον

συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α-έλικες, οι οποίες μετακινούν ένα βρόχο έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι, η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή καθώς το καταλυτικό κέντρο παρεμποδίζεται. Το αντίθετο συμβαίνει στην κατάσταση R, όπου το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό ιόν είναι καλά οργανωμένη.

Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί την στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Συνεπώς το ενεργειακό φορτίο ελέγχει τη μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R. Η 6-φωσφορική γλυκόζη ευνοεί επίσης την κατάσταση T της φωσφορυλάσης b (επανατροφοδοτική αναστολή). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP. Αντίθετα, η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργή ανεξαρτήτως των επιπέδων ATP, AMP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης.

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιόσταση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση a, αλλά όχι και η b παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης a από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP, γιατί το ήπαρ δεν υφίσταται τις αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. (*L.Stryeretal. – Biochemistry 5th edition. Κεφαλαίο21*).



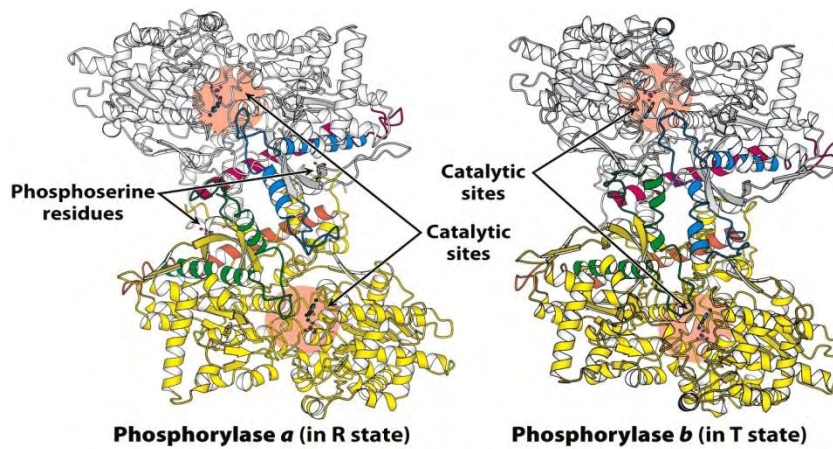


Figure 21.10  
 Biochemistry, Seventh Edition  
 © 2012 W. H. Freeman and Company

**Εικόνα 6:** Δομή της φωσφορυλάσης a και της φωσφορυλάσης b. Η φωσφορυλάση a φωσφορυλιώνεται στη ser14 κάθε υπομονάδας. Η τροποποίηση αυτή ευνοεί τη δομή της πλέον ενεργού κατάστασης R. Η φωσφορυλάση b δε φωσφορυλιώνεται και υπάρχει κυρίως στην κατάσταση T

### 3.3 Ενζυμική αναστολή

Η δρατικότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μορίων ή ιόντων. Αυτός ο τρόπος αναστολής της ενζυμικής δρατικότητας έχει τον ρόλο του κύριου μηχανισμού ελέγχου στα βιολογικά συστήματα. Οι ουσίες που προκαλούν παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης ονομάζονται αναστολείς. Ως αναστολείς θεωρούνται ουσίες οι οποίες, σε χαμηλή συγκέντρωση, ελαττώνουν την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, έχοντας την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με το ένζυμο και να παρεμποδίζουν τη δράση του. Οι αναστολείς λειτουργούν εκλεκτικά, αλληλεπιδρώντας με λίγες και συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης επί του ενζυμικού μορίου.

Με βάση την κινητική, οι αναστολείς διακρίνονται σε:

- *Αντιστρεπτός* : δεσμεύονται κατά τρόπο αντιστρέψιμο με το ένζυμο, οπότε το τελευταίο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δρατικότητά του, όταν αφαιρεθεί ο αναστολέας. Ο βαθμός αναστολής της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία αναστολέα παραμένει σταθερός τουλάχιστον για το αρχικό στάδιο της αντίδρασης και εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις αναστολέα, ενζύμου και υποστρώματος
- *Μη αντιστρεπτός* : δεσμεύονται κατά τρόπο μόνιμο (π.χ. σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού), οπότε το ένζυμο αδρανοποιείται, συνήθως, οριστικά.

Ενώ οι τύποι αναστολείς διακρίνονται σε:

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

Στη *συναγωνιστική* αναστολή, το ένζυμο μπορεί να προσδένει υπόστρωμα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI) αλλά όχι και τα δύο. Πολλοί συναγωνιστικοί αναστολείς μοιάζουν με το υπόστρωμα και προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης, με το να ελαττώνει την αναλογία μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδεμένα με ένα υπόστρωμα. Η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος (Κυριακίδης Δ.Α)

Στη *μη συναγωνιστική αναστολή*, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδέονται ταυτόχρονα σ' ένα μόριο ενζύμου. Αυτό σημαίνει ότι οι περιοχές πρόσδεσής τους δεν επικαλύπτονται. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεδεμένα με το υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Η *μικτή αναστολή* είναι πιο περίπλοκη και συμβαίνει όταν ένας αναστολέας και επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου. Τέλος κατά την *ανταγωνιστική αναστολή* η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου- υποστρώματος.

### 3.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Τα τελευταία χρόνια έχει γεννηθεί η ανάγκη εύρεσης όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερων φαρμάκων έναντι του διαβήτη τύπου 2. Τα περισσότερα φάρμακα που χορηγούνται μέχρι στιγμής έχουν μικρή αποτελεσματικότητα αλλά και αρκετές παρενέργειες. Μέρος της συνολικής έρευνας έχει επικεντρωθεί σε προσεγγίσεις που στοχεύουν στη μείωση της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ μέσω αναστολής της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Το ενδιαφέρον έχει στραφεί στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου καθώς αποτελεί ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Ακριβώς γι' αυτόν της το ρόλο, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για τον σχεδιασμό αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούσαν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

Η γλυκόζη είναι ένας φυσιολογικός ρυθμιστής του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο ήπαρ, η οποία προάγει την απενεργοποίηση της GPα και δρα συνεργειακά με την ινσουλίνη οδηγώντας στη μείωση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου και σε ενίσχυση της σύνθεσής του (BollenandStalmans ,1992). Ανάλογα της γλυκόζης με μεγαλύτερη δυνατότητα αναστολής της GP θα μπορούσαν να μεταβάλουν σημαντικά την ισορροπία μεταξύ της αποικοδόμησης και της σύνθεσης του γλυκογόνου, ενισχύοντας την τελευταία. (Martinetal. 1991)

Η αναστολή της δράσης της GP μπορεί να προσφέρει ένα νέο μηχανισμό μείωσης των επιπέδων της γλυκόζης που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τις ήδη υπάρχοντες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Αναστολείς ιδιαίτως του ηπατικού ενζύμου μπορεί να φανούν πολύ χρήσιμοι θεραπευτικοί παράγοντες για τον διαβήτη τύπου 2, σε συνδυασμό με άλλα αντιδιαβητικά φάρμακα, των οποίων ο μηχανισμός ελάττωσης της γλυκόζης δεν έχει κάποια ουσιαστική δράση στο ήπαρ.

## 4.Πειραματικό μέρος

### Σκοπός

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 επικεντρώνεται στη μελέτη ενζύμων του μεταβολισμού του γλυκογόνου, όπως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου και μορίων που μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της. Βασικός στόχος της έρευνας είναι η εύρεση μορίων-αναστολέων που θα αναστέλλουν τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου ισχυρά και θα μπορούν χρησιμοποιηθούν ως αντιυπεργλυκαιμικοί παράγοντες.

Στην συγκεκριμένη εργασία, έγινε αρχικά απομόνωση της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και ακολούθησε φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (rmGPb) ώστε να μετατραπεί στην ενεργή μορφή της α (rmGPα). Στη συνέχεια έγιναν κινητικές μελέτες για τρεις αναστολείς, ανάλογα γλυκόζης, με σκοπό να εξετασθεί η ανασταλτική τους ικανότητα μέσω μέτρησης της σταθεράς αναστολής ( $K_i$ ) για τον κάθε αναστολέα.

