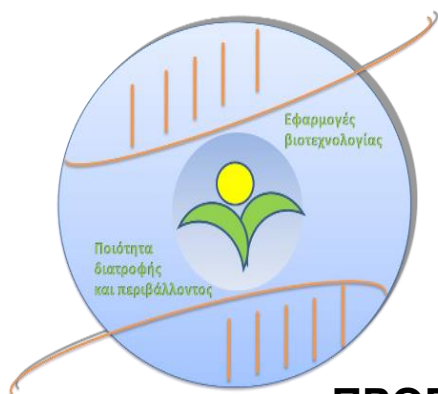




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ –
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ
ΦΥΣΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**

ΔΕΡΜΙΤΖΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2024

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ
ΦΥΣΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**

**ASSESSMENT OF BIOACTIVITY OF EXTRACTS FROM
NATURAL SOURCES WITH POTENTIAL THERAPEUTIC
EFFECTS**

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Ονοματεπώνυμο φοιτητή: Δερμιτζάκης Νικόλαος

Επιβλέπων Καθηγητής: Σκαμνάκη Βασιλική

Εργαστήριο: Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σκαμνάκη Βασιλική: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Λεωνίδας Δημήτριος: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Άννα-Μαρία Ψαρρά: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Γλυκογόνο και Μεταβολισμός	8
1.1.1 GLUTs: Μεταφορείς της Γλυκόζης	9
1.1.2 Ινσουλίνη και Γλυκαγόνη.....	9
1.1.3 Γλυκογόνο : Βιοσύνθεση.....	10
1.1.4 Γλυκογόνο : Αποδόμηση.....	11
1.2 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase, GP)	11
1.2.1 Ηπατική φωσφορυλάση.....	13
1.2.1 Μυϊκή Φωσφορυλάση.....	13
1.2.2 Φωσφορυλάση του εγκεφάλου	15
1.2.3 Η συμμετοχή της φωσφορικής πυριδοξάλης	15
1.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου: Δομή.....	15
1.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου: Φαρμακευτικός στόχος.....	17
1.5 Χρήση Φυτικών Προϊόντων	18
1.5.1 Φυτικές Πηγές	19
1.5.2 Μανιτάρια.....	20
1.5.3 Μέθοδοι εκχύλισης	21
1.5.4 Ανθοκυανίνες.....	22
1.5.5 Φαινολικά.....	23
1.6 Κρυσταλλογραφία ακτίνων X	23
1.6.1 Μέθοδος soaking	25
1.7 Σκοπός	25

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1 Βιοπληροφορικά προγράμματα	26
2.2 Ενώσεις	28
2.3 Κινητικές Μελέτες Ενώσεων	29
2.3.1 Προσδιορισμός της τιμής IC ₅₀ των ενώσεων	29
2.3.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός παραγόμενων φωσφορικών ιόντων.....	32
2.3.3 Ανάλυση Αποτελεσμάτων των Κινητικών Πειραμάτων	33
2.4 Τεχνικές Κυτταροκαλλιιεργειών	33
2.4.1 Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας MTT	35
2.4.2 Καλλιέργεια κυττάρων για κινητική μελέτη των εκχυλισμάτων έναντι της hGPb	36
2.5 Τεχνικές εκτός θαλάμου κυτταροκαλλιιεργειών - Αναλυτικές Μέθοδοι	37
2.5.1 Harvest - Συλλογή κυττάρων.....	37
2.5.2 Κινητικό πείραμα ex vivo των εκχυλισμάτων έναντι της hGPb	38
2.6 Κρυσταλλογραφικές Μελέτες	38
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	55

Περίληψη

Το γλυκογόνο αποθηκεύεται κυρίως ως γλυκόζη και διασπάτε μέσω της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του σε 1-φωσφορική γλυκόζη. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αύξηση των μεταβολικών διαταραχών, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), μια διαταραχή στην οποία παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης από τα φυσιολογικά στο αίμα μια κατάσταση που προκαλείτε από μείωση της παραγωγής της ινσουλίνης από το σώμα ή στη μειωμένη ανταπόκριση των κυττάρων σε αυτή. Για τον λόγο αυτό, το ένζυμο της φωσφορυλάσης έχει αναδειχθεί ως στόχος για την δημιουργία νέων αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων. Υπάρχουν δύο τύποι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αυτή της ενεργής μορφής που είναι φωσφορυλιωμένη (GP_a) και η μη (GP_b) που είναι ανενεργή μορφή. Οι μορφές αυτές εναλλάσσονται μεταξύ της ενεργούς και χαλαρής διαμόρφωσης R και της λιγότερο ενεργής κατάστασης T. Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα φυσικά προϊόντα με σκοπό την ανάπτυξη αντιγλυκαιμικών φαρμάκων. Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, διερευνήθηκε η βιοδραστικότητα εκχυλισμάτων από φυτά της οικογένειας *Asparagaceae* και από μανιτάρια. Πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της τιμής IC₅₀ της βιοδραστικής ένωσης έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *ex vivo* πειράματα. Επιπλέον, μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης σε κρυσταλλογραφικά δεδομένα της rmGP_b, προσδιορίστηκε ο τρόπος πρόσδεσης των ενώσεων στη φωσφορυλάση από μυσ κονίκλων.

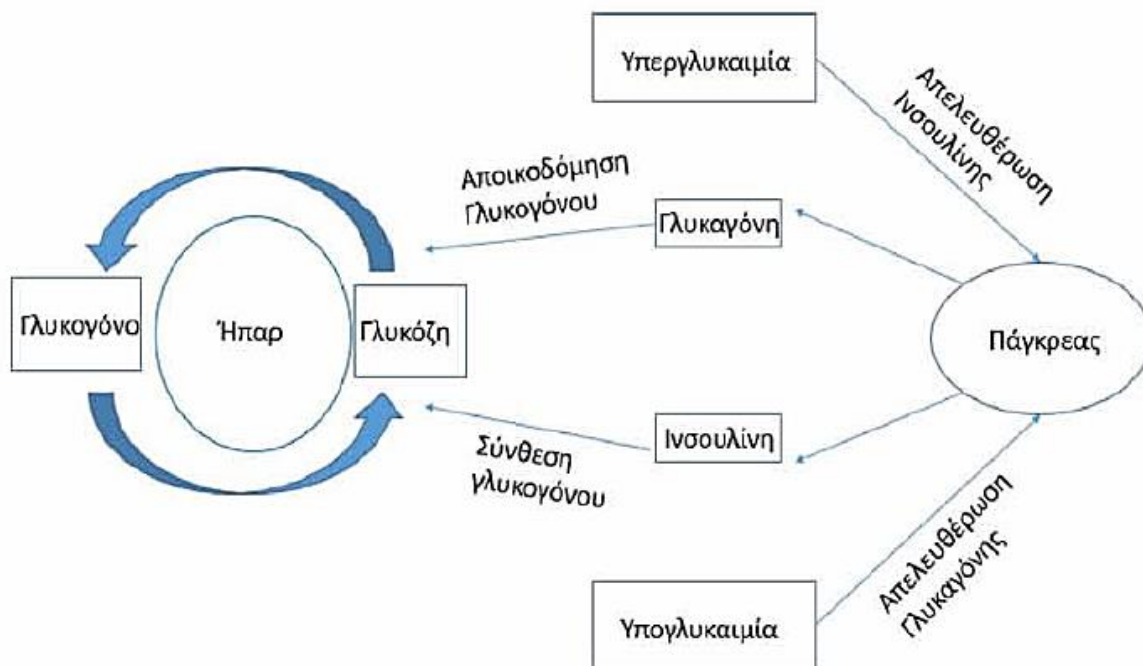
Abstract

Glucose is primarily stored as glycogen and is broken down by glycogen phosphorylase into glucose-1-phosphate. In recent years, there has been an increase in metabolic disorders, such as diabetes mellitus (DM), a condition characterized by higher than normal blood glucose levels, caused either by reduced insulin production or by decreased cellular responsiveness to insulin (insulin resistance). Hence, glycogen phosphorylase (GP) has emerged as a target for the development of new antihyperglycemic drugs. There are two forms of glycogen phosphorylase: the active phosphorylated form (GP_a) and the inactive form (GP_b). These forms alternate between the active, relaxed R state and the less active T state. There is growing interest in natural products for the development of antihyperglycemic drugs. In this study, the bioactivity of extracts from plants of the Asparagaceae family and mushrooms was investigated. Kinetic studies were performed to determine the IC₅₀ value of the bioactive compound against glycogen phosphorylase in both in vitro and ex vivo experiments. Additionally, bioinformatic analysis of crystallographic data of rmGP_b was conducted to determine the binding mode of the compounds to muscle glycogen phosphorylase.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γλυκογόνο και Μεταβολισμός

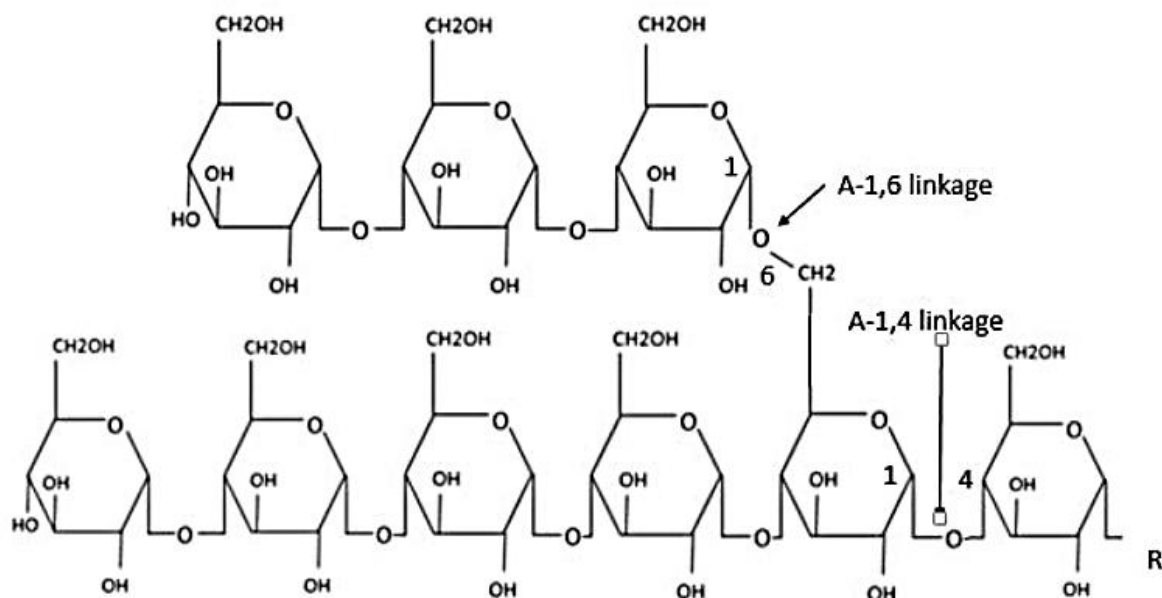
Το γλυκογόνο όντας η κύρια μορφή αποθήκευσης γλυκόζης στα κύτταρα, χρησιμοποιείται σε περιόδους έλλειψης γλυκόζης για την κάλυψη των αναγκών σε ενέργεια του οργανισμού. Η ανακάλυψη της έγινε από τον Claude Bernard, και αποτελείται από μακρομόρια γλυκόζης συνδεδεμένα με α -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς στις γραμμικές αλυσίδες και α -1,6-γλυκοζιτικούς δεσμούς στις διακλαδώσεις, οι οποίες εμφανίζονται ανά δέκα κατάλοιπα. Αυτή η δομή επιτρέπει τη γρήγορη απελευθέρωση γλυκόζης. Εκτός από τα ζώα, το γλυκογόνο βρίσκεται επίσης σε βακτήρια και αρχαία, ενώ στα φυτά υπάρχει το συναφές άμυλο. Ωστόσο δεν είναι τόσο ενεργειακά πλούσιο όσο τα λιπαρά οξέα. Αποθηκεύεται κυρίως στο ήπαρ για τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και στους μύες για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών τους, καθώς και στον εγκέφαλο. Εντοπίζεται επίσης σε μικρότερες ποσότητες σε άλλους ιστούς όπως ο λιπώδης ιστός και η καρδιά, αν και ο ρόλος του εκεί δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. [1], [2].



Εικόνα 1: Ο μηχανισμός ρύθμισης της ομοιόστασης της γλυκόζης [3].

Η διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα σε φυσιολογικά επίπεδα είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία του οργανισμού. Η σωστή ρύθμιση της γλυκόζης είναι κρίσιμη για την αποφυγή υπογλυκαιμίας, που μπορεί να προκαλέσει σύγχυση, λιποθυμία ή ακόμα και κώμα, καθώς και της υπεργλυκαιμίας, που μπορεί να οδηγήσει σε μακροπρόθεσμες επιπλοκές όπως καρδιαγγειακά προβλήματα, νεφρική ανεπάρκεια και νευροπάθεια, ιδίως σε διαβητικούς ασθενείς. Αυτή η ρύθμιση επιτυγχάνεται μέσω ενός σύνθετου συστήματος που περιλαμβάνει

ορμονικό και νευρικό έλεγχο, με τη συμμετοχή μορίων όπως οι νευροδιαβιβαστές και οι ορμόνες. Τα μόρια αυτά εκκρίνονται από διάφορα όργανα και ιστούς, όπως οι μύες, ο λιπώδης ιστός, ο εγκέφαλος, το ήπαρ, το πάγκρεας και το έντερο. Το πάγκρεας παίζει κεντρικό ρόλο στην ομοιοστάση της γλυκόζης μέσω της έκκρισης ινσουλίνης και γλυκαγόνης, οι οποίες έχουν αντίθετες δράσεις (εικόνα 1). [1].



