

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης το οποίο αποτελεί μια αποθήκη ενέργειας για τον οργανισμό. Σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (ΣΔ2) έχει βρεθεί ότι η ρύθμιση της γλυκογονόλυσης είναι ανεπαρκής με συνέπεια την αύξηση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα. Έτσι, έχει προταθεί τα ένζυμα του μεταβολισμού του γλυκογόνου να αποτελέσουν μοριακούς στόχους για την εύρεση φαρμάκων για τον ΣΔ2. Ο καταβολισμός του γλυκογόνου γίνεται με τη συντονισμένη δράση δύο ενζύμων, της φωσφοφυλάξης του γλυκογόνου (*GP*) και του ενζύμου αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου (*GDE*). Η *GP* καταλύει τη σταδιακή απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από το μακρομόριο του γλυκογόνου μέχρι ένα σημείο διακλάδωσης, το οποίο διασπά το *GDE* ώστε να μπορέσει η *GP* να συνεχίσει τη δράση της.

Η *GP* βρίσκεται στο κέντρο του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού ενώσεων οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την φαρμακευτική αντιμετώπιση του ΣΔ2. Ανάμεσα στα κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου, το καταλυτικό είναι αυτό που έχει μελετηθεί περισσότερο, κυρίως με ανάλογα γλυκόζης, ενώ λίγα είναι γνωστά για τις ιδιότητες του κέντρου αναστολής. Στη διδακτορική διατριβή μελετήσαμε 4 διαφορετικές κατηγορίες αναλόγων γλυκόζης στοχεύοντας το καταλυτικό κέντρο και μια κατηγορία αναλόγων χρυσίνης στοχεύοντας το κέντρο αναστολής. Στην πρώτη κατηγορία αναλόγων γλυκόζης, μελετήσαμε τα (*S*) και (*R*) επιμερή γλυκοπυρανοσιλιδενο-σπείρο-ιμιδαζολινονών ως αναστολείς της *hIGP*. Βρέθηκε ότι τα (*R*) σπείρο-επιμερή ήταν πιο ισχυροί αναστολείς από τα αντίστοιχα (*S*) και ο πιο ισχυρός αναστολέας ήταν ο **30** ($K_i = 1.72 \mu M$) ο οποίος διέθετε μια ομάδα 2-ναφθαλενίου. Κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων-Χ έδειξαν ότι μόνο τα (*R*) επιμερή προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο της *GP*. Επιπλέον, οι πληροφορίες από τις δομές έδωσαν μια εξήγηση για τις διαφορές στην ισχύ της αναστολής συγκριτικά με άλλες σπείρο-κυκλικές ενώσεις. Στη δεύτερη κατηγορία αναλόγων γλυκόζης, μελετήσαμε ανάλογα *C*- β -*D*-γλυκοπυρανόσυλο -θειαζολών, -ιμιδαζολών και μιας *N*- β -*D* γλυκοπυρανόσυλο-τετραζόλης ως αναστολείς της *hIGP*. Ο πιο ισχυρός αναστολέας ήταν η *C*- β -*D*-γλυκοπυρανόσυλο-ιμιδαζόλη **9** ($K_i = 3.2 \mu M$) η οποία είχε ως υποκαταστάτη στον ιμιδαζολικό δακτύλιο μια 2-ναφθαλενομάδα. Οι γλυκοπυρανόσυλο-θειαζόλες βρέθηκαν να είναι ασθενέστεροι αναστολείς από τις αντίστοιχες γλυκοπυρανόσυλο-ιμιδαζόλες ενώ η *N*- β -*D* γλυκοπυρανόσυλο-τετραζόλη ήταν ο πλέον ασθενέστερος αναστολέας από αυτή τη κατηγορία ενώσεων. Η εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ ανέδειξε τη σημασία του δεσμού υδρογόνου μεταξύ του