## 4.1 Απομόνωση της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανασυνδυασμένα στελέχη *E.coli*

### Υλικά:

- LB broth
- LB άγαρ
- Θρεπτικό μέσο SOB
- Χλωραμφαινικόλη
- Αμπικιλίνη
- MTG
- Διάλυμα Λύσης κυττάρων (Lysis buffer) pH= 7,4 (Hepes/NaOH 50 mM, NaCl 0.2 M , IPTG 0,1% v/v και γλυκερόλη 5% v/v)
- PMSF 0.1 M
- Διαλύματα Ηλεκτροφόρησης :  
Πηκτή διαχωρισμού : (dH<sub>2</sub>O, 30% acrylamide mix, Tris/HCL 1,5M pH=8,8, 10% SDS, 10% w/v ammonium persulfate, TEMED)  
Πηκτή επιστοιβαξης: (dH<sub>2</sub>O, 30% acrylamide mix, Tris/HCl 1M pH=6,8, 10% w/v SDS, 10% w/v ammonium persulfate , TEMED)
- Αντιδραστήριο Bradford
- Διάλυμα χρώσης coomasie blue
- Διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH 10x
- dH<sub>2</sub>O

### Όργανα:

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός, Spectronic<sup>®</sup> 20 Genesys<sup>™</sup>
- Στήλες χρωματογραφίας : Στήλη Cibacron Blue , Στήλη GST
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Υδατόλουτρο
- Sonicator

#### 4.1.1 Εισαγωγή πλασμιδίου σε χημειο-δεκτικά κύτταρα- Καλλιέργεια βακτηρίων σε στερεό θρεπτικό μέσο

Το πλασμίδιο περιέχει την καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η οποία διαθέτει ετικέτα συγγενείας GST (GST-tag).

Σε 100μL κυττάρων προστίθεται 1μL πλασμιδίου (περίπου 30 ngr πλασμίδιο). Τα κύτταρα με το πλασμίδιο αφήθηκαν για 30 λεπτά στον πάγο, στη συνέχεια για 45 δευτερόλεπτα στο υδατόλουτρο στους 42°C και ξανά στον πάγο για 2 ακόμη λεπτά. Τέλος προστέθηκαν 900μL εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο SOB και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37 °C.

Μετά την επώαση στρώνονται καλλιέργειες βακτηρίων σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB-άγαρ το οποίο περιέχει 34 μgr/mL χλωραμφενικόλης, και 50 μgr/mL αμικικιλίνης και ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 37 °C.

#### 4.1.2 Εμβολιασμός- καλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό μέσο

Σε κωνική φιάλη των 50 mL με υγρό θρεπτικό μέσο LB-broth προστίθεται μια εκ των αποικιών που έχουν αναπτυχθεί στα τρυβλία και επωάζεται για 12-16 ώρες.

Σε 4 μεγάλες κωνικές φιάλες που περιέχουν 1L υγρό θρεπτικό μέσο προστίθενται 10 mL (σε κάθε κωνική φιάλη) από την προηγούμενη υγρή καλλιέργεια. Κάθε 1L υγρού θρεπτικού υλικού περιείχε 50 μgr/mL αμικικιλίνης και 34 μgr/mL χλωραμφαινικόλης. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 3 ώρες. Μετά τις 3 ώρες γίνεται φωτομέτρηση δείγματος της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600 nM ώστε να ελεγχθεί η ανάπτυξη. Η επιθυμητή OD είναι 0.5-0.7. Η φωτομέτρηση επαναλαμβάνεται ανά 20-30 λεπτά έως ότου η απορρόφηση να φτάσει στην επιθυμητή τιμή. Μετά από περίπου 90 λεπτά επιπλέον επώασης η τιμή της οπτικής απορρόφησης ήταν 0.544 και η επώαση τερματίστηκε.

Μετά την επώαση οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε πάγο ώστε να σταματήσει η ανάπτυξη των βακτηρίων και προστίθενται σε κάθε μια 0.1 mM IPTG (επαγωγέας υπερέκφρασης του γονιδίου του πλασμιδίου). Ακολουθεί επώαση στους 18 °C, με ανακίνηση σε 210 rpm για 12-16 ώρες.

#### 4.1.3 Φυγοκέντρηση και λύση των κυττάρων

Σε 50 mL διαλύματος λύσης προστίθεται 1 mM PMSF (αναστολέας πρωτεασών). Τα 4 λίτρα υγρής καλλιέργειας φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά σε 4-6 °C, σε 5.000 g και συλλέγεται το ίζημα. Στο σωληνάριο που περιέχει το ίζημα της φυγοκέντρησης προστίθενται 25 mL διαλύματος λύσης και γίνεται ανάδευση έως ότου το διάλυμα ομογενοποιηθεί. Προστίθεται 1μL βενζονάση (νουκλεάση) και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10 λεπτά και ανάδευση ανά 2 λεπτά.

Στη συνέχεια το ομογενοποίημα των κυττάρων τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων σε πλάτος 70% για 3 κύκλους (διάρκειας 30 δευτερολέπτων ο καθένας) με μία παύση 30 sec μετά από κάθε κύκλο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 45 λεπτά στους 6 °C σε 15.000 g.

Τέλος το διάλυμα που πλέον έχει όγκο 22 mL φιλτράρεται με φίλτρο πόρων διαμέτρου 0.4 μm.

#### **4.2.1 Απομόνωση και Καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία- έλεγχος της καθαρότητας με ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης**

##### Χρωματογραφία

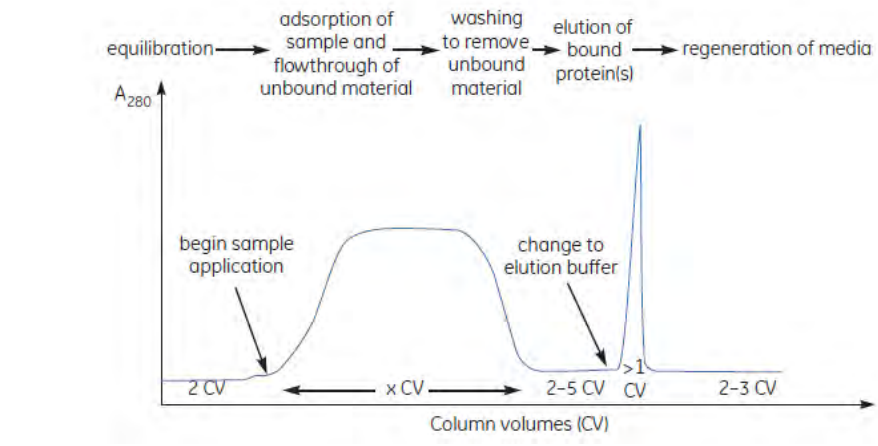
Γενικά ο όρος χρωματογραφία αναφέρεται σε ένα σύνολο εργαστηριακών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό διαλυμάτων. Όλων των ειδών οι χρωματογραφίες αποτελούνται από 2 φάσεις: την κινητή φάση στην οποία βρίσκεται και το δείγμα προς διαχωρισμό, και τη στατική φάση. Καθώς η υγρή φάση περνά μέσα από τη στήλη στην οποία συγκρατείται η στατική φάση, τα συστατικά του διαλύματος διαχωρίζονται καθώς διαπερνούν τη στήλη με διαφορετική ταχύτητα. Η χρωματογραφία μπορεί να είναι αναλυτική: για τη μέτρηση των σχετικών αναλογιών των συστατικών σε ένα μίγμα, ή προπαρασκευαστική: χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματός για περαιτέρω χρήση, δηλαδή ως τεχνική καθαρισμού. (Heftman E.)

##### Χρωματογραφία συγγένειας (AC)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στην χρωματογραφία συγγένειας γίνεται λόγω της ύπαρξης αντιστρεπτής αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης-στόχου και ενός ειδικού προσδέτη που βρίσκεται ακινητοποιημένος στη στήλη. Η αλληλεπίδραση μπορεί να είναι βιοειδική (π.χ. σύνδεση μεταξύ αντισωμάτων και πρωτεΐνης), ή μη βιοειδική (π.χ η πρωτεΐνη να δένεται σε μια χρωστική). Η AC είναι μια τεχνική υψηλής εκλεκτικότητας και ως εκ τούτου υψηλής ανάλυσης.