Εικόνα 2: Δομή του γλυκογόνου [4]

1.1.1 GLUTs: Μεταφορείς της Γλυκόζης

Η γλυκόζη, ως βασική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα των θηλαστικών, εισάγεται στα κύτταρα μέσω διάχυσης που διαμεσολαβείτε από μέλη της οικογένειας μεταφορέων GLUT -Glucose Transporters (SLC2A). Οι πρωτεΐνες GLUT χωρίζονται σε τρεις τάξεις, καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει συγκεκριμένα μέλη με διακριτούς ρόλους και τοποθεσίες έκφρασης. Στον άνθρωπο, εκφράζονται δεκατέσσερις πρωτεΐνες GLUT, οι οποίες περιλαμβάνουν μεταφορείς για διάφορα υποστρώματα, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Οι πιο κοινές ισομορφές του μεταφορέα γλυκόζης, οι GLUT1-4, οι οποίες ανήκουν στην τάξη I, έχουν ξεχωριστές ρυθμιστικές ιδιότητες που αντικατοπτρίζουν τους ειδικούς τους ρόλους στην εύρυθμη κυτταρική λειτουργία και στην ομοιοστάση της γλυκόζης [5], [6].

1.1.2 Ινσουλίνη και Γλυκαγόνη

Η ινσουλίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες, την αλυσίδα A και την αλυσίδα B, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς και εκκρίνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Η έκκριση της ινσουλίνης διεγείρεται από την υπεργλυκαιμία και για να αρχίσουν οι επιδράσεις της στα κύτταρα στόχους, η ινσουλίνη

πρέπει πρώτα να συνδεθεί με έναν πρωτεϊνικό υποδοχέα που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτή η σύνδεση ενεργοποιεί τον υποδοχέα, προκαλώντας επακόλουθες επιδράσεις που επηρεάζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Η μεταφορά της γλυκόζης στα β-κύτταρα του παγκρέατος πραγματοποιείται μέσω των μεταφορέων γλυκόζης GLUT-2 [7]. Αφού εισέλθει μέσω του ενζύμου γλυκοκινάση φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη (Glucose 6-phosphate, G6P). Η παραγωγή ATP (Adenosine Triphosphate) γίνεται μέσω του περαιτέρω μεταβολισμού της G6P (Adenosine Triphosphate). Η ινσουλίνη ως βασική ορμόνη του μεταβολισμού εμποδίζει τη χρήση του λίπους ως πηγή ενέργειας, καταστέλλοντας την έκκριση γλυκαγόνης. Έτσι η γλυκόζη μειώνεται στο αίμα και εισέρχεται πιο εύκολα στα κύτταρα, προάγοντας έτσι την αποθήκευσή της σε γλυκογόνο στο ήπαρ και στους μύες. Παράλληλα καταστέλλει τη σύνθεση της γλυκόζης από το ήπαρ. Επίσης, διεγείρει την παραγωγή υδατανθράκων μέσω της γλυκόλυσης και της γλυκογένεσης καθώς και την πρωτεϊνοσύνθεση, αναστέλλοντας την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και την λιπογένεση, καθιστώντας την μακροπρόθεσμα μια αναβολική ορμόνη [7].

Αντίθετα, η γλυκαγόνη, η έκκριση της οποίας γίνεται από τα α-κύτταρα του παγκρέατος, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα προάγοντας τη διάσπαση του γλυκογόνου σε γλυκόζη στο ήπαρ και την απελευθέρωσή της στο αίμα. Η γλυκονεογένεση ενεργοποιείται από τη γλυκαγόνη επίσης, τη σύνθεση γλυκόζης δηλαδή από μη-υδατανθρακικές πηγές, όπως τα αμινοξέα. Η γλυκαγόνη διεγείρει την αδενυλική κυκλάση στη μεμβράνη των ηπατικών κυττάρων, οδηγώντας στο σχηματισμό κυκλικής AMP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A, η οποία ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης (PhK). Στη συνέχεια, αυτή η κινάση ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), ενισχύοντας τη διάσπαση του γλυκογόνου. Εκτός από την ινσουλίνη και τη γλυκαγόνη, υπάρχουν και άλλες ορμόνες υπεύθυνες για τη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης, όπως η αδρεναλίνη, η κορτιζόλη και οι ορμόνες του εντέρου όπως η GLP-1 και η GIP. Η αδρεναλίνη και η κορτιζόλη αυξάνουν τη γλυκόζη στο αίμα σε καταστάσεις στρες, ενεργοποιώντας τη διάσπαση του γλυκογόνου [8].

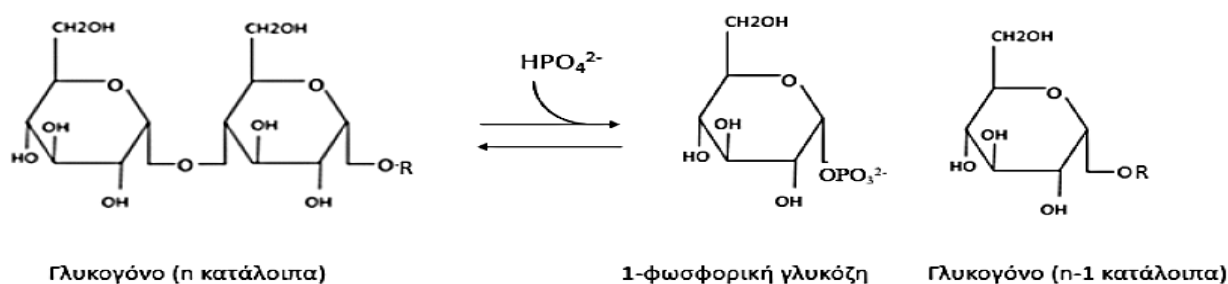
1.1.3 Γλυκογόνο : Βιοσύνθεση

Η σύνθεση του γλυκογόνου γίνεται στο κυτοσόλιο των κυττάρων, χρησιμοποιώντας την γλυκόζη που βρίσκεται στο εξωτερικό του κυττάρου και που εισέρχεται στο εσωτερικό μέσω ειδικών μεταφορέων ή μέσω ενός έμμεσου μονοπατιού, όπου το γαλακτικό οξύ και τα αμινοξέα μπορούν επίσης να αξιοποιηθούν. Το αρχικό στάδιο στη σύνθεση γλυκογόνου περιλαμβάνει την αυτογλυκοσυλίωση της γλυκογενίνης, μιας βασικής πρωτεΐνης που δημιουργεί μια πρόδρομη αλυσίδα ολιγοσακχαριτών. Ακολουθεί η επιμήκυνση της αλυσίδας μέσω της συνθάσης του γλυκογόνου (Glycogen Synthase, GS) προσθέτοντας μόρια γλυκόζης μέσω α-1,4 γλυκοσιδικών δεσμών, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ουριδινοφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη). Η UDP-γλυκόζη σχηματίζεται από τη γλυκόζη-1-φωσφορική και την τριφωσφορική ουριδίνη (UTP) υπό την επίδραση του ενζύμου πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης. Όταν η αλυσίδα γλυκόζης φτάσει σε περίπου 12 μόρια, το ένζυμο που ευθύνεται για

τη διακλάδωση του γλυκογόνου μεταφέρει μια ομάδα επτά μορίων γλυκόζης σε μια κοντινή αλυσίδα, σχηματίζοντας έναν α -1,6 γλυκοσιδικό δεσμό. Η συνθάση του γλυκογόνου στη συνέχεια επιμηκύνει την αλυσίδα, ενώ το ένζυμο διακλάδωσης συνεχίζει να δημιουργεί νέες διακλαδώσεις. [9] , [10].

1.1.4 Γλυκογόνο : Αποδόμηση

Λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα και στα λυσοσώματα, και είναι απαραίτητη η συνεργασία του διλειτουργικού ενζύμου αποδιακλάδωσης και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, με την τελευταία να διασπά τους α -1,4 δεσμούς ώστε να αφαιρέσει υπολείμματα γλυκόζης από την αλυσίδα του γλυκογόνου και να παράγει 1-φωσφορική γλυκόζη. Όταν απομένουν τέσσερα μόρια γλυκόζης πριν από μια διακλάδωση, το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου, μέσω της τρανσφεράσης, μετακινεί τρία από αυτά τα κατάλοιπα σε μια κοντινή αλυσίδα. Στη συνέχεια, η γλυκοσιδάση διασπά τον α -1,6 γλυκοσιδικό δεσμό, απελευθερώνοντας ένα μόριο ελεύθερης γλυκόζης από τη διακλάδωση. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου συνεχίζει τη διάσπαση των υπόλοιπων μορίων γλυκόζης από την ευθεία αλυσίδα, παράγοντας γλυκόζη-1-φωσφορική. Αυτή η γλυκόζη-1-φωσφορική μετατρέπεται σε γλυκόζη-6-φωσφορική, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε στη γλυκόλυση είτε στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών. [9], [10].

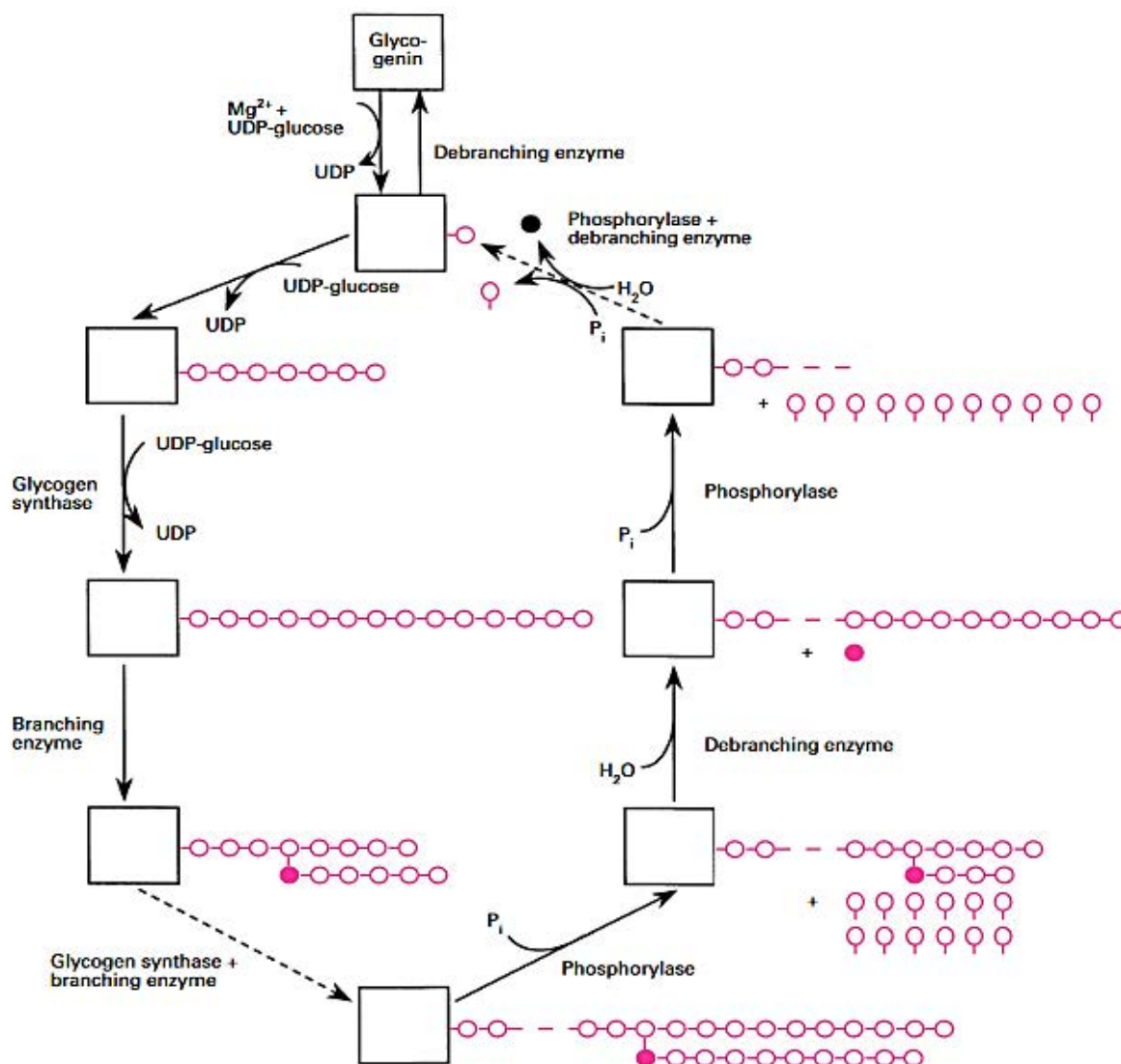


Εικόνα 3: Το γλυκογόνο και η αποδόμηση του [3].

1.2 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase, GP)

Είναι ένα σημαντικό ένζυμο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου επειδή εκκινεί την αποικοδόμησή του, διασπώντας το με την προσθήκη ανόργανου φωσφορικού (P_i) παράγοντας 1-φωσφορική γλυκόζη. Η GP απομακρύνει διαδοχικά μόρια γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα της αλυσίδας του γλυκογόνου μέσω φωσφορολυτικής διάσπασης των α -1,4-γλυκοσιδικών δεσμών. Το ανόργανο φωσφορικό διασπά τον δεσμό ανάμεσα στο άτομο C-1 του τελευταίου μορίου γλυκόζης και στο άτομο C-4 του επόμενου μορίου, διατηρώντας τη μορφή α στο C-1 (Εικόνα 2). Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες και ειδικότερα η *in vitro* αντίδραση είναι αντιστρεπτή, με τον λόγο ισορροπίας της 1-φωσφορικής γλυκόζης προς το ανόργανο φωσφορικό να είναι 0.28 σε pH 6.8.

Ωστόσο, μέσα στο κύτταρο, η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή της 1-φωσφορικής γλυκόζης, οδηγώντας την αντίδραση προς τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου [11].



Εικόνα 4: Σύνθεση και αποδόμηση του γλυκογόνου [10].

