

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2) είναι μια σοβαρή απειλή για την παγκόσμια υγεία, ενώ αποτελεί ένα τεράστιο κοινωνικό και οικονομικό πρόβλημα για τις αναπτυσσόμενες και αναπτυσσόμενες χώρες. Τα φάρμακα που σχετίζονται με τη θεραπεία της διαταραχής συνδέονται με πολλές αρνητικές παρενέργειες μεταξύ των οποίων και ο κίνδυνος της υπογλυκαιμίας. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ελέγχεται από ένα πλήθος ενζύμων με πολύπλοκο και δυναμικό τρόπο. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) και η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) είναι δύο ένζυμα με κρίσιμο ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής μελετήθηκε η σχέση δομής-δράσης των δύο αυτών ενζύμων με απώτερο στόχο την εκμετάλλευση της παραγόμενης γνώσης στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών μέσων για το ΣΔ2. Η GP αποτελεί έναν επικυρωμένο στόχο για την ανακάλυψη αντι-υπεργλυκαιμικών παραγόντων για ασθενείς με ΣΔ2. Στο πρώτο μέρος της διατριβής αξιολογήθηκε η ανασταλτική δράση στη GP, πολυφαινολικών εκχυλισμάτων 19 παραπροϊόντων βιομηχανικής χυμοποίησης ροδιού (*Punica Granatum*) και 23 φυτών της οικογένειας *Rosaceae*. Τα πλέον ισχυρά ανασταλτικά εκχυλίσματα εμφάνισαν τιμές IC<sub>50</sub> χαμηλότερες από 10 μg/mL. Με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας συγγένειας προσδιορίστηκαν τα πλέον βιοδραστικά μόρια των εκχυλισμάτων. Για τα εκχυλίσματα από τα παραπροϊόντα βιομηχανικής χυμοποίησης ροδιού τα πλέον βιοδραστικά μόρια ήταν το ελλαγικό και το χλωρογενικό οξύ που βρέθηκαν συνδεδεμένα στο κέντρο αναστολής και στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, αντίστοιχα. Για τα εκχυλίσματα των *Rosaceae* τα πλέον βιοδραστικά μόρια ήταν η γλυκόζη, το ελλαγικό, το γαλλικό και το χλωρογενικό οξύ τα οποία βρέθηκαν συνδεδεμένα στο καταλυτικό κέντρο, στο κέντρο αναστολής και στο νέο αλλοστερικό κέντρο, αντίστοιχα. Η σύνδεση του χλωρογενικού οξέος στην GP παρατηρήθηκε για πρώτη φορά και η δομική ανάλυση του συμπλόκου GP-χλωρογενικού οξέος στον κρύσταλλο, οδήγησε στη αποκάλυψη της δομικής βάσης της ανασταλτικής του δραστηριότητας. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει τη χρησιμότητα φυτικών εκχυλισμάτων στην παραγωγή βιολειτουργικών προϊόντων διατροφής και τα αποτελέσματα των μελετών της παρούσας διατριβής αποτελούν ένα σημαντικό βήμα για το σχεδιασμό νέων βιολειτουργικών προϊόντων για ασθενείς με ΣΔ2. Η PhK ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση b και τη μετατρέπει σε φωσφορυλάση a. Το ένζυμο είναι μία από τις πιο πολύπλοκες πρωτεϊνικές κινάσες, αποτελούμενη από τέσσερις υπομονάδες (α, β, γ και δ) με στοιχειομετρία δεκαεξαμερούς (αβγδ)<sub>4</sub> και μοριακό βάρος 1,3 MDa. Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες των υπομονάδων γ και α της PhK. Διεξήχθησαν μελέτες έκφρασης της κολοβωμένης ανθρώπινης ηπατικής υπομονάδας γ της PhK, σε βακτηριακά στελέχη *E. coli* και στη συνέχεια απομόνωσή της μέσω διαφόρων μεθόδων χρωματογραφίας. Ακολούθησαν δοκιμές κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης. Η 12 δεύτερη υπομονάδα που μελετήθηκε ήταν η α από την ανθρώπινη μυϊκή PhK. Αρχικά έγιναν μελέτες βελτιστοποίησης του γονιδίου με σκοπό την έκφρασή της στο βακτηριακό σύστημα *E.coli*. Το γονίδιο που ενισχύθηκε εισήχθη στο φορέα pETM11. Για την επιτυχή έκφρασή της στο διαλυτό κλάσμα, χρησιμοποιήθηκε ο μοριακός συνόδος Trigger Factor. Στη συνέχεια ακολούθησε χρωματογραφικός καθαρισμός της, και βιοφυσικές μελέτες με σκοπό τον προσδιορισμό της κατάστασης

ολιγομερισμού (πειράματα DLS), πειράματα προσδιορισμού του βαθμού αναδίπλωσης και ποσοτικοποίησης των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής της (πειράματα CD), ενώ τέλος έγινε ανάλυση της ομοιογένειας και της καθαρότητας του δείγματος μέσω πειραμάτων αρνητικής χρώσης EM (negative stain EM).