Στην ACη πρωτεΐνη-στόχος δεσμεύεται ειδικά και αντιστρεπτά με τον προσδέτη που βρίσκεται στη στήλη. Το δείγμα περνά μέσα από τη στήλη υπό συνθήκες που ευνοούν την ειδική αυτή σύνδεση ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος που δεν συγκρατούνται από την στήλη απομακρύνονται. Η δεσμευμένη πρωτεΐνη-στόχος ανακτάται, αλλάζοντας τις συνθήκες σε τέτοιες που να ευνοούν την έκλυση. Η έκλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί ειδικά, χρησιμοποιώντας έναν

ανταγωνιστικό προσδέτη, ή μη ειδικά αλλάζοντας π.χ. το pH, την ιονική ισχύ ή την πολικότητα. Έτσι η πρωτεΐνη στόχος εκλύεται σε μια πιο καθαρή και συμπυκνωμένη μορφή. (*Strategies for Protein Purification Handbook- GE healthcare*)



**Εικόνα 7:** Τυπικό χρωματογράφημα συγγένειας, όπου φαίνονται οι φάσεις της διαδικασίας

Στη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα χρωματογραφίας FPLC (fast protein liquid chromatography). Η FPLC είναι μια μορφή υγρής χρωματογραφίας, όπου η κινητή φάση είναι ένα υδατικό διάλυμα και η στατική φάση είναι μια ρητίνη αποτελούμενη από σφαιρίδια (σε διαφορετικά μεγέθη ή με διαφορετικούς προσδέτες αναλόγως την εφαρμογή), συσκευασμένη σε κυλινδρική στήλη. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ελέγχεται από μια αντλία και συνήθως διατηρείται σταθερός, ενώ η σύσταση του υδατικού διαλύματος μπορεί να μεταβληθεί από την άντληση υγρών σε διαφορετικές αναλογίες από εξωτερικές δεξαμενές.

Στην συνηθέστερη στρατηγική της FPLC, η πρωτεΐνη-στόχος προσδένεται στη στήλη λόγω αλληλεπίδρασης φορτίου, όσο βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα A (buffer A), αλλά απομακρύνεται από τη στήλη όταν βρεθεί σε υδατικό διάλυμα B (buffer B). Το μίγμα που περιέχει την πρωτεΐνη - στόχο διαλύεται σε 100% buffer A και περνά απ την στήλη. Ο ρυθμός ροής του διαλύματος παραμένει σταθερός, όμως η αναλογία του buffer B (υδατικό διάλυμα έκλυσης) αυξάνεται σταδιακά από 0% σε 100%. Σε κάποιο σημείο αυτής της διαδικασίας η πρωτεΐνη –στόχος εκλύεται.

#### [4.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτής ακρυλαμίδης \(SDS-PAGE\)](#)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια σχετικά απλή, γρήγορη και πολύ ευαίσθητη μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη των ιδιοτήτων των πρωτεϊνών. Η τεχνική διαχωρισμού των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο γεγονός

ότι φορτισμένα μόρια θα μετακινηθούν κατά μήκος ενός πηκτώματος, όταν σε αυτό εφαρμοσθεί ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο παρέχεται συνήθως από ηλεκτρόδια. Εάν τα μόρια που πρόκειται να διαχωριστούν, φορτιστούν με το ίδιο ακριβώς φορτίο, τότε ο διαχωρισμός τους θα γίνει με βάση το μοριακό τους βάρος και η κινητικότητα τους θα είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Με βάση αυτό το γεγονός στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης, οι πρωτεΐνες φορτίζονται αρνητικά από την πρόσδεση των ανιονικού απορρυπαντικού SDS (δωδεκυλοθειικό νάτριο) και έτσι διαχωρίζονται μέσα σε μία μήτρα από γέλη πολυακρυλαμίδιου σε ένα ηλεκτρικό πεδίο σύμφωνα με τα μοριακό τους βάρος. Η SDS-PAGE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του μεγέθους, της ποσότητας, της καθαρότητας και του ισοηλεκτρικού σημείου πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών. (B. D. Hames, 1988)

#### 4.2.3 Πηκτή ακρυλαμίδιου

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για να σχηματιστεί το πολυακρυλαμίδιο είναι το μονομερές ακρυλαμίδιο και το δις-ακρυλαμίδιο. Η αντίδραση πολυμερισμού των 2 αυτών συστατικών για το σχηματισμό του πολυακρυλαμίδιου πυροδοτείται είτε από χημικά είτε από φωτοχημικά συστήματα παραγωγής ελευθέρων ριζών. Ο χημικός πολυμερισμός ξεκινά από το TEMED (τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη) και το APS (υπερθεϊκό αμμώνιο). Όταν το APS διαλύεται στο νερό σχηματίζει ελεύθερες ρίζες υπερθεϊκού οι οποίες ενεργοποιούν το μονομερές ακρυλαμίδιο. Το TEMED προστίθεται ως καταλύτης για να επιταχύνει την αντίδραση πολυμερισμού λόγω της ικανότητάς του να μεταφέρει ηλεκτρόνια. Το ενεργοποιημένο ακρυλαμίδιο στη συνέχεια αντιδρά με τα υπόλοιπα μονομερή σχηματίζοντας μια μακριά αλυσίδα. Οι επιμηκυνόμενες αλυσίδες πολυμερών διασταυρώνονται τυχαία με το δις-ακρυλαμίδιο, ώστε να σχηματίσουν ένα δίχτυ από αλυσίδες ακρυλαμίδιου. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το APS και η καταλυτική δράση του TEMED είναι απαραίτητα στοιχεία για την εκκίνηση του πολυμερισμού, καθώς το ακρυλαμίδιο δεν αντιδρά με τον εαυτό του ή με το δις-ακρυλαμίδιο. (B. D. Hames, 1988)

#### 4.2.4 Ποσοτικοποίηση πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μια χρωματική μέθοδος που βασίζεται στο εύρος των απορροφήσεων της χρωστικής *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Υπό όξινες συνθήκες, η εν λόγω χρωστική αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. (Bradford M. M 1976)



#### 4.2.5 Πειραματική Διαδικασία

Συνολικά για να καθαριστεί πλήρως η πρωτεΐνη χρειάζεται να περάσει από 3 χρωματογραφικές στήλες. Μετά από κάθε στήλη τα η καθαρότητα της πρωτεΐνης ελέγχεται με SDS-PAGE.

##### 1) Στήλη GST

Όπως προαναφέρθηκε η πρωτεΐνη είναι σημασμένη με GST-tag (τρανσφεράση της γλουταθειόνης) και έτσι όταν το διάλυμα περνάει από την στήλη η πρωτεΐνη συγκρατείται από την γλουταθειόνη (GSH) που βρίσκεται προσροφημένη στην στήλη. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη εκλύεται καθώς η στήλη διαπερνάται από διάλυμα που περιέχει σχετικά υψηλή συγκέντρωση GSH.

Παρασκευαστήκαν 2 διαλύματα για την στήλη : buffer A( για εξισορρόπηση της στήλης) και buffer B (για την έκλυση)

**Buffer A.** 250 mL, pH= 8.2

Συστατικά	Τελική σύσταση
1.71 gr KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM
12.5 mL γλυκερόλη	γλυκερόλη 5% v/v
250 μL MTG	MTG 0.1% w/v
2.92 gr NaCl	NaCl 200 mM

**Buffer B.** 150 mL

Συστατικά	Τελική Σύσταση
1.02 gr KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM
7.5 mL γλυκερόλη	γλυκερόλη 5% v/v
150 μL MTG	MTG 0.1%
1.753 gr NaCl	NaCl 200 mM
0.922 gr GSH	GSH 20 mM

Μετά το πέρας της χρωματογραφίας, γίνεται ηλεκτροφόρηση για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων και ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 595 nm με τη μέθοδο Bradford για τον προσδιορισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης.

Το διάλυμα που φωτομετρείται περιέχει: - 20 μL δείγματος πρωτεΐνης

-200 μL αντιδραστήριο Bradford

-780  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$

Ο υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης γίνεται με βάση την εξισωσή της από την πρότυπη καμπύλη:

$$y = 0,869x + 0.015$$

Όπου  $y$  η τιμή της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm και  $x$  η ποσότητα της πρωτεΐνης σε mg/mL

Με τη χρήση του παραπάνω τύπου και πολλαπλασιασμό του αποτελέσματος με τα mL στα οποία περιέχεται η πρωτεΐνη προκύπτει ότι η ποσότητα της πρωτεΐνης που πάρθηκε από την χρωματογραφία είναι 3,3 mg.

Ακολουθεί απομάκρυνση της ετικέτας συγγενείας με τη βοήθεια της πρωτεάσης 3C για απομάκρυνση του GST-tag. Έτσι, η πρωτεΐνη επωάζεται με την 3C για 12-16 ώρες σε θερμοκρασία 4 °C. Η αναλογία της 3C που προστέθηκε ήταν 1 mg πρωτεάσης 3C ανά 20 mg πρωτεΐνης.