Οι τρεις διαφορετικές ισομορφές της φωσφορυλάσης κωδικοποιούνται από τα γονίδια PYGB, PYGM, PYGL που εκφράζονται αντίστοιχα στον εγκέφαλο, στους μύες και στο ήπαρ με την αμινοξική ακολουθία να παρουσιάζει ομοιότητα στο 90% μεταξύ της ηπατικής και της μυϊκής φωσφορυλάσης στους ανθρώπους, 80-83% μεταξύ των ισομορφών του ανθρώπου ενώ εμφανίζεται 97% ομοιότητα τόσο μεταξύ των ανθρώπινων ισομορφών και των αντίστοιχων τους στα τρωκτικά όσο και μεταξύ της μυϊκής φωσφορυλάσης από κονίκλους (rmGP) και της ανθρώπινης (hmGP). Όλες οι ισομορφές ρυθμίζονται αλλοστερικά μέσω δέσμευσης μεταβολιτών και αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης της σερίνης 14. Αποτελεί το πρώτο ένζυμο που αναγνωρίστηκε ότι ρυθμίζεται μέσω ομοιοπολικής φωσφορυλίωσης, μετά την ανακάλυψη

των Krebs και Fisher, ενώ πιο πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι γίνεται ρύθμιση του επίσης μέσω ακετυλίωσης [11].

Οι δύο μορφές στις οποίες βρίσκεται η φωσφορυλάση είναι η GPa και η GPb: με την α να είναι η φωσφορυλιωμένη μορφή και η β να είναι η αποφωσφορυλιωμένη μορφή. Υπάρχει ισορροπία μεταξύ δύο διαμορφώσεων της GP, μιας ενεργής και χαλαρής κατάστασης R και μιας λιγότερο ενεργής, τεταμένης κατάστασης T. Η κατάσταση R παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τα υποστρώματα και ορισμένους αλλοστερικούς ρυθμιστές, όπως το AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη), ενώ η κατάσταση T έχει χαμηλή συγγένεια για το γλυκογόνο και το ανόργανο φωσφορικό (Pi). Η κατάσταση R προωθείται από την φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη-14 από την κινάση της φωσφορυλάσης καθώς και από τη δέσμευση αλλοστερικών ενεργοποιητών. Η μετάβαση από την κατάσταση R στην T προάγεται από την αποφωσφορυλίωση μέσω της πρωτεϊνικής φωσφατάσης ή της δέσμευσης αναστολέων στο αλλοστερικό κέντρο, όπως η G6P, η 1-φωσφορική φρουκτόζη, η ATP, η ADP (Adenosine Diphosphate) και η IMP (Inosine Monophosphate). Αλλαγές στη τριτοταγή δομή του ενζύμου έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγή στη διαμόρφωση του εύκαμπτου βρόχου 280s (κατάλοιπα 282 έως 285) σε μια διαμόρφωση εμποδιστή της καταλυτικής θέσης του ενζύμου (κατάσταση T) που επιτρέπει τη δέσμευση του υποστρώματος (κατάσταση R) [11].

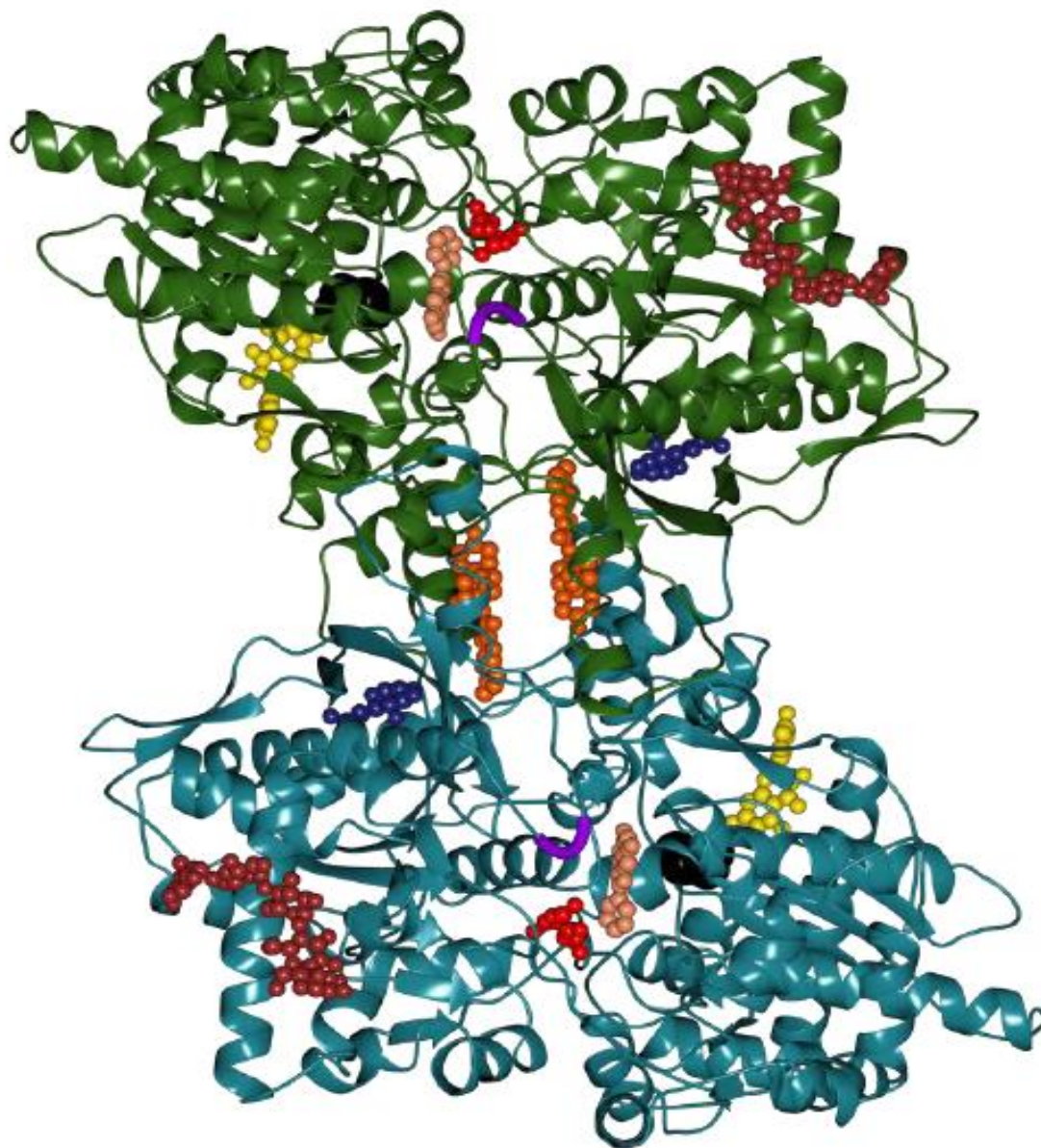
1.2.1 Ηπατική φωσφορυλάση

Η μυϊκή και ηπατική φωσφορυλάση διαφοροποιούνται σημαντικά παρά την υψηλή αμινοξική ομολογία τους. Η ηπατική φωσφορυλάση α μεταπίπτει πιο εύκολα από την T κατάσταση στην R σε σύγκριση με τη φωσφορυλάση β. Επιπλέον, η AMP δεν προκαλεί σημαντική ενεργοποίηση της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης τύπου β (hlGPb). Η γλυκόζη δρα ως αρνητικός αλλοστερικός ρυθμιστής, αναστέλλοντας την ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση τύπου α (hlGPa), καθώς η αποδόμηση του γλυκογόνου στο ήπαρ έχει σκοπό την παροχή γλυκόζης σε άλλους ιστούς που τη χρειάζονται για ενέργεια, ιδιαίτερα όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλά. Επίσης, η AMP δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα της ηπατικής φωσφορυλάσης, διότι στο ήπαρ δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο, όπως συμβαίνει στα μυϊκά κύτταρα [3].

1.2.1 Μυϊκή Φωσφορυλάση

Είναι ένα διμερές που εμφανίζεται με δύο μορφές: την συνήθως ενεργή που είναι η α και την γενικά ανενεργή β. Οι δύο αυτές διαφέρουν ως προς μία φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Το ένζυμο μπορεί να ισορροπεί μεταξύ μιας ενεργής, χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λιγότερο ενεργής, τεταμένης κατάστασης T. Ωστόσο, στην περίπτωση της φωσφορυλάσης α, η ισορροπία τείνει προς την κατάσταση R, ενώ στη φωσφορυλάση β, ευνοείται η κατάσταση T. Το επίπεδο ενέργειας στο μυϊκό κύτταρο καθορίζει ποια από τις δύο καταστάσεις θα υπερισχύσει. Η μορφή β εμφανίζει δραστηριότητα όταν υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις

AMP, ενώ η ATP λειτουργεί ως αρνητικός αλλοστερικός ρυθμιστής, ανταγωνιζόμενη την AMP και σταθεροποιώντας την κατάσταση T. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η φωσφορυλάση β παραμένει ανενεργή εξαιτίας της παρουσίας ATP και γλυκόζης-6-φωσφορικής. Αντίθετα, η φωσφορυλάση α είναι πλήρως ενεργή και δεν επηρεάζεται από τα επίπεδα AMP, ATP ή γλυκόζης-6-φωσφορικής. Σε κατάσταση ηρεμίας, το ένζυμο βρίσκεται κυρίως στην ανενεργή μορφή β, ενώ κατά τη διάρκεια της άσκησης, τα αυξημένα επίπεδα AMP ενεργοποιούν τη φωσφορυλάση β [3].



Εικόνα 5: Η κρυσταλλική δομή της GPb με τα έξι κέντρα πρόσδεσης: **καταλυτικό κέντρο (G6P)**, **κέντρο αναστολής (3EB0)**, **κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου (1P29)**, **νέο αλλοστερικό κέντρο (1H5U)**, **κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης (4MRA)**, αλλοστερικό κέντρο (1GPY), **βρόχος 280s** και η Ser14 [11].

1.2.2 Φωσφορυλάση του εγκεφάλου

Η bGP αποτελεί τη λιγότερο μελετημένη και κατανοητή ισομορφή της φωσφορυλάσης, με τη δομή της να έχει ανακαλυφθεί πρόσφατα μετά από πολυετείς ερευνητικές προσπάθειες. Η bGP ενεργοποιείται από την AMP, εκφράζεται στον ιστό του εγκεφάλου και τα καρδιακά μυοκύτταρα, και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην απελευθέρωση του αποθηκευμένου γλυκογόνου στον εγκέφαλο, υποστηρίζοντας τις εγκεφαλικές λειτουργίες. Η σημαντικότητα της ενισχύεται καθώς δεν έχουν εντοπιστεί μεταλλάξεις σε αυτήν, πιθανώς επειδή είναι η μοναδική ισομορφή που εκφράζεται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, πριν αντικατασταθεί από άλλες ισομορφές στους μυς και το ήπαρ. Η συσσώρευση γλυκογόνου στους νευρώνες, ως αποτέλεσμα της μειωμένης δραστηριότητας της bGP, μπορεί να οδηγήσει σε εκφυλισμό των νευρώνων και να συμβάλλει στην ανάπτυξη διαφόρων εγκεφαλικών ασθενειών και παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με τη γήρανση [12].

1.2.3 Η συμμετοχή της φωσφορικής πυριδοξάλης

Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP, Pyridoxal 5'-Phosphate, P5P), αποτελεί την ενεργή μορφή της βιταμίνης B6, λειτουργώντας ως συνένζυμο σε πολλές διαφορετικές ενζυμικές αντιδράσεις όπως σε όλες της τρανσαμιδοποίησης σε ορισμένες αποκαρβοξυλίωσης, απαμίνωσης και ρακεμοποίησης των αμινοξέων [3]. Στη GP, η PLP εντοπίζεται σε όλα τα καταλυτικά κέντρα. Η PLP αλληλεπιδρά με το κατάλοιπο Lys680, σχηματίζοντας μια βάση Schiff, που βοηθά στη σταθεροποίηση της στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η 5-φωσφορική ομάδα της PLP στη συνέχεια συμμετέχει στη μεταφορά ενός πρωτονίου προς ένα ορθοφωσφορικό ιόν, το οποίο με τη σειρά του μεταφέρει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο που είναι προσκολλημένο στον άνθρακα 4 της αλυσίδας γλυκογόνου που απομακρύνεται. Αυτό το βήμα οδηγεί στη δημιουργία ενός καρβοκατιόντος, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με το ορθοφωσφορικό ιόν, με αποτέλεσμα το σχηματισμό γλυκόζης φωσφορικού δεσμού α-1. Την ίδια στιγμή, ένα άτομο υδρογόνου επιστρέφει στην PLP, ολοκληρώνοντας τη διαδικασία. Μέσω αυτού του μηχανισμού, η PLP εμποδίζει την πρόσβαση του νερού στο ενεργό κέντρο και επιτρέπει τη φωσφορυλυτική διάσπαση του γλυκογόνου. Αυτή η διαδικασία είναι ενεργειακά πιο αποδοτική σε σύγκριση με την υδρόλυση, καθώς εξοικονομεί ATP, το οποίο διαφορετικά θα χρειαζόταν για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. [3].

1.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου: Δομή

Αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες. Κάθε υπομονάδα περιλαμβάνει 842 αμινοξέα και χωρίζεται σε δύο περιοχές: την αμινοτελική, η οποία αποτελείται από 484 αμινοξέα, και την καρβοξυτελική, που περιέχει 358 αμινοξέα με τις ρυθμιστικές περιοχές του ενζύμου να βρίσκονται εκεί. Συγκεκριμένα, στην αμινοτελική περιοχή εντοπίζεται το αλλοστερικό κέντρο και η θέση της Ser14, οι οποίες ελέγχουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Στην καρβοξυτελική περιοχή εντοπίζεται η θέση σύνδεσης του συνενζύμου φωσφορικής

πυριδοξάλης (PLP). Όπως φαίνεται στην εικόνα 5 έχουν εντοπιστεί επτά κέντρα στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου [3], [11].