δακτυλίου του ιμιδαζολίου και του οξυγόνου του καρβονυλίου της κύριας αλυσίδας της His377. Στην τρίτη κατηγορία ενώσεων, μελετήθηκαν ανάλογα C-β-γλυκοσάμινιλ-τριαζόλης ως αναστολείς της *hIGPa*. Οι ενώσεις αυτές είχαν τροποποιημένο το δακτύλιο της γλυκοπυρανόζης καθώς η ομάδα -OH στη θέση 2' είχε αντικατασταθεί από μια ομάδα -NH₂ (γλυκοζαμίνες). Ο πιο ισχυρός αναστολέας ήταν ο **29b** ($K_i = 7.6 \mu M$) ο οποίος έφερε ως υποκαταστάτη μια ομάδα 2-ναφθαλενίου και κατατάσσεται μέσα στις πέντε πιο ισχυρές ενώσεις ως προς την GP με τροποποιημένο δακτύλιο γλυκοπυρανόζης που προσδένονται στο καταλυτικό της κέντρο. Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι η αντικατάσταση της ομάδας 2' -OH της γλυκοπυρανόζης από -NH₂ αν και έχει μια αρνητική επίδραση στη σταθερά αναστολής, οι νέες ενώσεις εξακολουθούσαν να είναι αρκετά ισχυροί αναστολείς της GP, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες. Στην τέταρτη κατηγορία ενώσεων, μελετήσαμε τις ιδιότητες της β-εσοχής του καταλυτικού κέντρου της GP μέσω της σύνδεσης C-β-D-γλυκοπυρανόσουλ-τριαζολικών ενώσεων. Ο πιο ισχυρός αναστολέας ήταν ο **CK900** ($K_i = 427 nM$) και η εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X έδειξε ότι οι ενώσεις βρέθηκαν προσδεμένες στο καταλυτικό κέντρο της GP. Η ανάλυση των δομών των συμπλόκων ανέδειξε τις υδρόφοβες και υδρόφιλες περιοχές, των οποίων οι αλληλεπιδράσεις με τους αναστολείς μπορούν να αυξήσουν ή να εξασθενίσουν την ισχύ τους. Τέλος, μελετήσαμε το κέντρο αναστολής της GP μέσα από τη σύνδεση σε αυτό αναλόγων χρυσίνης. ($K_i = 7.6 \mu M$). Κινητικές μελέτες έδειξαν ο πιο ισχυρός αναστολέας ήταν ο **43** ($K_i = 1.0 \mu M$) ο οποίος εμφανίζεται σχεδόν ισοδύναμος με τη φλαβοπιριδόλη, τον πιο ισχυρό αναστολέα για το κέντρο αναστολής της GP. Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν την πρόσδεση των αναστολέων στο κέντρο αναστολής του ενζύμου και προσέφεραν τις πληροφορίες για τα επόμενα βήματα στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων.

Εκτός από τη GP μελετήσαμε και το ανθρώπινο GDE (*hGDE*) για το οποίο δεν υπάρχει αναφορά στη βιβλιογραφία για παραγωγή του στο *E. coli*. Η μόνη διαθέσιμη κρυσταλλική δομή για ευκαρυωτικό GDE προέρχεται από τον οργανισμό *Candida glabrata* (*CgGDE*). Έγιναν δοκιμές παραγωγής και αναδίπλωσης της πρωτεΐνης στο περίπλασμα και στο κυτταρόπλασμα του *E. coli*. Σε ό,τι αφορά το περίπλασμα, έγιναν προσπάθειες αναδίπλωσης του *hGDE* σε αυτό το χώρο αλλά οι ποσότητες που παρήχθησαν δεν ήταν επαρκής για δομικές μελέτες. Σε ό,τι αφορά το κυτταρόπλασμα, έγιναν δοκιμές παραγωγής του *hGDE* σε διαφορετικά στελέχη *E. coli* με χρήση διαφορετικών διαλυμάτων λύσης, χωρίς να παρατηρηθεί παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης. Συν-έκφραση με μοριακές συνοδούς οδήγησε σε παραγωγή ικανοποιητικών

ποσοτήτων διαλυτού *hGDE* το οποίο απομονώθηκε σε υψηλή βιοχημική καθαρότητα. Επιπλέον, επετεύχθη ο διαχωρισμός της δραστικής από τη μη δραστική πρωτεΐνη μέσω ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών. Η χρήση της μοριακής συνοδού *trigger factor* οδήγησε σε μεγάλη παραγωγή διαλυτού *hGDE*, αλλά η χρήση των μοριακών συνοδών *GroES/EL* οδήγησε σε παραγωγή λιγότερης αλλά πιο δραστικής πρωτεΐνης. Κινητικές μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο ακολουθεί κινητική *Michaelis-Menten* και παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασία 37 °C σε pH 6.0. Τέλος, κρύσταλλοι του *hGDE* φαίνεται να αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 16 °C σε δύο συνθήκες (0.1 M *Tris-HCl* pH 8.8, 10 % w/v *PEG4000* και 0.1 M *Hepes-NaOH* pH 7.5, 12 % w/v *PEG8000*). Εκτός από το *hGDE*, απομονώσαμε το *CgGDE* με χρήση στήλης συγγένειας β -*CD sepharose 6B* και το κρυσταλλώσαμε σε μια καινούρια συνθήκη που δεν έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία. Σε περίπτωση που οι κρύσταλλοι του *hGDE* δεν περιθλούν ικανοποιητικά τις ακτίνες-X, τότε κρύσταλλοι του *CgGDE* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση του τρόπου πρόσδεσης αναστολέων στο ένζυμο εφαρμόζοντας κινητικές μελέτες και στα δύο ένζυμα για λόγους σύγκρισης.