## 2) Στήλη Cibacron Blue

Μετά την επώαση έγινε αραίωση της πρωτεΐνης που διάλυμα που περιείχε 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 % MTG, 5 % γλυκερόλη (v/v), pH 8.2 σε αναλογία 1:4, ώστε η συγκέντρωση του NaCl να γίνει 50 mM, διότι σε 200 mM NaCl η πρωτεΐνη δεν θα μπορούσε να προσδεθεί στη στήλη. Το πρωτεϊνικό διάλυμα στο οποίο έγινε η πέψη, εισάγεται στη στήλη με σκοπό να διαχωριστεί η πρωτεΐνη και η πρωτεάση 3C, από τα κομμένα τμήματα GST και από άλλα πιθανά συστατικά που δεν απομακρύνθηκαν κατά τη διάρκεια της πρώτης χρωματογραφίας. Η στήλη Cibacron Blue συγκρατεί την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου καθώς και την πρωτεάση 3C.

Για τη στήλη παρασκευαστήκαν τα ακόλουθα διαλύματα: **Buffer A** 150 mL pH=8.2

Συστατικά	Τελική Σύσταση
1.02 gr $\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50mM
7.5 mL γλυκερόλη	γλυκερόλη 5% v/v
150 $\mu\text{L}$ MTG	MTG 0.1% w/v
0.438 gr NaCl	NaCl 50 mM
<b>Buffer B</b> 150 mL pH=8.2	

Συστατικά	Τελική Σύσταση
1.02 gr $\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM
7.5 mL γλυκερόλη	γλυκερόλη 5% v/v
150 $\mu\text{L}$ MTG	MTG 0.1% w/v

### 3) Στήλη GST

Γίνεται για τον διαχωρισμό της κινάσης από την πρωτεάση 3C. Η πρωτεάση 3C έχει και αυτή GST-tag όποτε θα συγκρατηθεί από τη στήλη ενώ η κινάση θα εκλουσθεί από τη στήλης. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την εξισορρόπηση και την έκλουση είναι τα ίδια που περιγράφηκαν και στην πρώτη στήλη GST.

Αφού συλλεχθεί το διάλυμα που περιέχει την πρωτεΐνη, συμπυκνώνεται με τη χρήση φίλτρων και φυγοκέντρωση σε 4.000 g σε θερμοκρασία 4 °C έως όγκου 100  $\mu$ L.

Ακολουθεί και πάλι ποσοτικοποίηση Bradford όπως και προηγουμένως και τελικώς η συγκέντρωση της πρωτεΐνης βρέθηκε να είναι 1,8 mg/mL. Το τελικό δείγμα έχει όγκο 80  $\mu$ L.

Απόδοση: 0.036 mg ανά L καλλιέργειας

Για την διατήρησή της, χωρίζεται σε δείγματα 40 $\mu$ L στα οποία προστίθενται 40  $\mu$ L γλυκερόλης (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 50% v/v) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20°C

### 4.3 Φωσφορυλίωση της rmGPb για την παραγωγή rmGPa

Αρχικά παρασκευάζεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/NaOH 4x όγκου 50 mL και pH= 8.2 το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την αραίωση του δείγματος της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αλλά και για την αντίδραση της φωσφορυλίωσης. Η σύσταση του διαλύματος και η ποσότητες των συστατικών που προστέθηκαν για την παρασκευή του αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Συστατικά που προστίθενται	Τελική σύσταση σε όγκο διαλύματος 50 mL
1.211 gr Tris	Tris 200mM
2.383 gr Hepes	Hepes 200mM
0.015 gr CaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub> 2mM
0.062 gr DTT	DTT 8mM
0.428 gr (CH <sub>3</sub> COO <sub>2</sub> )Mg	(CH <sub>3</sub> COO <sub>2</sub> )Mg 40mM

Στην αντίδραση φωσφορυλίωσης πρέπει να υπάρχουν 0.5 mg/mL rmGPb και 10 ng/mL κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Το διάλυμα της rmGPb που θα φωσφορυλιωθεί φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm ώστε να

προσδιορισθεί η συγκέντρωση του. Η περιεκτικότητα του ενζύμου στο διάλυμα υπολογίζεται από τον τύπο :  $C = \frac{OD}{1,32}$  (1.32 είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ενζύμου)

Το διάλυμα έχει συγκέντρωση 1.33 mg/mL και όγκο= 700μL. Επομένως με βάση τον νόμο αραιώσης :

$$C_1V_1=C_2V_2 \Rightarrow 1.33 \text{ mg/mL} \times 700 \text{ }\mu\text{L} = 0.5 \text{ mg/mL} \times V_2 \Rightarrow V_2 = 1862 \text{ }\mu\text{L}.$$

Συνεπώς ο όγκος αντίδρασης της φωσφορυλίωσης θα είναι 1862 μL.

Με διαδοχικές αραιώσεις από το αρχικό διάλυμα της κινάσης (0.9 mg/mL) παρασκευάστηκε ένα διάλυμα κινάσης όγκου 600 μL και συγκέντρωσης 0.9 μg/mL. Το διάλυμα αραιώσης της κινάσης περιέχει:

-250μL Buffer Hepes/NaOH 4x

-500 μL BSA 10 mg/mL

-250 μL dH<sub>2</sub>O

Οι τελικές συγκεντρώσεις των παραπάνω συστατικών στο διάλυμα αραιώσης ήταν:

- Hepes 1x και BSA 50 mg/mL

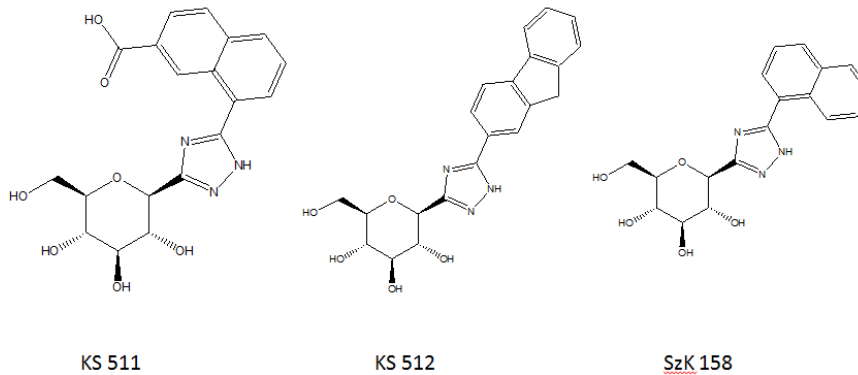
Συγκεντρωτικά ή σύσταση του διαλύματος φωσφορυλίωσης και η ποσότητες των συστατικών που προστέθηκαν για την παρασκευή του αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Συστατικά που προστίθενται	Τελική σύσταση σε όγκο διαλύματος 1862 μL
700 μL rm GPb 1.33 mg/mL	rmGPb 0.5 mg/mL
465.5 μL Hepes 4x	Hepes 1x (Tris 50mM / Hepes 50mM / CaCl <sub>2</sub> 0.5mM / DTT 2mM / (CH <sub>3</sub> COO <sub>2</sub> )Mg 10mM)
372.4 μL ATP 10mM	ATP 2mM
20.7 μL κινάση 0.9 μg/mL	Κινάση 10 ng/mL
303.4 μL dH <sub>2</sub> O	

Η αντίδραση της φωσφορυλίωσης έγινε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30 °C για 3 ώρες.

#### 4.4 Κινητικές μελέτες έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου α

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου α υποβλήθηκε σε κινητικές μελέτες με σκοπό αρχικά τον προσδιορισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ ), και στη συνέχεια τον προσδιορισμό της  $K_i$  τριών αναστολέων έναντι της rmGPa. Όπως προαναφέρθηκε η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διασπά το γλυκογόνο με την προσθήκη ορθοφωσφορικού προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία διεξήχθη η αντίθετη αντίδραση κατά την οποία το ένζυμο προσθέτει μόρια 1-φωσφορική γλυκόζη στο γλυκογόνο με αποτέλεσμα την απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων ( $P_i$ ) τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν φασματοφωτομετρικά.