Καταλυτικό κέντρο

Εντοπίζεται στο κέντρο κάθε υπομονάδας του ενζύμου και περιλαμβάνει τον συμπαράγοντα PLP, ενώ μέσω ενός καναλιού μήκους 15 Å γίνεται προσβάσιμο στο διαλύτη. Οι αναστολές που συνδέονται σε αυτό το κέντρο σταθεροποιούν την κλειστή μορφή του βρόχου 280s (κατάλοιπα 282-287), εμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος και προάγοντας την ανενεργή T μορφή του ενζύμου. Οι περισσότερες έρευνες έχουν γίνει στη φωσφορυλάση γλυκογόνου από μύες κονίκλων, λόγω της ευκολίας στην παραγωγή υψηλής ποιότητας κρυστάλλων. Οι πιο ισχυροί αναστολές του καταλυτικού κέντρου είναι τα ανάλογα γλυκόζης (εικόνα 5) [11].

Κέντρο της αποθήκευσης του γλυκογόνου

Βρίσκεται στην επιφάνεια της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, περίπου 30 Å μακριά από το καταλυτικό κέντρο, και αποτελεί την περιοχή όπου προσδένεται το γλυκογόνο. Αυτό το κέντρο περιλαμβάνει δύο έλικες και έναν βρόχο που συνδέει δύο αντιπαράλληλους κλώνους. Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες σχετικά με την πρόσδεση των α-, β- και γ-κυκλοδεξτρινών στην rmGPb έδειξαν ότι αυτές οι ενώσεις έχουν ανασταλτική δράση (εικόνα 5) [11].

Κέντρο αναστολής (Κέντρο σύνδεσης καφεΐνης)

Εντοπίζεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου σε απόσταση περίπου 12. Είναι μια υδρόφοβη περιοχή όπου οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Phe285 και Tyr613 σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις. Οι αναστολές αυτού του κέντρου είναι πιο αποτελεσματικοί σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης και σταθεροποιούν την T διαμόρφωση του ενζύμου. Όταν η καφεΐνη συνδέεται με την rmGPb, εισχωρεί μεταξύ των δύο αρωματικών καταλοίπων που έχουν αναφερθεί και δημιουργεί αρκετούς δεσμούς Van der Waals, ενισχύοντας τη σταθερότητα της αλληλεπίδρασης (εικόνα 5) [11].

Τα αλλοστερικά κέντρα

Συντίθεται από δομικά στοιχεία που προέρχονται από τις δύο υπομονάδες του λειτουργικού διμερούς και βρίσκεται σε αντίθετες πλευρές του μορίου του ενζύμου. Δημιουργείται από δύο α-έλικες και τέσσερις β-κλώνους, σχηματίζοντας μια V-σχήματος κοιλότητα που αναγνωρίζει διάφορα φωσφορυλιωμένα συστατικά, όπως AMP, IMP, ATP, UDP-γλυκόζη, 6-φωσφορική γλυκόζη, β-γλυκεροφωσφορικό και ανόργανο φωσφόρο. Η 6-φωσφορική γλυκόζη είναι ο πιο ισχυρός φυσικός αναστολέας του ενζύμου, αναστέλλοντας τη δράση του μέσω ανταγωνισμού με το AMP ή σταθεροποιώντας την ανενεργή T διαμόρφωση του ενζύμου [11].

Το νέο αλλοστερικό κέντρο, γνωστό και ως θέση πρόσδεσης ινδόλης και βρίσκεται στο εσωτερικό της κοιλότητας του διμερούς ενζύμου. Αυτή η κοιλότητα οριοθετείται από τη μία πλευρά από κατάλοιπα της περιοχής cap' και τις έλικες α2, ενώ από την άλλη από τον «πύργο» των ελίκων α7. Το κέντρο αυτό αποτελείται από 18 αμινοξέα (9 από κάθε υπομονάδα), τα οποία είναι εξαιρετικά συντηρημένα στις φωσφορυλάσες γλυκογόνου του ανθρώπινου ήπατος και των μυών, καθώς και στις φωσφορυλάσες των μυών, του εγκεφάλου και του ήπατος των κουνελιών. Το συγκεκριμένο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται 15 Å από το βασικό αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Το ινδόλιο είναι ο πιο ισχυρός φυσικός αναστολέας της θέσης αυτής. [11].

Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Αυτή η πρόσφατη ανακάλυψη αφορά ένα νέο αλλοστερικό κέντρο που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Lys544, Arg551, Lys665 και Tyr548 στην C-περιοχή, καθώς και τα κατάλοιπα Glu120 και Glu123 στην N-περιοχή. Το κέντρο αυτό εντοπίζεται σε απόσταση 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Συγκριτική δομική ανάλυση των διαμορφώσεων T και R μεταξύ του συμπλόκου rmGPb με κερσετίνη και της ελεύθερης rmGPb αποκάλυψε σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές στην κατάσταση R, ενώ στην T-διαμόρφωση οι αλλαγές ήταν λιγότερο έντονες. Επιπλέον, η σύνδεση της κερσετίνης προάγει την T-κατάσταση, η οποία είναι λιγότερο ενεργή, σταθεροποιώντας τον βρόχο που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 548-556 σε αυτήν τη διαμόρφωση [11].

1.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου: Φαρμακευτικός στόχος

Έρευνες έχουν επιβεβαιώσει ότι αποτελεί σημαντικό μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά του διαβήτη τύπου 2 [13]. Οι προσπάθειες ανακάλυψης καινοτόμων υπογλυκαιμικών παραγόντων επικεντρώνονται στην αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Λόγω της σημαντικής του λειτουργίας στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP αποτελεί στόχο για την ανάπτυξη αναστολέων που μπορούν να παρεμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Ωστόσο, η ύπαρξη των τριών ισομορφών της φωσφορυλάσης (ηπατική, μυϊκή και εγκεφαλική) δημιουργεί το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Για να επιτευχθεί η μείωση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς πρέπει να στοχεύουν στο ηπατικό ισοένζυμο, χωρίς να επηρεάζουν τις άλλες δύο ισομορφές. Δεδομένης της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, μπορεί να είναι δύσκολο να επιτευχθεί ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Ωστόσο, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο στο οποίο φτάνουν τα φάρμακα που λαμβάνονται από το στόμα, θα πρέπει να είναι εφικτή η ρύθμιση της δόσης του φαρμάκου ώστε να η δράση του φαρμάκου να γίνεται μόνο στο ήπαρ για να αποφευχθούν οι παρενέργειες [13], [14].

Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου θα μπορούσαν να έχουν σημαντική κλινική αξία στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής φωσφορυλάσης από κουνέλια, η οποία έχει 80% ομολογία στην ακολουθία αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση, έχει προσδιοριστεί σε υψηλή ανάλυση μέσω μελετών ακτίνων X. Επιπλέον, το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη, που λειτουργεί ως φυσιολογικός ρυθμιστής, έχει επίσης προσδιοριστεί. Η δομή αυτού του συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Στη συνέχεια, συντέθηκε μια σειρά τέτοιων ενώσεων, για τις οποίες υπήρχε η προσδοκία ότι θα καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης, και αυτές οι ενώσεις εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Έγιναν επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί η αλληλεπίδραση αυτών των ενώσεων με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων που παρατηρήθηκαν ήταν γενικά κοντά στις προβλέψεις, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ξεπέρασε αυτή της γλυκόζης. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν πολύτιμες οδηγίες για το σχεδιασμό πιο ισχυρών αναστολέων [14].

Ο κύριος στόχος της διεξαγόμενης έρευνας είναι η ανακάλυψη ενός αναστολέα της γλυκόζης, που θα δρα σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις, καθιστώντας τον αποδεκτό ως φαρμακευτικό προϊόν. Αυτός ο αναστολέας πρέπει να είναι ικανός να αναστέλλει τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου χωρίς να προκαλεί την πλήρη αδρανοποίησή της.

Όσον αφορά τον καρκίνο, έρευνες έχουν προτείνει αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως στρατηγική για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης όγκων, μια προσέγγιση με σημαντικό θεραπευτικό ενδιαφέρον. Στόχος αποτελεί ο επαναπρογραμματισμός του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων ώστε να υπάρξει αλλαγή στην απαραίτητη ενέργεια και στα μεταβολικά ενδιάμεσα που είναι κρίσιμα για την κυτταρική ανάπτυξη. Η υποξία στους όγκους δημιουργεί μία συνθήκη με αρνητικό αντίκτυπο με αποτέλεσμα την αύξηση αυτών των μετασχηματισμών. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ενισχύεται στους όγκους *in vivo* και σε καρκινικά κύτταρα *in vitro* ως απάντηση στην υποξία οδηγώντας στη συσσώρευση γλυκογόνου, ακολουθούμενη από σταδιακή αποικοδόμησή του. Επομένως, η αναστολή των ενζύμων του μεταβολισμού του γλυκογόνου, και ειδικά της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, μπορεί να προσφέρει σημαντικά οφέλη στην αντιμετώπιση του καρκίνου [15].

1.5 Χρήση Φυσικών Προϊόντων

Ιστορικά, τα φυσικά προϊόντα έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην ανακάλυψη φαρμάκων, ειδικά για τον καρκίνο και τις λοιμώδεις ασθένειες, αλλά και σε άλλους θεραπευτικούς τομείς. Προσφέρουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τα συμβατικά συνθετικά μόρια, τόσο πλεονεκτήματα όσο και προκλήσεις κατά τη διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων [16]. Χαρακτηρίζονται από τεράστια ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα των δομών τους. Συνήθως έχουν υψηλότερη μοριακή μάζα, μεγαλύτερο αριθμό sp^3 ατόμων άνθρακα και οξυγόνου αλλά λιγότερα άτομα αζώτου και αλογόνων, μεγαλύτερο αριθμό σημείων για σύνδεση ομολόγων

υδρογόνων και μεγαλύτερη μοριακή ακαμψία σε σύγκριση με τις συνθετικές ενώσεις. Αυτές οι διαφορές μπορεί να είναι επωφελείς, για παράδειγμα, η υψηλότερη ακαμψία των φυσικών ενώσεων μπορεί να είναι πολύτιμη στην ανακάλυψη φαρμάκων για την αντιμετώπιση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης [17].

Ωστόσο ορισμένα μειονεκτήματα έχουν οδηγήσει σε εμπόδια στη χρήση τους. Τα εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων μπορεί να περιλαμβάνουν μια πληθώρα ενώσεων οι οποίες μπορεί να μην είναι συμβατές με τους ερευνητικούς στόχους. Ο προσδιορισμός των βιοδραστικών ενώσεων που ενδιαφέρουν αποτελεί πρόκληση και τα εργαλεία για αποτροπή εύρεσης ήδη μελετημένων ενώσεων πρέπει να εφαρμόζονται για να αποφευχθεί η εκ νέου ανακάλυψη γνωστών ενώσεων. Επιπλέον η πρόσβαση σε επαρκές βιολογικό υλικό για την απομόνωση βιοδραστικών ενώσεων είναι επίσης σημαντικό πρόβλημα [18].

1.5.1 Φυτικές Πηγές

Ασπαραγοειδή

Τα Ασπαραγοειδή (*Asparagaceae*) αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μονοκοτυλήδων φυτών, με πολυποίκιλη μορφολογία και εκτενή γεωγραφική κατανομή, που απαντώνται από τροπικές έως εύκρατες περιοχές. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει πάνω από 150 γένη και 2.500 είδη, με χαρακτηριστικά που ποικίλλουν από μικρά ποώδη φυτά μέχρι ξυλώδεις αναρριχητικούς θάμνους [19]. Τα φυτά αυτού του γένους αυτού περιέχουν διάφορα βιοδραστικά συστατικά, όπως φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Τα φλαβονοειδή είναι γνωστά για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, οι οποίες προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβη λόγω οξειδωτικού στρες. Επίσης, φαινολικά οξέα, όπως το καφεϊκό οξύ, προσφέρουν σημαντικά οφέλη μειώνοντας τη φλεγμονή και καταπολεμώντας το οξειδωτικό στρες. Αυτά τα συστατικά ενισχύουν τη βιολογική αξία των φυτών του γένους αυτού και αποτελούν ενδιαφέρον πεδίο έρευνας για πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές [20].

Muscari comosum

Είναι ένα αυτοφυές φυτό της οικογένειας Ασπαραγοειδών (*Asparagaceae*) που απαντάται σε ολόκληρη τη Μεσογειακή περιοχή. Η χρήση των βολβών του *Muscari comosum* έχει μια μακρά παράδοση στην Ελλάδα, τη Μέση Ανατολή και την Ανατολική Μεσόγειο. Αυτή η παράδοση ως τροφή έχει οδηγήσει σε εκτενή φυτοχημική έρευνα των εκχυλισμάτων του φυτού, κατά την οποία έχουν εντοπιστεί σημαντικά συστατικά, όπως οι ομοϊσοφλαβανόνες (ιδιαίτερα οι 3-βενζυλ-4-χρωμανόνες), τα τερπένια και οι γλυκοζυλιωμένες τριτερπένια. Οι ομοϊσοφλαβανόνες, εκτός από την φυτοχημική τους σημασία, παρουσιάζουν ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, καθώς ορισμένα από αυτά τα συστατικά δείχνουν αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και υποχοληστερολαιμικές ιδιότητες, καθώς και αντιαλλεργικές, αντισταμινικές και αντικαρκινογόνες δράσεις *in vitro* [19].

Bellevalia dubia

Το *Bellevaia dubia* είναι ένα ανθοφόρο φυτό που ανήκει στην οικογένεια των Ασπαραγοειδών (*Asparagaceae*) και βρίσκεται σε διάφορες περιοχές της ανατολικής Μεσογείου, όπως η Ελλάδα. Αναπτύσσεται συνήθως σε βραχώδεις πλαγιές, λιβάδια και ανοιχτά δάση. Ανθίζει την άνοιξη, κυρίως από τον Απρίλιο έως τον Μάιο. Είναι βολβώδες φυτό με στενά, γραμμικά φύλλα και άνθη σε σχήμα καμπάνας, τα οποία είναι συνήθως μπλε ή βιολετί, αν και υπάρχουν και λευκές ή ροζ ποικιλίες [20]. Η φυτοχημική σύνθεση των φυτών του γένους *Bellevaia*, συμπεριλαμβανομένου του *Bellevaia dubia*, έχει ερευνηθεί σε κάποιο βαθμό, αν και όχι τόσο εις βάθος όσο άλλα γένη φυτών. Τα φυτά αυτού του γένους περιέχουν διάφορα βιοδραστικά συστατικά, όπως φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Τα φλαβονοειδή είναι γνωστά για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, οι οποίες προστατεύουν τα κύτταρα από βλάβη λόγω οξειδωτικού στρες. Επίσης, φαινολικά οξέα, όπως το καφεϊκό οξύ, προσφέρουν σημαντικά οφέλη μειώνοντας τη φλεγμονή και καταπολεμώντας το οξειδωτικό στρες. Αυτά τα συστατικά ενισχύουν τη βιολογική αξία των φυτών του γένους *Bellevaia* και αποτελούν ενδιαφέρον πεδίο έρευνας για πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές [21].