Εικόνα 8: Οι χημικές δομές των τριών αναστολέων

#### Υλικά:

- rmGPa
- β-φωσφογλυκερινικό νάτριο
- 2-μερκαπτοαιθανόλη
- EDTA
- DTT
- Ιμιδαζόλιο
- Χλωριούχο κάλιο ( $KCl$ )
- Διάλυμα  $\alpha$ -D-Glc-1-P (G1P) 400 mM
- Διαλύματα των αναστολέων
- SDS 1% w/v
- Γλυκογόνο 10% w/v

- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων ( $P_i$ ) 1 mM
- Ασκορβικό οξύ
- Μολυβδαινικό αμμώνιο
- Οξικός ψευδάργυρος
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 10 M
- Οξικό Νάτριο (NaOH) 10 M
- $dH_2O$

### Όργανα:

- Υδατόλουτρο, με θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 37°C
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός
- Vortex
- Αναλυτικός ζυγός
- Χρονόμετρο

#### 4.4.1 Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος

Αρχικά παρασκευάζεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου 50:50:1 του οποίου οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών είναι οι εξής:

<b>Ρυθμιστικό Διάλυμα 50:50:1 , pH= 6.8 , V= 150mL</b>
--

β-φωσφογλυκερινικό νάτριο: 50mM
---------------------------------

2-μερκαπτοαιθανόλη: 50mM
--------------------------

EDTA: 1mM
-----------

Στην συνέχεια παρασκευάστηκε το ενζυμικό διάλυμα όγκου 240  $\mu$ L, στο οποίο οι τελικές συγκεντρώσεις του γλυκογόνου και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου α θα πρέπει να είναι 0.1% w/v και 15  $\mu$ g/mL αντιστοίχως. Η συγκέντρωση της rmGPa στο αρχικό δείγμα είναι 0,5mg/mL. Επομένως το ενζυμικό διάλυμα παρασκευάστηκε ως εξής:

24 $\mu$ L Γλυκογόνο 10% w/v
------------------------------

12 $\mu$ L 50:50:1
--------------------

7.2 $\mu$ L rmGPa 0.5 mg/mL
-----------------------------

196,8 $\mu$ L $dH_2O$
-----------------------

#### 4.4.2 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρώματος 1-φωσφορικής γλυκόζης

Για την παρασκευή των διαλυμάτων υποστρώματος G1P έπρεπε αρχικά να παρασκευαστούν δύο ρυθμιστικά διαλύματα (1 & 2) τα οποία περιείχαν τα παρακάτω:

<b>ρυθμιστικό διάλυμα 1, pH= 6.8, ρυθμιστικό διάλυμα 2, pH=6.8 , V=50mL V=150mL</b>	
KCl=400 mM	KCl=270 mM
Ιμιδαζόλιο= 200 mM	Ιμιδαζόλιο= 135 mM
DTT= 4 mM	DTT= 2.7 mM
EDTA= 4 mM	EDTA= 2.7 mM

Από το αρχικό διάλυμα G1P (400 mM) παρασκευάστηκε διάλυμα G1P όγκου 1400  $\mu$ L και συγκέντρωσης 90 mM χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα 1 και απιονισμένο νερό ( $dH_2O$ ) στις εξής αναλογίες:

**G1P 90 mM:** 315  $\mu$ L G1P 400 mM + 945  $\mu$ L ρυθμιστικό διάλυμα 1 + 140  $\mu$ L  $dH_2O$

Για τον προσδιορισμό τόσο της  $K_m$ , όσο και των  $K_i$  χρησιμοποιήθηκαν έξι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις G1P. Η παρασκευή των διαλυμάτων G1P τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ώστε τελικά στον όγκο αντίδρασης να υπάρχει η επιθυμητή, κάθε φορά, συγκέντρωση G1P, έγινε με αραίωση του διαλύματος G1P 90 mM με το ρυθμιστικό διάλυμα 2.

Πιο συγκεκριμένα:

<b>Συγκέντρωση G1P στα αρχικά διαλύματα υποστρωμάτων 1000<math>\mu</math>L</b>	<b>Τελική συγκέντρωση G1P στον όγκο αντίδρασης V= 180 <math>\mu</math>L</b>
9 mM	2 mM
13.5 mM	3 mM
18 mM	4 mM
27 mM	6 mM
45 mM	10 mM

Τελικά το διάλυμα υποστρώματος που χρησιμοποιείται στην πειραματική διαδικασία, όγκου 144  $\mu$ L, αποτελείται από : **40  $\mu$ L G1P** x συγκέντρωσης (μια εκ των παραπάνω συγκεντρώσεων και **104  $\mu$ L  $dH_2O$**

#### 4.4.3 Πειραματική διαδικασία

Μόλις παρασκευαστεί το ενζυμικό διάλυμα, επωάζεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 37 °C στο υδατόλουτρο, ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του ενζύμου με το γλυκογόνο. Τα διαλύματα των υποστρωμάτων παρασκευάζονται κατά την

διάρκεια επώασης του ενζυμικού διαλύματος και τοποθετούνται στο υδατόλουτρο περίπου 3 λεπτά πριν το τέλος επώασης του ενζυμικού διαλύματος, ώστε να αποκτήσουν την κατάλληλη θερμοκρασία. Η 1-φωσφορική γλυκόζη προστίθεται στα διαλύματα υποστρωμάτων λίγο πριν την τοποθέτηση τους στο υδατόλουτρο, ώστε να αποφευχθεί όσο το δυνατόν περισσότερο, η φυσική της υδρόλυση.

Μετά το πέρας της επώασης μεταφέρονται 36  $\mu\text{L}$  από το ενζυμικό διάλυμα, στο διάλυμα υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Ο όγκος αντίδρασης είναι 180  $\mu\text{L}$ , το pH της αντίδρασης είναι 6.8 και η συγκέντρωση του ενζύμου είναι 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Η στιγμή που προστίθεται το ενζυμικό διάλυμα αποτελεί τον χρόνο 0, από εκείνη τη στιγμή ανά χρονικό διάστημα 1 λεπτού και σε συνολικό χρόνο 4 λεπτών, λαμβάνεται δείγμα 40  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα αντίδρασης. Το δείγμα μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 10  $\mu\text{L}$  SDS 1% w/v (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται) και ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex ώστε να επιτευχθεί η εξ ολοκλήρου αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Τέλος, πραγματοποιείται φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φωσφορικών (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο του ασκορβικού οξέος, όπως περιγράφεται στο εδάφιο 4.4.4. Προσδιορισμός πραγματοποιείται και σε τυφλούς μάρτυρες G1P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και ενζυμικού διαλύματος αλλά και πρότυπου διαλύματος φωσφορικών.

Οι τυφλοί μάρτυρες παρασκευάζονται ως εξής:

- Νερού: 10  $\mu\text{L}$  SDS 1% w, 40  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O
- Ενζύμου: 10  $\mu\text{L}$  SDS 1% w/v, 32  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O, 8  $\mu\text{L}$  ενζυμικό διάλυμα
- G1P: 10  $\mu\text{L}$  SDS 1% w/v, 31.1  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O, 8.9  $\mu\text{L}$  G1P 45 mM
- Pi: 10  $\mu\text{L}$  SDS 1% w/v, 30  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O, 10  $\mu\text{L}$  Pi 10mM

Τελικές συγκεντρώσεις στους τυφλούς μάρτυρες: G1P: 10 mM, Pi: 0.25 mM και 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *mGPa* (0.2 % w/v γλυκογόνο, 1 % ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1)

#### 4.4.4 Προσδιορισμός του φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του ανόργανου φωσφόρου αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στις βιοχημικές μελέτες, κυρίως στην μελέτη ενζυμικών αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ο προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων που απελευθερώνονται κατά την πορεία της αντίδρασης, κάνει δυνατή την κινητική μελέτη του ενζύμου.

#### Μέθοδος ασκορβικού οξέος



Οι ανόργανες μορφές του φωσφόρου, σχηματίζουν σύμπλοκο με το μολυβδενικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου ( $Zn^{+2}$ ) και σε pH=5, το οποίο απορροφάει έντονα στο υπεριώδες φως. Μετά από προσθήκη ασκορβικού οξέος, το φωσφομολυβδενικό σύμπλοκο ανάγεται και παράγει ένα χρωμοφόρο το οποίο παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm όπου και γίνεται η φωτομέτρηση. (SahekiS. etal 1985)

#### Υλικά:

Διάλυμα μολυβδαινίου, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με ατμίζων HCl 10 N.

Διάλυμα ασκορβικού οξέος, 10% (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10 N.

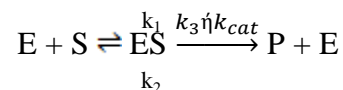
Γίνεται ανάμιξη 4:1 όγκου αντιδραστηρίου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος. Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από 15min από την παρασκευή του.