1.5.2 Μανιτάρια

Τα μανιτάρια αποτελούν κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής εδώ και χιλιετίες, με την κατανάλωσή τους να παρουσιάζει αύξηση παγκοσμίως τα τελευταία χρόνια. Πρόσφατα, έχουν αξιοποιηθεί ως πηγές πρόσθετων τροφίμων, θρεπτικών συστατικών και διατροφικών συμπληρωμάτων, καθώς περιέχουν πολύτιμες ενώσεις με υψηλή θρεπτική αξία. Πολλές από αυτές τις βιοδραστικές ουσίες έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές στην πρόληψη και θεραπεία διαφόρων ασθενειών, κυρίως λόγω των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες, το DNA και άλλα βιολογικά μόρια, παράγοντας επιθυμητά αποτελέσματα, γεγονός που τις καθιστά υποψήφιες για τη δημιουργία θεραπευτικών παραγόντων προερχόμενων από φυσικά προϊόντα. Διάφορα είδη μανιταριών μπορούν να παρέχουν σημαντικές ποσότητες θρεπτικών συστατικών, όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυσακχαρίτες, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, καθώς και σημαντικές βιοδραστικές ενώσεις (π.χ. πολυφαινόλες) [21].

Pleurotus eryngii

Το *Pleurotus eryngii* είναι ένα βρώσιμο και φαρμακευτικό μανιτάρι που απαντάται σε πολλές περιοχές, όπως η Μεσόγειος και η κεντρική Ευρώπη. Έχει σημαντικές μορφολογικές και γενετικές παραλλαγές λόγω της ευρείας γεωγραφικής του εξάπλωσης. Παράγει βιολογικά ενεργές ενώσεις και χρησιμοποιείται σε διάφορες έρευνες. Η εμπορική του παραγωγή έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια χάρη στη μοναδική του γεύση και τη θρεπτική του αξία [22]. Το *Pleurotus eryngii* έχει αναφερθεί ότι παράγει διάφορες βιολογικά ενεργές ενώσεις. Οι πολυσακχαρίτες, μεταξύ άλλων, είναι οι κύριες βιολογικά δραστικές ενώσεις στο *P. eryngii* και φαρμακολογικά θεωρούνται τροποποιητές της βιολογικής απόκρισης, καθώς ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού απέναντι σε διάφορες ασθένειες [23].

Lentinula edodes

Το *Lentinula edodes* έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη μελέτη των λειτουργικών του ιδιοτήτων και για την απομόνωση καθαρών ενώσεων για φαρμακευτική χρήση [24]. Περιέχει φαρμακευτικές ενώσεις, όπως πολυσακχαρίτες, τερπενοειδή, στερόλες και λιπίδια, οι οποίες είναι αποτελεσματικές στη θεραπεία διάφορων όγκων και λοιμώξεων, καθώς και σε άλλες δραστηριότητες που βρίσκονται ακόμη υπό μελέτη. Αρκετοί πολυσακχαρίτες έχουν απομονωθεί από βασιδιομύκητες, κυρίως ως ομοπολυμερή και ετεροπολυμερή, με ιδιαίτερη έμφαση στις β-γλυκάνες. Έρευνες *in vitro* και *in vivo* έχουν δείξει ότι οι γλυκάνες έχουν φαρμακευτική δράση. Στην Ιαπωνία, η β-γλυκάνη χρησιμοποιείται από το 1980 ως φυσικό ανοσοδιεγερτικό για τη θεραπεία του καρκίνου. Οι β-γλυκάνες είναι επίσης αποτελεσματικές κατά αλλογενών, συγγενών και αυτοχθόνων όγκων [25].

Agrocybe cylindracea

Το *Agrocybe cylindracea* είναι ένα μανιτάρι που καταναλώνεται ευρέως και έχει φαρμακευτικές ιδιότητες. Ανήκει στην οικογένεια των βασιδιομυκήτων και είναι ιδιαίτερα δημοφιλές και εκτιμάται για την υψηλή θρεπτική του αξία και τη νοστιμιά του. Περιέχει πολλές βιοενεργές ουσίες, όπως πολυσακχαρίτες και γλυκάνες, που έχουν μελετηθεί για τις ευεργετικές τους ιδιότητες. Οι πολυσακχαρίτες του μανιταριού παρουσιάζουν σημαντική αντικαρκινική δράση, συμβάλλοντας στην αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων, καθώς και υπογλυκαιμική δράση, η οποία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη ρύθμιση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα, προσφέροντας προστασία έναντι του διαβήτη. Επιπλέον, οι αντιοξειδωτικές ουσίες που περιέχονται στο μανιτάρι συμβάλλουν στην προστασία των κυττάρων από βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες, καθυστερώντας έτσι τη γήρανση. Εκτός από τις διατροφικές και φαρμακευτικές χρήσεις, το *Agrocybe cylindracea* έχει εφαρμογές και στη βιομηχανία της υγείας και της ομορφιάς. Η ευρεία γκάμα εφαρμογών και τα πολλαπλά οφέλη του το καθιστούν ένα πολύτιμο φυσικό προϊόν με μεγάλες δυνατότητες για περαιτέρω έρευνα και ανάπτυξη [26].

1.5.3 Μέθοδοι εκχύλισης

Είναι σημαντικό να επιλέγεται η σωστή φυσική πηγή ενός συγκεκριμένου βιοδραστικού συστατικού ή προϊόντος, αλλά και οι διαδικασίες που εμπλέκονται στην παραγωγή τους είναι σημαντικό να βελτιστοποιούνται προσεκτικά για την αύξηση της αποδοτικότητας της διαδικασίας και για να ελαχιστοποιηθεί τόσο η απώλεια της βιοδραστικότητας όσο και η ζημιά στο περιβάλλον.

Ένα από τα βασικά εμπόδια για την ενεργειακά αποδοτική και οικονομικά βιώσιμη εξαγωγή διατροφικά πολύτιμων ενώσεων από μανιτάρια είναι η δυσκολία απελευθέρωσής τους από την ενδοκυτταρική τους θέση, χωρίς να απαιτούνται μεγάλες ποσότητες διαλύτη και παρατεταμένος χρόνος εξαγωγής. Οι παραδοσιακές μέθοδοι συχνά χρησιμοποιούν νερό ή

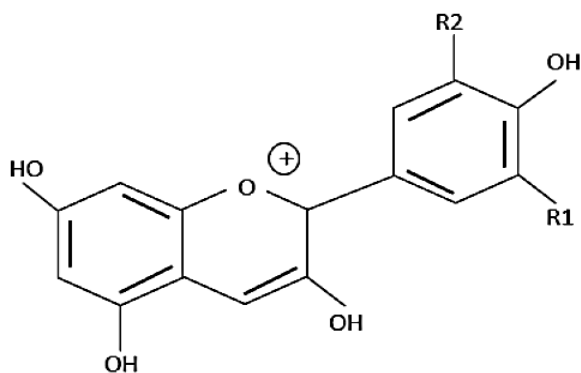
οργανικούς διαλύτες για την εξαγωγή, ανάλογα με την επιδιωκόμενη ένωση και τη χρήση της. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι είναι χρονοβόρες και μπορεί να προκαλέσουν υποβάθμιση ή πήξη των πολύτιμων ενώσεων που υπάρχουν στα μανιτάρια. Επιπλέον, η χρήση οργανικών διαλυτών είναι δαπανηρή (π.χ. αιθανόλη) [27]. Επιπλέον οι παραδοσιακές μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιούνται συνήθως για την εξαγωγή βιοδραστικών ουσιών (solid-liquid extraction) περιλαμβάνουν την εκτεταμένη χρήση τοξικών οργανικών διαλυτών και την υψηλή κατανάλωση ενέργειας, ενώ προσφέρουν χαμηλή εκλεκτικότητα και χαμηλές αποδόσεις εξαγωγής. Αυτές οι αδυναμίες μπορούν να ξεπεραστούν εν μέρει ή πλήρως με τη χρήση νεοαναπτυγμένων προηγμένων τεχνικών εξαγωγής, οι οποίες είναι ταχύτερες, πιο εκλεκτικές και πιο φιλικές προς το περιβάλλον. Οι παρακάτω τεχνικές συνδυάζονται μεταξύ τους ώστε να επιτευχθεί ακόμα μεγαλύτερη εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από φυτικές πηγές και μύκητες [28].

Τεχνικές	Χαρακτηριστικά
Pressurized Liquid Extraction (PLE)	Χρήση υγρών διαλυτών υπό υψηλή πίεση
Supercritical Fluid Extraction (SFE)	Χρήση υπερκρίσιμων υγρών
Ultrasound-Assisted Extraction (UAE)	Χρήση υπερήχων (>20 KHz)
Microwave-Assisted Extraction (MAE)	Χρήση μικροκυμάτων
Enzyme-Assisted Extraction (EAE)	Χρήση ενζύμων

Πίνακας 1: Σύγχρονες και πράσινες τεχνικές απομόνωσης βιοδραστικών ενώσεων από φυτικές πηγές [28].

1.5.4 Ανθοκυανίνες

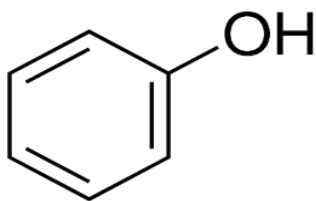
Οι ανθοκυάνες αποτελούν φυσικές χρωστικές, συγκαταλέγονται στα φλαβονοειδή και απαντώνται σε πληθώρα φυτικών ειδών, στα οποία συγκαταλέγονται και διάφορα λουλούδια όπως οι οικογένειες *Asteraceae*, οι *Geraniaceae*, οι *Solanaceae* και πολλές άλλες. Οι χρωστικές αυτές περιέχουν έναν βασικό χρωμοφόρο, που ονομάζεται ανθοκυανιδίνη, ο οποίος συνδέεται με σάκχαρα για να δημιουργήσει τις ανθοκυάνες. Οι διαφορές στη χημική δομή και σύσταση των ανθοκυανών οδηγούν σε ποικιλία χρωμάτων, όπως μπλε, μοβ ή κόκκινο. Οι ανθοκυάνες όχι μόνο δίνουν χρώμα στα φυτά, αλλά τα προστατεύουν επίσης από περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και οι επιθέσεις από παράσιτα. Επιπλέον, παρουσιάζουν πιθανά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία, καθώς είναι γνωστές για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις τους. Έρευνες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ανθοκυανών μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών νοσημάτων και να ενισχύσει την ανοσοποιητική λειτουργία. Χάρη στο χρώμα τους, οι ανθοκυάνες χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών ως φυσικές χρωστικές. Ωστόσο, είναι ευάλωτες στην οξείδωση που προκαλείται από το φως, τη θερμότητα και τις αλλαγές στο pH, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αποχρωματισμό και μείωση της δραστηριότητάς τους [29].



Εικόνα 6: Βασική δομή των ανθοκυανινών [29]

1.5.5 Φαινολικά

Τα φαινολικά συστατικά είναι μια κατηγορία οργανικών ενώσεων που διακρίνονται από την ύπαρξη μίας ή περισσότερων υδροξυλομάδων (-OH) που είναι συνδεδεμένες με έναν αρωματικό δακτύλιο, όπως ο βενζολικός δακτύλιος. Αυτές οι ενώσεις απαντώνται ευρέως στα φυτά και είναι γνωστές για τον ρόλο τους ως δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι παράγονται μέσω συγκεκριμένων βιοσυνθετικών μονοπατιών. Οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν διάφορους υποτύπους όπως: απλές φαινόλες, φαινολικά οξέα, τανίνες, φλαβονοειδή. Τα φαινολικά συστατικά απαντώνται ευρέως σε όλα τα μέρη των φυτών και έχουν σημαντική συμβολή στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας των φυτικών ιστών. Επιπλέον, τα φαινολικά συστατικά συμμετέχουν σε σημαντικές λειτουργίες των φυτών, όπως η φωτοσύνθεση, η θρέψη και η ενζυμική δραστηριότητα, λαμβάνοντας μέρος σε διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις και μεταβολικές διεργασίες. Βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε πολλά φυτικά τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης. Ενώσεις όπως το καφεϊκό οξύ, η απηγενίνη και η κατεχίνη χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία. [30].



Εικόνα 7: Βασική δομή της φαινόλης

1.6 Κρυσταλλογραφία ακτίνων X

Ένας κρύσταλλος πρωτεΐνης είναι μια στερεή επαναλαμβανόμενη δομή σε ένα μοτίβο που είναι συμμετρικό. Η επαναλαμβανόμενη μονάδα που αποτελεί τη δομική βάση ενός κρυστάλλου ονομάζεται στοιχειώδης ή μοναδιαία κυψελίδα. Αυτή μπορεί να περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα μόρια. Οι κυψελίδες αυτές διατάσσονται σε τρεις διαστάσεις, δημιουργώντας

ένα κρυσταλλικό πλέγμα. Δεδομένου ότι τα μόρια μιας πρωτεΐνης δεν διαθέτουν συμμετρική δομή (είναι ασύμμετρα), είναι δύσκολο να τοποθετηθούν με τρόπο που να σχηματίζουν κρύσταλλο χωρίς κενά. Αυτά τα κενά συνήθως γεμίζονται από μόρια διαλύτη. Η κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιλαμβάνει τόσο τα άτομα του μοτίβου του κρυσταλλικού πλέγματος όσο και αυτά της ασύμμετρης μονάδας. Οι άξονες του κρυσταλλικού πλέγματος αντιστοιχούν σε αυτούς της στοιχειώδους κυψελίδας. Οι ακμές της κυψελίδας ορίζουν τρεις διανυσματικούς άξονες, a , b και c , οι οποίοι καθορίζουν τα μήκη της. Οι γωνίες που σχηματίζονται μεταξύ των αξόνων είναι η α (ανάμεσα στους άξονες b και c), η β (ανάμεσα στους a και c) και η γ (ανάμεσα στους a και b). Έτσι, τόσο το μέγεθος όσο και το σχήμα της κυψελίδας προσδιορίζονται από τα μήκη των a , b και c , καθώς και από τις γωνίες α , β και γ , τα οποία τελικά καθορίζουν τη συνολική μορφολογία του κρυστάλλου. Η διαδικασία σχηματισμού κρυστάλλων πρωτεΐνης είναι ιδιαίτερα απαιτητική, καθώς πραγματοποιείται με αργό ρυθμό και επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως το pH, η θερμοκρασία, καθώς και τη φύση και τη συγκέντρωση του διαλύτη. Γι' αυτόν τον λόγο, χρειάζονται πολλές δοκιμές για να αξιολογηθούν αυτές οι παράμετροι και να βρεθεί ο κατάλληλος συνδυασμός που θα οδηγήσει στο σχηματισμό κρυστάλλων κατάλληλων για ανάλυση με περίθλαση ακτίνων X. [31], [32].

Ένα από τα κύρια βήματα στην κρυστάλλωση είναι να εξασφαλιστεί ότι το δείγμα πρωτεΐνης είναι ομοιογενές και καθαρό, κάτι που επιτυγχάνεται μέσω της αργής και ελεγχόμενης κατακρήμνισης των μορίων, προωθώντας τη δημιουργία τάξης. Η καθαρότητα της πρωτεΐνης πρέπει να είναι πάνω από 97% για να καταστεί δυνατή η κρυστάλλωσή της. Όταν η συγκέντρωση ενός μορίου στο διάλυμα ξεπερνά τη διαλυτότητά του (S^0), αποχωρεί από το διάλυμα. Έτσι, η ανάπτυξη κρυστάλλων επιτυγχάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε υπέρκορο επίπεδο, διαδικασία που πραγματοποιείται με μείωση του όγκου του διαλύματος μέσω αφαίρεσης μέρους του διαλύτη. Η ανάπτυξη κρυστάλλων, επομένως, απαιτεί την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε υπερκορεσμένο επίπεδο. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της απομάκρυνσης μέρους του διαλύτη, οδηγώντας σε μείωση του συνολικού όγκου του διαλύματος. Η κρυστάλλωση αρχίζει με την πυρήνωση, η οποία αποτελεί μια διαδικασία με χαμηλή πιθανότητα επιτυχίας. Μετά την πυρήνωση, οι κρύσταλλοι αναπτύσσονται με την προσθήκη πρωτεϊνικών μορίων στην επιφάνεια του πυρήνα. Η πυρήνωση, που είναι το πιο κρίσιμο από τα δύο στάδια, συμβαίνει όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι πολύ μεγαλύτερη από τη S^0 , ενώ η ανάπτυξη των κρυστάλλων πραγματοποιείται σε συγκεντρώσεις πρωτεΐνης που βρίσκονται κοντά στη S^0 [31], [32].

Δύο από τις πιο κοινές μεθόδους για την κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι η διάχυση ατμών και η διαπίδυση. Και οι δύο τεχνικές αποσκοπούν στον ελεγχόμενο περιορισμό της διαλυτότητας της πρωτεΐνης, μέσω της αλλαγής των συνθηκών στο διάλυμα. Στην αρχή, η πρωτεΐνη διαλύεται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει διαλύτη και άλατα, ενώ ένα δεύτερο διάλυμα διαλύτη τοποθετείται σε μια δεξαμενή, δημιουργώντας ένα κλειστό σύστημα μεταξύ των δύο διαλυμάτων. Στόχος αυτού του συστήματος είναι η μείωση της διαλυτότητας του μορίου, η οποία επιτυγχάνεται αφαιρώντας διαλύτη ή άλατα από το διάλυμα της πρωτεΐνης [31], [32].

1.6.1 Μέθοδος soaking

Η μέθοδος soaking (εμποτισμός) χρησιμοποιείται στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών όταν οι κρύσταλλοι έχουν ήδη σχηματιστεί και επιδιώκεται η εισαγωγή ενός μικρού μορίου ή ενός αναστολέα στους κρυστάλλους για πειραματικούς σκοπούς, όπως η μελέτη δομικών αλλαγών. Αποτελεί τη συχνότερα εφαρμοζόμενη μέθοδο. Έτσι, προ-δημιουργημένοι κρύσταλλοι πρωτεΐνης εκτίθενται σε ένα διάλυμα που περιέχει την υπό μελέτη ένωση για την πρόσδεση της στην πρωτεΐνη. Δεδομένου ότι οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης μπορούν να περιέχουν έως και 70% νερό, τα μόρια συνήθως διαπερνούν τη διατεταγμένη δομή των πρωτεϊνικών μορίων, επιτρέποντας τα να διαχυθούν μέσα από αυτά. Εάν ο προσδέτης παρουσιάζει επαρκώς υψηλή συγγένεια δέσμευσης σε μία θέση στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, μπορεί να εισαχθεί με καλά οργανωμένο τρόπο σε αυτή την περιοχή και να εμφανιστεί στην πυκνότητα διαφοράς των δεδομένων περίθλασης που συλλέγονται από αυτούς τους κρυστάλλους. Είναι μια πολύ υποσχόμενη προσέγγιση για τη γρήγορη ανάλυση της δέσμευσης θραυσμάτων μέσω κρυσταλλογραφίας απευθείας πάνω σε κρυστάλλους πρωτεΐνης [33].

1.7 Σκοπός

Αυτή η διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος ενός ευρύτερου ερευνητικού προγράμματος που διεξάγεται στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Η έρευνα επικεντρώνεται στα ένζυμα που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του γλυκογόνου, με ιδιαίτερη έμφαση στη δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης, διερευνώνται διάφορες βιοδραστικές ενώσεις που μπορούν να αλληλεπιδρούν με τα ένζυμα αυτά, επηρεάζοντας τη λειτουργία τους, με στόχο την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών παραγόντων για τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.

Πιο συγκεκριμένα εστίασε στην ανάλυση της επίδρασης εκχυλισμάτων ανθοκυανινών και φαινολικών, τα οποία προήλθαν από το εργαστήριο της κ. Χρυσανγής Γαρδέλη του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών καθώς επίσης και από εκχυλίσματα μανιταριών που στάλθηκαν από το ΕΛΓΟ-Δήμητρα, στο κύριο ένζυμο υπεύθυνο για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι αυτές οι ενώσεις μπορεί να έχουν ανασταλτική δράση στο ένζυμο. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η ανασταλτική δράση στη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου που απομονώθηκε από τους μύες κουνελιών (rmGPb). Διεξήχθησαν *in vitro* κινητικές μελέτες για τον υπολογισμό της τιμής IC_{50} έναντι της rmGPb και ακολούθησαν *ex vivo* κινητικές μελέτες σε καρκινικά κύτταρα HepG2 έναντι της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ακολούθησαν μέσω βιοπληροφορικών εργαλείων μελέτες για την εύρεση πιθανών ενώσεων που μπορεί να υπάρχουν στα εκχυλίσματα με βάση την ικανότητα τους να προσδένονται στο κέντρο πρόσδεσης του αναστολέα της rmGPb.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βιοπληροφορικά προγράμματα

Πρόγραμμα Coot

Το Coot είναι μια εφαρμογή μοριακών γραφικών και εστιάζει στη κρυσταλλογραφική δημιουργία μακρομοριακών μοντέλων και στο χειρισμό τους παρά την αναπαράστασή τους. Το Coot μπορεί να λειτουργήσει με δεδομένα μικροσκοπίας μικρών μορίων (SHELXL) και ηλεκτρονικών μικροσκοπιών, να χρησιμοποιηθεί για ομόλογη μοντελοποίηση και να εμφανίσει δομές NMR [34].

Πρόγραμμα Phenix

Το Phenix είναι ένα ολοκληρωμένο λογισμικό για τον προσδιορισμό της δομής μακρομορίων χρησιμοποιώντας κρυσταλλογραφικά δεδομένα (όπως ακτίνες X, νετρόνια και ηλεκτρόνια) και δεδομένα κρυσταλλογραφικής μικροσκοπίας. Είναι αυτοματοποιημένο και επιτρέπει την γρήγορη δημιουργία ενός αρχικού μοντέλου δομής με ελάχιστη ανθρώπινη παρέμβαση, εφόσον τα δεδομένα είναι μέτριας ποιότητας. Το Phenix χρησιμοποιεί νέους αλγόριθμους για μοριακή αντικατάσταση (Phaser), αναζήτηση βαρέων ατόμων (HySS), δημιουργία μοντέλων (Resolve) και βελτίωση μακρομορίων (phenix.refine). Οι αλγόριθμοι αυτοί είναι ενσωματωμένοι σε ένα πλήρες σύνολο κρυσταλλογραφικών βιβλιοθηκών, προσβάσιμο μέσω του cctbx, και οι χρήστες μπορούν να τους χρησιμοποιούν μέσω του γραφικού περιβάλλοντος ή της γραμμής εντολών του Phenix. [35].

Polder Maps

Στην κρυσταλλογραφία ακτίνων X κατά την ανάλυση των δεδομένων, μπορεί να υπάρξει αβεβαιότητα λόγω του τρόπου με τον οποίο τα μοντέλα αυτά "προσαρμόζονται" στα δεδομένα. Το Polder Maps αντιμετωπίζει αυτό το ζήτημα μέσω της δημιουργίας ενός χάρτη που σχηματίζεται μέσω της απαλοιφής των αβεβαιοτήτων του μοντέλου. Με αυτόν τον τρόπο, οι ασθενείς πυκνότητες, οι οποίες μπορούν να καλυφθούν από τον διαλύτη, μπορεί να γίνουν ορατές. Οι τυπικές περιοχές που παραλείπονται είναι:

1. Προσδέτες-Ligands
2. Υπολείμματα που προεξέχουν στην περιοχή του διαλύτη με ασαφείς προσανατολισμούς πλευρικής αλυσίδας (όπως λυσίνη, αργινίνη κ.λπ.)
3. Υπολείμματα C- ή N- τελικού άκρου

Μας δίνει μετά την εκτέλεση του αυτό το πρόγραμμα μια λίστα συντελεστών συσχέτισης για την αξιολόγηση της εμπιστοσύνης της ερμηνείας του χάρτη-polder. Εάν το CC(1,3) είναι μεγαλύτερο από το CC(1,2) και το CC(2,3), τότε η πυκνότητα πιθανότατα αντιστοιχεί στα ατομικά χαρακτηριστικά της επιλογής. Εάν τα CC(1,2) και CC(2,3) είναι μεγαλύτερα ή

συγκρίσιμα με τα CC(1,3), τότε η πυκνότητα στην περιοχή μοιάζει με την πυκνότητα του διαλύτη [36].

Ligand Fit

Πραγματοποιεί προσαρμογή των αναστολέων που μπορούν να προσδεθούν σε ένα ένζυμο σε χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Χρησιμοποιεί ένα αρχείο που περιέχει πληροφορίες για τον παράγοντα κρυσταλλογραφικής δομής, ένα προαιρετικό αρχείο PDB με ένα μερικό μοντέλο της δομής χωρίς τον αναστολέα και ένα αρχείο PDB που περιέχει τον αναστολέα που εξετάζουμε αν μπορεί να ταιριάζει [37].

Πρόγραμμα CCP4

Είναι ένα λογισμικό πακέτο που χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων παρέχοντας ένα σύνολο εργαλείων για την ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Ειδικότερα, το CCP4 παρέχει εργαλεία για την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων που συλλέγονται από ακτινοβολίες όπως οι συγχροτρονικές και υποστηρίζει διαδικασίες όπως η ολοκλήρωση και ο καθαρισμός των δεδομένων. Το λογισμικό περιλαμβάνει επίσης εργαλεία για την επίλυση κρυσταλλικών δομών μέσω μεθόδων όπως η μοριακή αντικατάσταση ή η ανάλυση με ανώτερες συμμετρίες (MAD/SAD) και διαθέτει εργαλεία για τη βελτιστοποίηση των αρχικών δομών και την εξάλειψη σφαλμάτων μέσω ρεαλιστικής προσαρμογής των κρυσταλλικών δομών στα πειραματικά δεδομένα [38].

Refmac5

Το Refmac5 εκτελεί διαδικασίες διόρθωσης κρυσταλλικών δομών χρησιμοποιώντας τα πειραματικά δεδομένα, βελτιστοποιώντας την τοπολογία της δομής ώστε να ταιριάζει καλύτερα στα παρατηρηθέντα κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Αυτό περιλαμβάνει την ελαχιστοποίηση της διαφοράς μεταξύ των πειραματικών και των θεωρητικών μοντέλων μέσω μιας διαδικασίας που βασίζεται στη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Μπορεί να διαχειριστεί αβεβαιότητες στη δομή με τη χρήση πιθανολογικών μεθόδων, επιτρέποντας πιο αξιόπιστες διορθώσεις. Χρησιμοποιεί τη διαδικασία που ονομάζεται "Maximum Likelihood" για να επιτυγχάνει αυτό το στόχο. Επιπλέον παρέχει αξιολογήσεις της συμφωνίας μεταξύ του μοντέλου και των πειραματικών δεδομένων μέσω στατιστικών μετρήσεων όπως το R-factor και το Free R-factor, τα οποία βοηθούν στην αξιολόγηση της ποιότητας της βελτιωμένης δομής. Επίσης πολύ σημαντική είναι η χρήση του για την αξιολόγηση της της δημιουργίας συμπλόκου ενός πιθανού αναστολέα με τον ένζυμο στόχο [39].