#### Διαδικασία

Στα δείγματα που έχουν προκύψει από το κινητικό πείραμα, προστίθενται 700  $\mu$ L από το παραπάνω αντιδραστήριο. Μετά από ισχυρή ανάδευση με vortex, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται στο υδατόλουτρο για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 30° C. Έπειτα ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm.

#### 4.4.5 Προσδιορισμός Km

Σε μια ενζυμική αντίδραση της μορφής



Όπου:

**E** ένζυμο

**S** υπόστρωμα

**ES** σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

**P** προϊόν

**k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub>, k<sub>3</sub>**, οι σταθερές των αντίστοιχων αντιδράσεων

Ως σταθερά *Michaelis-Menten* ( $K_M$ ) ορίζεται ο λόγος  $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$

(Κυριακίδης Δ.Α, 2001)

Η σταθερά  $K_m$  αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (G-1-P για το ένζυμο GPa) και μπορεί να θεωρηθεί ως η συγκέντρωση εκείνη του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας ( $V_{max}$ ) (Κυριακίδης Δ.Α, 2001)

Για τον υπολογισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten* ( $K_m$ ) χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση *Michaelis-Menten*,

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

v: ταχύτητα

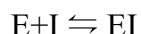
$V_{max}$ : μέγιστη ταχύτητα

[S]: συγκέντρωση υποστρώματος

Η επεξεργασία των δεδομένων των κινητικών πειραμάτων και ο προσδιορισμός της  $K_m$  έγινε με τη χρήση του προγράμματος GraFit.

#### 4.4.6 Προσδιορισμός της σταθεράς $K_i$ των αναστολέων

Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο έτσι ώστε να αποκαθιστάται μια κατάσταση ισορροπίας :



Όπου I ο αναστολέας και EI το σύμπλοκο ενζύμου –αναστολέα

Η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI δίνεται από τη σχέση:

$$K_i = \frac{[EI]}{[E][I]}$$

Η σταθερά  $K_i$  αποτελεί το αντίστροφο της αχιστείας ενζύμου-αναστολέα (Κυριακίδης Δ.Α 2001)

Όταν το ένζυμο βρίσκεται σε αναστολή εξακολουθεί να υπακούει στην κινητική των *Michaelis* και *Menten*, όπως απουσία αναστολέα, με τη διαφορά ότι (παρουσία συναγωνιστικού αναστολέα) για την σταθερά  $K_m$  διαμορφώνεται νέα

τιμή, οι οποία ονομάζεται φαινομενική (*apparent*) (Κλώνης Ι., 2006) και συμβολίζεται ως  $K_{m(app)}$ . Για τον προσδιορισμό της  $K_i$  κάθε αναστολέα, χρειάζεται αρχικά να προσδιοριστούν οι  $K_{m(app)}$ , για κάθε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση του εκάστοτε αναστολέα.

Το ενζυμικό διάλυμα είναι της ίδιας σύστασης όπως περιγράφηκε στο εδάφιο 4.4.1.

Τα διαλύματα των υποστρωμάτων έχουν τις ίδιες συγκεντρώσεις G1P όμως κατά την παρασκευή του κάθε διαλύματος προστίθεται και αναστολέας σε τέτοιο όγκο ώστε η συγκέντρωση του στον τελικό όγκο αντίδρασης να είναι η επιθυμητή.

Οι συγκεντρώσεις αναστολέων για τις οποίες προσδιορίστηκαν οι  $K_{m(app)}$  :

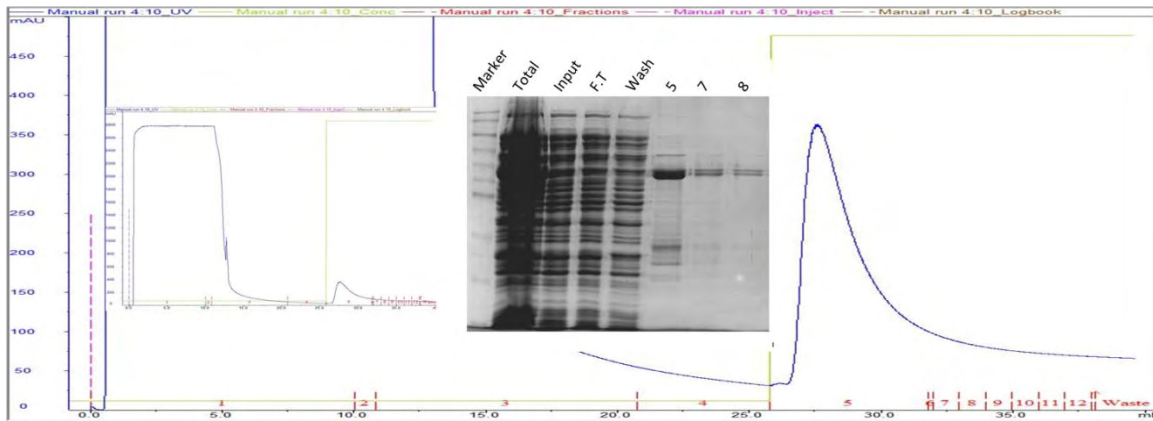
KS511	SzK158	KS512
0.5 $\mu$ M	2 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M
1 $\mu$ M	3 $\mu$ M	1 $\mu$ M
1.5 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1.5 $\mu$ M
2 $\mu$ M	7 $\mu$ M	2 $\mu$ M
3 $\mu$ M		
4 $\mu$ M		

Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού των  $K_{m(app)}$  που ακολουθείται είναι όμοια με αυτήν που περιγράφηκε στο εδάφιο 4.4.3

## 5.Αποτελέσματα

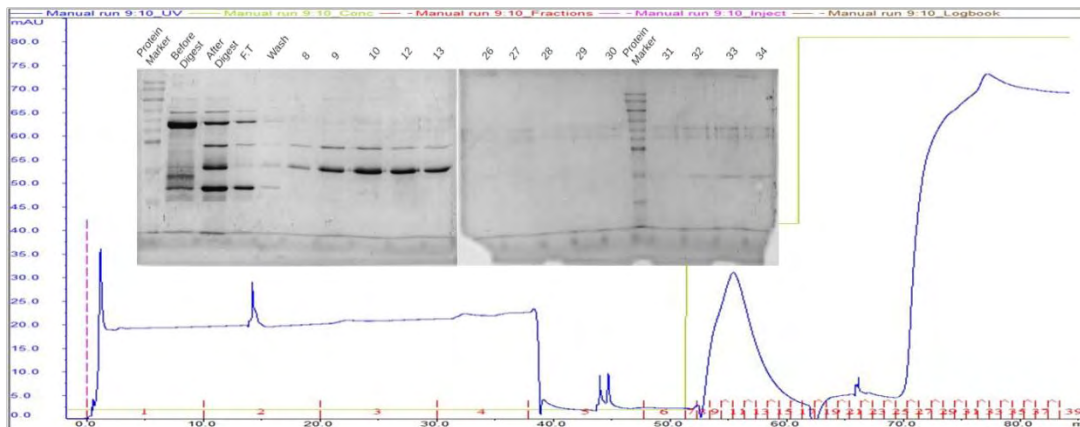
### 5.1 Απομόνωση της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Στήλη GST



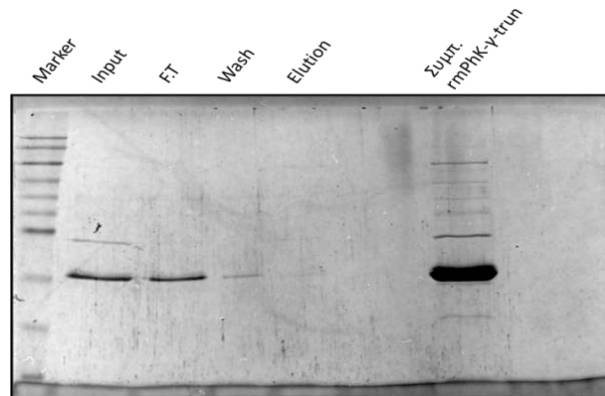
**Εικόνα9** : Στήλη δέσμευσης GST: Χρωματογράφημα και αποτελέσματα από το SDS-PAGE: Total: δείγμα πριν από την λύση των κυττάρων , Ένθετο: δείγμα μετά τη λύση των κυττάρων . FlowThrough και Wash : το υλικό που δεν δένεται στην στήλη. Οι υπόλοιπες διαδρομές είναι από την έκλουση της κινάσης, τα νούμερα συμβολίζουν τους δοκιμαστικούς σωλήνες που συλλέχθηκε η πρωτεΐνη κατά την χρωματογραφία

### Στήλη Cibacron Blue



**Εικόνα 10:** Cibacron Blue: Χρωματογραφία και αποτελέσματα από SDS-page οι συμβολισμοί όπως και προηγουμένως, οι διαδρομές before και after digest είναι από δείγματα που πάρθηκαν πριν και μετά την πέψη με πρωτεάση 3C αντιστοίχως.