Contact

Χρησιμοποιείται για την ανάλυση και την εύρεση επαφών μεταξύ ατόμων ή μορίων μέσα σε μια κρυσταλλική δομή, όπως οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης ή πρωτεΐνης-αναστολέα και οι δεσμοί υδρογόνου. Το πρόγραμμα εντοπίζει κοντινές επαφές μεταξύ ατόμων, προσδιορίζοντας ποιες περιοχές της δομής είναι πιθανό να έχουν αλληλεπιδράσεις [40].

2.2 Ενώσεις

Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή προήλθαν από Ασπαραγοειδή. Πιο συγκεκριμένα στάλθηκαν τέσσερα εκχυλίσματα από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών στο εργαστήριο μας διαλυμένα σε 100% DMSO και 30% DMSO (70% dH₂O 30% DMSO) τα οποία αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Ακολουθεί αναλυτικός πίνακας με τις συγκεντρώσεις:

Ουσία	Κωδικός	Συγκεντρώσεις (mg/ml)
Ανθοκυάνες σε 100% DMSO	A4 100%	36,7
Ανθοκυάνες σε 30% DMSO	A4 30%	9,7
Φαινολικά σε 100% DMSO	Φ4 100%	262,85
Φαινολικά σε 30% DMSO	Φ4 30%	202,05

Πίνακας 2: Πληροφορίες για τις ουσίες του πειράματος.

Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα φαινολικών τα οποία επίσης στάλθηκαν από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών αποθηκεύτηκαν στους -20°C και προέρχονται από Ασπαραγοειδή. Ειδικότερα:

Είδος	Διάλυμα	Συγκέντρωση (mg/ml)
Ασπαραγοειδή Α	100% DMSO	16

Πίνακας 3: Πληροφορίες για το εκχύλισμα του φυτού *Bellevalia dubia*.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης εκχυλίσματα τα οποία προήλθαν από μανιτάρια όπως φαίνεται στον πίνακα :

Είδος	Διάλυμα	Συγκέντρωση (mg/ml)
<i>Pleurotus eryngii</i>	100% DMSO	115
<i>Pleurotus eryngii</i>	100% dH ₂ O	176,47
<i>Lentinula edodes</i>	100% DMSO	150,8
<i>Agrocybe cylindracea</i>	100% DMSO	121,2

Πίνακας 4: Πληροφορίες για τα εκχυλίσματα μανιταριών.

Τέλος χρησιμοποιήθηκε και η χημική ένωση gentisic acid, ένα διυδροξυβενζοϊκό οξύ. Είναι ένα παράγωγο του βενζοϊκού οξέος και ένα δευτερεύον προϊόν της μεταβολικής διάσπασης της ασπιρίνης. Μετά από βιοπληροφορική ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων το κατέδειξαν μια από τις ενώσεις που θα μπορούσαν να συνδεθούν στο κέντρο και να προκαλέσουν αναστολή. Παρήχθησαν δύο διαλύματα του gentisic acid ένα σε διάλυμα με dH₂O και συγκέντρωσης 48,6 mM και ένα σε DMSO συγκέντρωσης 200 mM.

2.3 Κινητικές Μελέτες Ενώσεων

Παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τα εξής Διαλύματα:

Ρυθμιστικό Διάλυμα 1 (AB1)	pH 6.8 400mM KCl, 4mM DTT, 4mM EDTA, 200mM Imidazole
Ρυθμιστικό Διάλυμα 2 (AB2)	270 mM KCl, 2,7mM DTT, 2,7mM EDTA pH 6.8
50:50:1	50 mM b-Mercaptoethanol, 50mM b-GP, 1mM EDTA, pH 6.8
Διάλυμα G1P 90mM	225μL G1P (400mM) + 675μL AB1 + 100μL dH ₂ O

Η GP διασπά το γλυκογόνο μέσω προσθήκης ορθοφωσφορικού (Pi) παράγοντας 1-φωσφορική γλυκόζη και γλυκογόνο με n-1 κατάλοιπα σε μια αμφίδρομη αντίδραση αυτή της σύνθεσης του γλυκογόνου [3].



Στα κινητικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, μελετήθηκε η διαδικασία σύνθεσης του γλυκογόνου καθώς και η παραγωγή ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μέτρηση των ορθοφωσφορικών ιόντων πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτομετρικές μεθόδους, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια.

2.3.1 Προσδιορισμός της τιμής IC₅₀ των ενώσεων

Η τιμή IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση ενός αναστολέα η οποία προκαλεί την κατά 50% αναστολή ενός ενζύμου [41]. Στην παρούσα μελέτη, διερευνάται η αναστολή που υφίσταται η φωσφορυλάση του γλυκογόνου από τα εκχυλίσματα των ενώσεων:

Ουσία	Συγκεντρώσεις (mg/ml)
A4 100%	36,7
A4 30%	9,7
Φ4 100%	262,85
Φ4 30%	202,05
Gentisic acid dH ₂ O	48,6 mM
Gentisic acid DMSO	200 mM

Πίνακας 5: Ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη IC₅₀

Αρχικά χρησιμοποιώντας το διάλυμα G1P (90mM) μέσω διαδοχικών αραιώσεων παρασκευάστηκε ένα διάλυμα 9mM G1P (200μl G1P 18mM και 200μl AB2) ενώ καθόλη τη διάρκεια παρέμενε στον πάγο σε erppendorf.

Για τον προσδιορισμό της IC₅₀ προετοιμάστηκε ενζυμικό διάλυμα, όγκου 400μl, το οποίο περιείχε GPb 5 μg/ml , γλυκογόνο 1% (w/v) και 2,5 mM του διαλύματος 50:50:1.

Αρχικά πραγματοποιούμε φωτομέτρηση ώστε να υπολογίσουμε την ποσότητα GPb που θα προσθέσουμε. Μετράμε εισάγοντας σε ένα erppendorf 998μl 50:50:1 και 2 μl GPb και φωτομετρούμε στα 280nm. Έτσι για τον υπολογισμό της ποσότητας GPb:

$$C_a = A/1,32 = \text{mg/ml} \quad V_a = C_b \cdot V_b / C_a = 5 \mu\text{g} / \mu\text{l} \cdot 400\mu\text{l} / C_a$$

Οι ποσότητες μας στο διάλυμα είναι:

- 40μl γλυκογόνο
- 20μl 50:50:1
- C_a GPb που εξαρτάται από την απορρόφηση
- dH₂O το οποίο είναι το υπόλοιπο που μένει για να φτάσει τον τελικό όγκο 400μl το διάλυμα

Ακολουθεί η παρασκευή των διαλυμάτων υποστρωμάτων στα οποία χρειάζονται 144μl:

Control 100%	Ενώσεων 100%	Ενώσεων 30%	Ενώσεων 30%
DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
7,2μl AMP 25mM (σταθερή ποσότητα)	7,2μl AMP 25mM (σταθερή ποσότητα)	7,2μl AMP 25mM (σταθερή ποσότητα)	7,2μl AMP 25mM (σταθερή ποσότητα)
40μl G1P 9mM (σταθερή ποσότητα)	40μl G1P 9mM (σταθερή ποσότητα)	40μl G1P 9mM (σταθερή ποσότητα)	40μl G1P 9mM (σταθερή ποσότητα)
3,6μl DMSO	3,6μl ένωσης	12μl DMSO	12μl ένωσης
dH ₂ O 93,2μl	dH ₂ O 93,2μl	dH ₂ O 84,8μl	dH ₂ O 84,8μl
V _{τελ} 144μl	V _{τελ} 144μl	V _{τελ} 144μl	V _{τελ} 144μl

Πίνακας 6: Διαλύματα υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση. Η προσθήκη της G1P γίνεται στα 12min της επώσης του ενζυμικού διαλύματος στο υδατόλουτρο.

Για το gentisic acid σε DMSO λόγω μεγάλης συγκέντρωσης πραγματοποιούμε αραιώση ώστε να έχουμε 100mM τελική συγκέντρωση. Έτσι για τον υπολογισμό της IC₅₀ επιλέγουμε συγκεντρώσεις 0μM, 50μM, 100μM, 200μM, 400μM με όγκο 40μl. Πιο αναλυτικά:

Συγκεντρώσεις	Gentisic Acid dH ₂ O	Gentisic Acid DMSO
A: 0μM	0 mM	0 mM
B: 50μM	2,5 mM	2,5mM

Γ: 100μM	5 mM	5 mM
Δ: 200μM	10 mM	10 mM
Ε: 400μM	20 mM	20 mM

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις για τον υπολογισμό της IC₅₀ του Gentisic Acid

Για τα διαλύματα ενώσεων αποφασίσαμε να φτιάξουμε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις: 0%, 25%, 50% , 75% και 100% της αρχικής συγκέντρωσης.

Για τα Φαινολικά 100% DMSO λόγω μεγάλης συγκέντρωσης πραγματοποιήσαμε αραιώση ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 50 mg/ml. Παρόμοια και για τα Φαινολικά σε 30% DMSO πραγματοποιήσαμε αραιώση για τελική συγκέντρωση 50 mg/ml. Πιο αναλυτικά οι συγκεντρώσεις :

Συγκεντρώσεις	Φ4 100%	Φ4 30%	A4 100%	A4 30%
A: 0%	0 mg/ml	0 mg/ml	0 mg/ml	0 mg/ml
B: 25%	1,3 mg/ml	3,36 mg/ml	0,183 mg/ml	0,8 mg/ml
Γ: 50%	2,62 mg/ml	6,74 mg/ml	0,367 mg/ml	1,6 mg/ml
Δ: 75%	3,9 mg/ml	10,10 mg/ml	0,55 mg/ml	2,4 mg/ml
Ε: 100%	5,2 mg/ml	13,47 mg/ml	0,734 mg/ml	3,2 mg/ml

Πίνακας 8: Διαφορετικές συγκεντρώσεις των ενώσεων σε erppendorf για τον υπολογισμό της IC₅₀ κάθε ένωσης.

Ακολούθως ετοιμάστηκαν και τα αντίστοιχα erppendorf των αντιδράσεων τα οποία περιείχαν 10μl 1% SDS ώστε να σταματήσει η ενζυμική αντίδραση με τις εξής ονομασίες:

A1,A2,A3,A4,A5	B1,B2,B3,B4,B5	Γ1,Γ2,Γ3,Γ4,Γ5
Δ1,Δ2,Δ3,Δ4,Δ5	E1,E2,E3,E4,E5	

Μετά την παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος ξεκινάει η επώαση του στο υδατόλουτρο στους 30°C για 15 min. 3 λεπτά πριν τελειώσει ο χρόνος επώασης πραγματοποιείται η προσθήκη στα διαλύματα υποστρωμάτων της G1P (9mM) και τοποθετούνται και αυτά για επώαση στο υδατόλουτρο. Το κινητικό ξεκινάει με την προσθήκη 36μl από το ενζυμικό διάλυμα στο διάλυμα υποστρωμάτων A που αντιστοιχεί στο Control της ένωση και αποτελεί την t=0 . Η ίδια διαδικασία ακολουθείται σε κάθε μια συγκέντρωση των υποστρωμάτων ανά 36s. Ακολούθως στα erppendorfs που περιέχουν 1% SDS γίνεται η προσθήκη 40μl από τα διαλύματα υποστρωμάτων που περιέχουν τις συγκεντρώσεις στα αντίστοιχα erppendorf επίσης ανά 36s, δηλαδή από το erppendorf A παίρνουμε 40μl και τα προσθέτουμε στο A₁. Μετά το πέρας 36s από το B παίρνουμε 40μl και τα προσθέτουμε στο B₁. Η διαδικασία ακολουθείται μέχρι να φτάσουμε στο E₅.

Στον τελικό όγκο της αντίδρασης που είναι 180μl περιλαμβάνονται 144μl υποστρώματος και 36μl ενζυμικού διαλύματος έχουμε:

0,2 % γλυκογόνο	1μM AMP	2 μM G1P
60mM KCL	0,6 DTT	0,6 mM EDTA
3 μg/μl GPb		

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις στον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Στη συνέχεια μετά το πέρας των αντιδράσεων παρασκευάστηκαν τυφλά από δύο φορές:

Τυφλό dH ₂ O	10 μl SDS 1% + 40μl dH ₂ O
Τυφλό G1P (9mM)	10μl SDS1% + 31,1μl dH ₂ O + 8,9μl G1P
Τυφλό Ενζυμικού Διαλύματος	10 μl SDS 1% + 32μl dH ₂ O + 8μl ΕΔ
Τυφλό Φωσφορικών ιόντων	10 μl SDS 1% + 30μl dH ₂ O + 10μl Pi (1mM)
Τυφλό Ένωσης	10 μl SDS 1% + 39μl dH ₂ O + 1μl Ένωσης

Πίνακας 10: Τυφλά για το φωτομετρικό προσδιορισμό.

2.3.2 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός παραγόμενων φωσφορικών ιόντων

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται μέσω φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού των Pi που παράγονται κατά τη σύνθεση του γλυκογόνου, μέσω της δράσης της φωσφορυλάσης. Το παραγόμενο Pi σχηματίζει σύμπλοκο με μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου (Zn²⁺) σε pH 5. Μετά την αναγωγή του με διάλυμα ασκορβικού οξέος, δημιουργείται ένα χρωμοφόρο σύμπλοκο που απορροφά φως στα 850 nm, επιτρέποντας έτσι τη μέτρηση της συγκέντρωσής του.

Διαλύματα Φωτομέτρησης

- Διάλυμα ασκορβικού οξέος pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με προσθήκη πυκνού NaOH
- Διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου και ψευδαργύρου. Η ρύθμιση του pH γίνεται στο 5.0 με προσθήκη πυκνού HCl.

Το διάλυμα φωτομέτρησης παρασκευάζεται με την ανάμειξη των παραπάνω διαλυμάτων σε αναλογία 4:1 (μολυβδαινικό αμμώνιο/ψευδάργυρος : ασκορβικό οξύ). Το προκύπτον διάλυμα διατηρείται σε σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά, επιτρέποντας το σχηματισμό της έγχρωμης ένωσης. Στη συνέχεια, προστίθενται 700 μl από το διάλυμα στα δείγματα που μελετώνται, ακολουθούμενα από ανάδευση με χρήση vortex. Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 30°C για 15 λεπτά. Εάν υπάρχουν φωσφορικά ιόντα στα δείγματα, θα σχηματιστεί το έγχρωμο σύμπλοκο, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Τέλος, πραγματοποιείται η φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 850 nm.