## Στήλη GST-αφαιρετική



**Εικόνα 11:** Αφαιρετική στήλη GST: Αποτελέσματα από SDS-PAGE. Ένθετο: δείγμα μετά την στήλη cibacron, Στο FT και στο Wash βρίσκεται η καθαρή πλέον πρωτεΐνη. Στην τελευταία διαδρομή: δείγμα της πρωτεΐνης μετά τη συμπύκνωση

### 5.2 Προσδιορισμός της σταθεράς $K_m$

Η γραφική παράσταση *Michaelis-Menten*, της ταχύτητας ( $v$ ) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων  $[S]$  οδηγεί σε ορθογώνια υπερβολή. Η σταθερά *Michaelis-Menten* υπολογίζεται με τη μέθοδο των Lineweaver-Burk, που είναι γνωστή και σαν μέθοδος του διπλού αντιστρόφου. Όπως προαναφέρθηκε η εξίσωση *Michaelis-Menten* είναι η εξής:  $v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$

Εάν η παραπάνω σχέση γραφτεί με τη μορφή διπλού αντιστρόφου τότε η σχέση μετατρέπεται ως εξής:

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

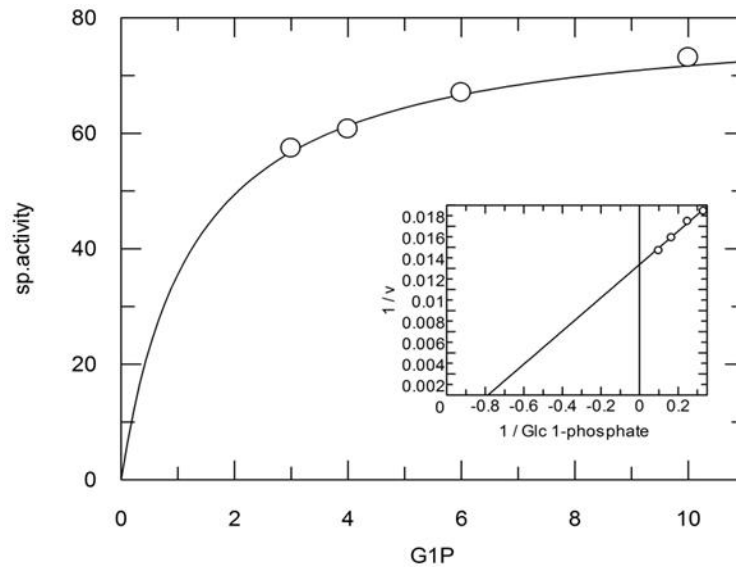
Εάν παρασταθούν γραφικά οι τιμές  $1/v$  και  $1/[S]$ , στον άξονα των τεταγμένων και στον άξονα των τετημένων αντιστοίχως, τότε λαμβάνεται η γραφική παράσταση των Lineweaver-Burk η οποία φαίνεται εσωτερικά του διαγράμματος 1. Η κλίση της ευθείας ισούται με  $K_m/V_{max}$ , το σημείο στο οποίο η ευθεία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων ισούται με  $1/V_{max}$  και το σημείο στο οποίο τέμνει τον άξονα των τετημένων ισούται με  $-1/K_M$ . (Δ.Α.Κυριακίδης).

Οι τιμές που πάρθηκαν από την πειραματική διαδικασία ήταν οι ακόλουθες

$$K_m = 1.3 \pm 0.2 \text{ mM}$$

$$V_{max} = 80.8 \pm 3.3 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$$

Καθώς και η γραφική παράσταση:



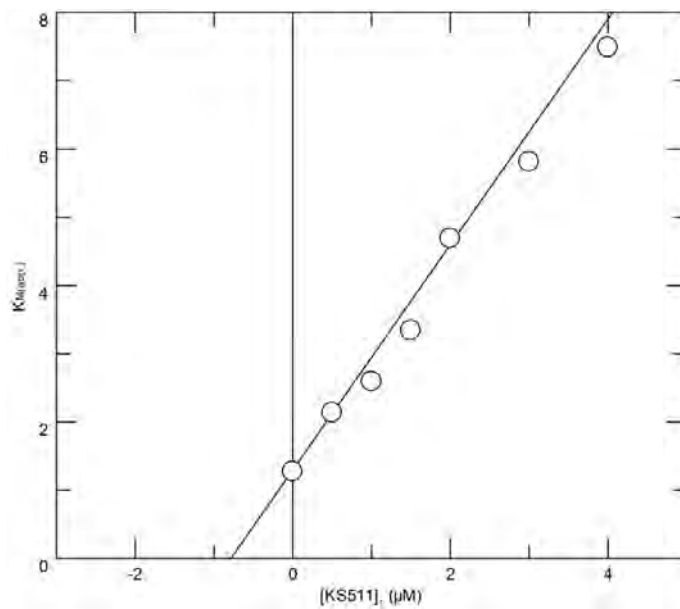
**Διάγραμμα 1:** Γραφική παράσταση Michaelis-Menten της ταχύτητας ( $v$ ) ως προς την 1-φωσφορική γλυκόζη. Εσωτερικά του διαγράμματος παρουσιάζεται το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (Lineweaver-Burk),  $1/v$  ως προς  $1/G1-P$

### 5.3 Προσδιορισμός των σταθερών $K_i$

Όπως προαναφέρθηκε, για τον υπολογισμό της  $K_i$  ενός αναστολέα, είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός των  $K_{m(app)}$  για διάφορες συγκεντρώσεις του αναστολέα. Η  $K_i$  μπορεί να υπολογιστεί από την γραφική παράσταση της σχέσης των  $K_{m(app)}$  σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του αναστολέα, καθώς το σημείο όπου η ευθεία τέμνει τον άξονα των τετμημένων, δίνει την τιμή της  $K_i$ .

Για τον **KS511** προσδιορίστηκε:

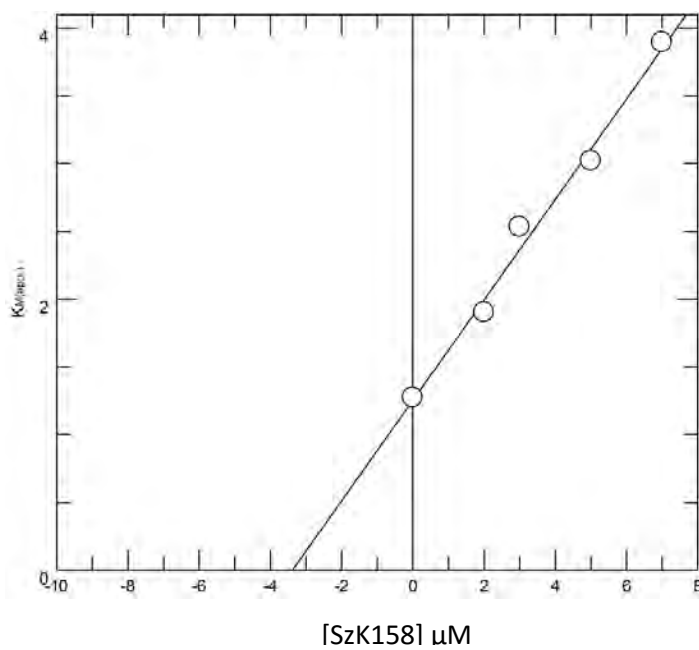
$$K_i = 0.95 \pm 0.07 \mu\text{M}$$



**Διάγραμμα 2:** Διάγραμμα της  $K_{mapp}$  ως προς την συγκέντρωση του αναστολέα KS511.

Για τον **SzK158** προσδιορίστηκε:

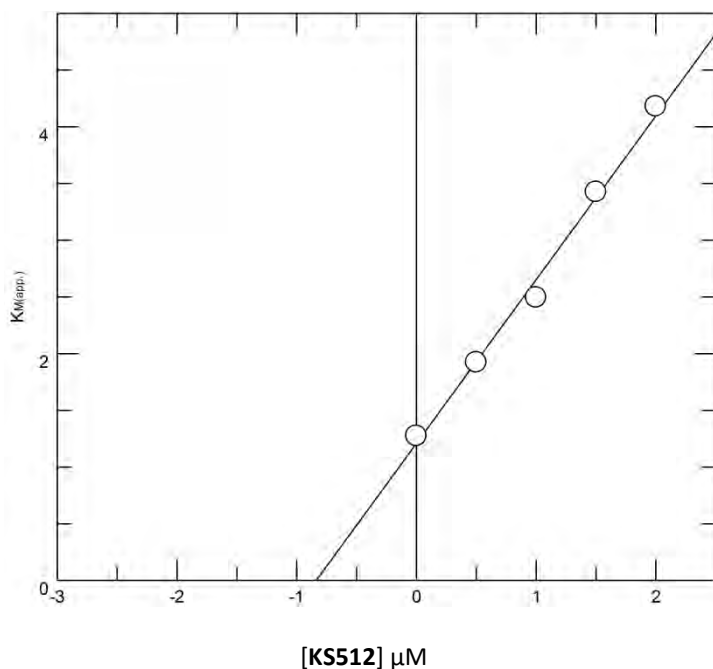
$$K_i = 3.38 \pm 0.28 \mu\text{M}$$



**Διάγραμμα 3 :** Διάγραμμα της  $K_{mapp}$  ως προς την συγκέντρωση του αναστολέα **SzK158**

Τέλος για τον **KS512** προσδιορίστηκε:

$$K_i = 0.84 \pm 0.07 \mu\text{M}$$



**Διάγραμμα 4:** Διάγραμμα της  $K_{\text{mapp}}$  ως προς την συγκέντρωση του αναστολέα **KS512**

## 6. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II είναι μια χρόνια μεταβολική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, αντίσταση στην ινσουλίνη και σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης. Η αύξηση στο ποσοστό των ατόμων που πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου II έχει καταστήσει αναγκαία την εύρεση νέων φαρμάκων, τα οποία θα είναι αποτελεσματικότερα σε σχέση με τα υπάρχοντα. Μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμησή της συγκεκριμένης νόσου, είναι η μείωση της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ, μέσω αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι καθοριστικό ένζυμο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου καθώς καταλύει το πρώτο βήμα του καταβολισμού του γλυκογόνου, δηλαδή την φωσφορολυτική του διάσπαση. Για το λόγο αυτό η



φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένας υποσχόμενος στόχος για τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων έναντι του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II.

Με σκοπό την εύρεση νέων ενώσεων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν έναντι του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2, στην παρούσα διπλωματική εργασία, αξιολογήθηκε η ανασταλτική ικανότητα με κινητικές μελέτες τριών αναλόγων γλυκόζης στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου *a*. Προηγήθηκε απομόνωση της καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από μετασχηματισμένα βακτηριακά στελέχη *E.coli* και χρήση της, για φωσφορυλίωση της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b*, που είχε απομονωθεί από σκελετικούς μύες κονίκλων, με σκοπό τη μετατροπή της από την μορφή *b* στην ενεργό μορφή *a*.

Οι τρεις υπό μελέτη ενώσεις που συντέθηκαν στο εργαστήριο του καθηγητή *Somsák László*, στο Πανεπιστήμιο του Debrecen της Ουγγαρίας (**KS511**, **SzK158** **KS512**) αναστέλλουν συναγωνιστικά ως προς το υπόστρωμα 1-φωσφορική γλυκόζη την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Οι τρεις αναστολές διαφέρουν δομικά μόνο ως προς την προσθετική τους ομάδα. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι αναστολές με τους αντίστοιχους υποκαταστάτες καθώς και οι τιμές της σταθεράς αναστολής του κάθε αναστολέα:

Αναστολές	Υποκαταστάτης	$K_i$
<b>KS512</b>	φλουορένιο	$0.84 \pm 0.07 \mu\text{M}$
<b>KS511</b>	Ναφθαλενικό οξύ	$3.38 \pm 0.28 \mu\text{M}$
<b>SzK158</b>	Ναφθαλένιο	$0.95 \pm 0.07 \mu\text{M}$

Σύμφωνα με τις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την δράση των τριών αναστολέων και σε συνάρτηση με τα αποτελέσματά τους, προκύπτει ότι από τους τρεις αναστολές ο πλέον βιοδραστικός είναι ο **KS512** μιας και εμφανίζει τη μικρότερη  $K_i$ . Αυτό δηλώνει ότι ο αναστολέας **KS512** έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου από τους υπόλοιπους. Πιο αναλυτικά ισχύει πως:

$$K_i \text{ KS512} < K_i \text{ KS511} < K_i \text{ SzK158.}$$

Από τις διαφορές στις τιμές της σταθεράς αναστολής φαίνεται πως οι προσθετικές ομάδες των αναστολέων παίζουν κάποιο ρόλο στην αναγνώριση και τη σύνδεση των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο. Επιπλέον από τις τιμές των  $K_i$  προκύπτει πως ενώσεις με υποκαταστάτες το φλουορένιο είναι πιο ισχυροί αναστολές από αυτές με υποκαταστάτες ναφθαλενίου και ναφθαλενικού οξέος, ακολούθως το

ναφθαλενικό οξύ είναι πιο αποτελεσματικός υποκαταστάτης σε σχέση με το ναφθαλένιο.

Περαιτέρω μελέτες με τον **KS512** *in vivo* και *in vitro* στο ανθρώπινο ηπατικό ένζυμο θα αναδείξουν την χρησιμότητα του αναστολέα για φαρμακευτική δράση ενώ κρυσταλλογραφικές μελέτες θα βοηθήσουν στη διαλεύκανση της σύνδεσης του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο αλλά στην ανάλυση των αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*), που οδηγούν σε αυτήν την αναστολή.

## Βιβλιογραφία

1. **Catalytic Site of Glycogen Phosphorylase: Structure of the T State and Specificity for  $\alpha$ -D-Glucose** - Stephen R. Sprang, Elizabeth J. Goldsmith, Robert J. Fletterick, Stephen G. Withers, and Neil B. Madsen , Biochemistry 1982, 21, 5364-5371
2. **Structural Mechanism for Glycogen Phosphorylase Control by Phosphorylation and AMP** D. Barford, S.-H. Hu and L. N. Johnson (J. Mol. Biol. (1991) 218, 233-260)
3. **Glycogen Phosphorylase Structures and Function**- Robert J. Fletterick and Stephen R. Sprang , Acc. Chem. Res. 1982, 15, 361-369
4. **Structure of Glycogen Phosphorylase  $\alpha$  at 3.0 Å resolution and Its Ligand Binding Sites at 6Å**- R. J. Fletterick , J. Sygusch, H. Semple, N.B Madsen (1976)
5. **On the nature of allosteric transitions: a plausible model**- J.Monod , J. Wyman and J. Changeux , 1965 , J.Mol. Biol. (1965) 12, 88-118
6. **Ενζυμολογία**- Ι.Γ Γεωργατσός , Τ.Α Γιουψυχάνης , Δ.Α Κυριακίδης ,(2001)
7. **New Therapeutic Strategies for Type 2 Diabetes- Small Molecule Approaches** - Rob M. Jones, David E. Thurston, David Rotella, Salvatore Guccione, Ana Martinez -Royal Society of Chemistry, 2012
8. **Allosteric inhibition of glycogen phosphorylase  $\alpha$  by the potential antidiabetic drug 3-isopropyl-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate** – N.G. Oikonomakos, K. Tsitsanou, S. Zographos, V. Skamnaki, S. Goldmann ,and H. Bischoff.- Protein Science 1999, 1930–1945
9. **Traditional Medicines for Modern Times: Antidiabetic Plants**- Kurukulasuriya et al, 2003
10. **Assay of Inorganic Phosphate in the Mild pH Range, Suitable for Measurement of Glycogen Phosphorylase Activity**- SHUICHI SAHEKI, AKIRA TAKEDA, AND TARASHI SHIMAZU - ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 148, 277-281 (1985)

- 11. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach-** B. D. Hames (1988)
- 12. Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - Part A: Fundamentals and techniques-** E. Heftmann , Journal of chromatography library - Volume 69A , (2004)
- 13. Strategies for Protein Purification Handbook-** GE healthcare
- 14. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding-** Bradford M. M., Anal. Biochem (1976). 72, 248–254.
- 15. Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase -** Leonidas et al 2014