2.3.3 Ανάλυση Αποτελεσμάτων των Κινητικών Πειραμάτων

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων και η δημιουργία των απαραίτητων γραφημάτων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος "GRAFIT", το οποίο επιτρέπει την οπτικοποίηση και ανάλυση των δεδομένων. Για τον υπολογισμό της σταθεράς IC50 εφαρμόστηκε μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) στο πρόγραμμα, χρησιμοποιώντας την κατάλληλη μαθηματική εξίσωση:

$$y = (100\%) / (1 + (x/IC50)^s)$$

s: συντελεστής κλίσης (slope factor) [42].

Ο προσδιορισμός γίνεται μέσω του υπολογισμού των ταχυτήτων των ενζυμικών αντιδράσεων τόσο παρουσία όσο και απουσία του αναστολέα και έτσι μπορεί να υπολογιστεί το ποσοστό αναστολής για διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{\text{Ειδική Δραστικότητα Control} - \text{Ειδική Δραστικότητα Αναστολέα}}{\text{Ειδική Δραστικότητα Control}} \times 100$$

Στη συνέχεια, το ποσοστό αναστολής μετατρέπεται σε ποσοστό δραστικότητας για κάθε συγκέντρωση του αναστολέα. Τα δεδομένα αυτά εισάγονται στο λογισμικό GRAFIT για τον υπολογισμό της IC₅₀. Ο υπολογισμός γίνεται μέσω του διαγράμματος %αναστολή=f([αναστολέα]). Ο συντελεστής f υπολογίζεται από τον τύπο:

$$f = \frac{\text{Limit}}{\text{όγκος διαλύματος} \times C}$$

Το C είναι η συγκέντρωση του ενζύμου στην τελική συγκέντρωση. Για το Limit ο υπολογισμός γίνεται μέσω του τύπου:

$$\text{Limit} = 0,78 \times [G1P] \times \text{όγκος αντίδρασης}$$

και ορίζεται ως το ποσοστό της G1P που έχει καταναλωθεί για την παραγωγή των ορθοφωσφορικών ιόντων όταν η αντίδραση φτάσει σε ισορροπία. Ο όγκος του διαλύματος αναφέρεται στον συνολικό όγκο που προκύπτει από την αντίδραση.

2.4 Τεχνικές Κυτταροκαλλιέργειών

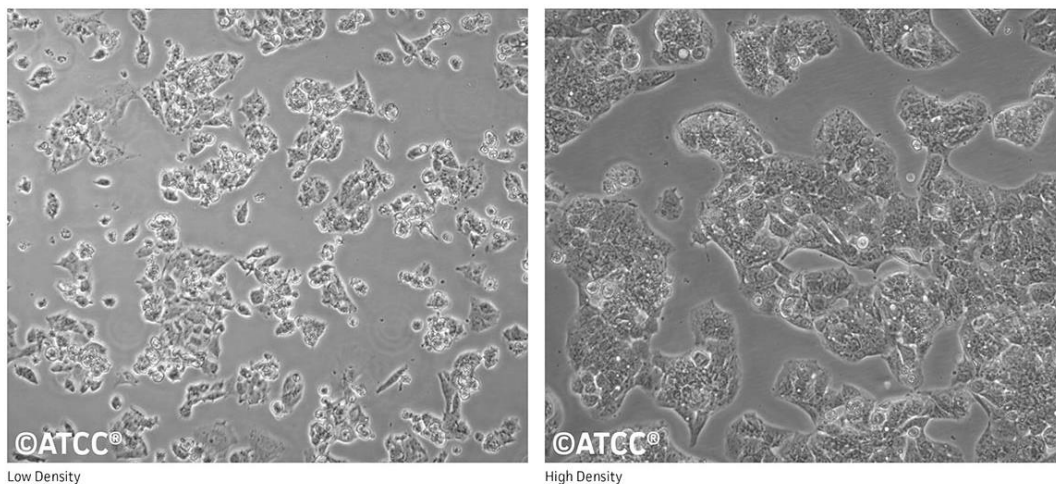
Κυτταρική Σειρά HepG2

Για τα πειράματα της διπλωματικής εργασίας έγινε χρήση κυτταρικών εκχυλισμάτων από την κυτταρική σειρά ηπατοκαρκινώματος HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line).

Οργανισμός	Homo Sapiens, Άνθρωπος
Κυτταρικός Τύπος	Επιθηλιακό

Ιστός	Ήπαρ
Ασθένεια	Ηπατοκαρκίνωμα
Προέλευση	Ηπατοκαρκίνωμα 15χρονου Καυκάσιου
Γονίδια/ Κυτταρικά προϊόντα	Πλήθος γονιδίων που εκφράζονται και πρωτεϊνών που παράγονται

Πίνακας 11: Πληροφορίες για την κυτταρική σειρά HepG2



Εικόνα 8: Κύτταρα HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) (www.lgcstandards-atcc.org)

Απόψυξη κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -80°C ή στους -120°C σε υγρό άζωτο σε cryovials. Κατά την απόψυξη των κυττάρων για να χρησιμοποιηθούν απαιτείται η απόψυξη τους η οποία αρχικά περιλαμβάνει την μεταφορά του cryovial σε υδατόλουτρο 37°C για να ξεπαγώσει σχεδόν πλήρως. Ακολουθεί η μεταφορά στο θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood) όπου το περιεχόμενο του cryovial 1ml μεταφέρεται σε Falcon που περιέχει 4-5 ml θρεπτικού μέσου DMEM. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε 2000 rpm στους 20°C - 25°C . Με την περάτωση της απομακρύνουμε το υπερκείμενο ενώ το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 5 ml θρεπτικού και μεταφέρεται σε φλάσκα και ακολουθεί η παρατήρηση της στο μικροσκόπιο ώστε να διαπιστωθεί η μορφολογία των κυττάρων. Τέλος τοποθετείτε στον επωαστικό κλίβανο, σε συνθήκες 37°C και 5% CO_2 .

Θρυψινοποίηση

Αποτελεί μια απαραίτητη διαδικασία για την ανανέωση του θρεπτικού σε περίπτωση κορεσμού και της δημιουργίας συσσωματωμάτων στη φλάσκα καθώς επίσης και πριν τη χρήση των κυττάρων. Η θρυψίνη είναι μια πρωτεάση που διασπά τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και στην επιφάνεια της φλάσκας. Πρώτον, αφαιρούμε το θρεπτικό από τη φλάσκα και προσθέτουμε 1-3ml θρυψίνης ανάλογα με το

μέγεθος της φλάσκας και με κινήσεις που κάνουμε πρέπει να καλύψουμε όλα τα κύτταρα με τη θρυψίνη. Ο έλεγχος γίνεται μικροσκοπικά πριν τοποθετηθεί ξανά στον κλίβανο για 3 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου, η φλάσκα ελέγχεται ξανά. Η διάρκεια έκθεσης των κυττάρων στη θρυψίνη είναι κρίσιμη, καθώς η υπερβολική έκθεση μπορεί να προκαλέσει έντονη πρωτεόλυση των πρωτεϊνών τους, οδηγώντας σε κυτταροτοξικότητα. Για να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης, προστίθεται θρεπτικό μέσο σε ποσότητα τετραπλάσια του όγκου της θρυψίνης. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο μεταφέρεται σε falcon και υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στα 1000 rpm και σε θερμοκρασία 20-25°C. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο αφαιρείται, το ίζημα επαναδιαλύεται σε θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα τοποθετούνται στη φλάσκα, η οποία μπαίνει στον κλίβανο.

Ψύξη κυττάρων

Χρησιμοποιείται για τη διατήρηση κυττάρων με σκοπό μελλοντικές αναλύσεις και πειραματισμούς. Η ποσότητα των κυττάρων που καταψύχεται καθορίζεται από την κυτταρική σειρά και τη διαθέσιμη ποσότητα κυττάρων. Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή της θρυψινοποίησης, με τη διαφορά ότι μετά τη φυγοκέντρηση το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται και τοποθετείται σε cryovial με αναλογία 90% FBS και 10% DMSO. Στη συνέχεια, η φλάσκα αποθηκεύεται άμεσα στους -80°C, καθώς το DMSO είναι ιδιαίτερα τοξικό.

Μέτρηση κυττάρων

Πραγματοποιείται με το αιμοκυτταρόμετρο-πλάκας Neubauer, μια αντικειμενοφόρο πλάκα με διαβαθμίσεις και στις δύο επιφάνειες. Κάθε επιφάνεια αποτελείται από 16 κύρια τετράγωνα, τα οποία υποδιαιρούνται σε μικρότερα με διαβαθμίσεις. Μετά τη διαδικασία θρυψινοποίησης, 10 μl από το δείγμα των κυττάρων τοποθετούνται σε καλυπτρίδα πάνω στο αιμοκυτταρόμετρο. Η πλάκα Neubauer τοποθετείται στο μικροσκόπιο, και ο συνολικός αριθμός των κυττάρων υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο $(a+b+c+d/4)$, όπου a, b, c και d είναι οι μετρήσεις των κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο. Στη συνέχεια, γίνεται υπολογισμός του αριθμού κυττάρων ανά ml, του συνολικού αριθμού κυττάρων που απαιτείται και του αντίστοιχου όγκου διαλύματος που τα περιέχει. Ο υπολογισμένος όγκος μεταφέρεται σε falcon για φυγοκέντρηση. Το κυτταρικό ίζημα διαλύεται ξανά και κατανέμεται ομοιόμορφα στα επιλεγμένα wells. Ακολουθεί μικροσκοπικός έλεγχος του plate και τοποθέτησή του στον επωαστικό κλίβανο.

2.4.1 Δοκιμασία Κυτταροτοξικότητας MTT

Πρόκειται για μια χρωματομετρική μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Η αξιολόγηση πιθανής κυτταροτοξικότητας βασίζεται στο ένζυμο της μιτοχονδριακής ηλεκτρικής αφυδρογονάσης που μπορεί και ανάγει το κίτρινο άλας τετραζολίου MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) σε μωβ παράγωγο φορμαζάνης. Το αδιάλυτο προϊόν της φορμαζάνης διαλύεται με τη βοήθεια ισοπροπανόλης ή άλλου οργανικού διαλύτη. Η οπτική πυκνότητα του διαλύματος

μετράται φασματοφωτομετρικά, όπου η απορρόφηση αντιστοιχεί στη συγκέντρωση της χρωστικής και είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον αριθμό των ενεργών κυττάρων στην καλλιέργεια. Την πρώτη ημέρα, 13.000 κύτταρα (200 μ l ανά well) στρώνονται σε 96άρι well-plate με DMEM υψηλής γλυκόζης (25mM), περιέχοντας 10% FBS, 1% L-glutamine και 1% P/S. Τη δεύτερη ημέρα, το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και προστίθενται οι ουσίες που πρόκειται να εξεταστούν.

Για κάθε ένωση παρασκευάσαμε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις με τα αντίστοιχα Control (100% DMSO). Οι συγκεντρώσεις ήταν 1:500 (v/v), 1:1000 (v/v) και 1:2000 (v/v) στον τελικό όγκο του θρεπτικού. Οι ενώσεις προστίθενται σε DMEM (w/o glucose) για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας τους και επωάζονται για 3 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, το θρεπτικό μέσο αφαιρείται και προστίθεται αντιδραστήριο MTT σε συγκέντρωση 0,5 mg/ml (διαλυμένο στο θρεπτικό μέσο). Ακολουθεί δεύτερη επώαση για 3 ώρες σε συνθήκες 37°C με 5% CO₂. Μετά την επώαση, το MTT αφαιρείται και προστίθενται 200 μ l ισοπροπανόλης. Αφού περάσουν 90 λεπτά, πραγματοποιείται φασματοφωτομετρική μέτρηση στα 570 και 690 nm.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων των πειραμάτων έγινε με το πρόγραμμα “Statplus”. Πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος για να εξεταστεί αν υπάρχουν συνολικά στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες των δειγμάτων. Το LSD τεστ (Least Significant Difference Test) χρησιμοποιείται για να συγκριθούν οι μέσες τιμές των διαφορετικών ζευγών ομάδων και να καθοριστεί ποια συγκεκριμένα ζεύγη παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Υπολογίζει την ελάχιστη διαφορά που πρέπει να υπάρχει μεταξύ των μέσων τιμών δύο ομάδων ώστε αυτή η διαφορά να θεωρείται στατιστικά σημαντική. Ακολούθησαν οι post-hoc αναλύσεις Duncan’s Test και Tukey’s Test που είναι πιο αυστηρά σε σύγκριση με το LSD και στα οποία κάθε ζεύγος μέσων τιμών συγκρίνεται σταδιακά, και τα τεστ εντοπίζουν τα ζεύγη που παρουσιάζουν σημαντική διαφορά.

2.4.2 Καλλιέργεια κυττάρων για κινητική μελέτη των εκχυλισμάτων έναντι της hIGPb

Την πρώτη μέρα πραγματοποιείται στρώσιμο των τρυβλίων (700.000 cells ανά τρυβλίο) με 3ml DMEM high glucose (25mM) στο οποίο έχει προστεθεί 10% FBS(Fetal bovine serum) και 1% L-glutamine και 1% Penicillin/ Streptomycin. Την επόμενη πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού και προσθήκη θρεπτικού DMEM high glucose without FBS και 1% L-glutamine και 1% P/S μαζί με DEX (10nM) και ινσουλίνης (100nM). Την τρίτη μέρα αφαιρείται ξανά το θρεπτικό και προστίθεται θρεπτικό DMEM without all μαζί με γλυκαγόνη. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η προσθήκη των ενώσεων που ελέγχθηκαν με το τεστ MTT ενώ στα Control προστίθεται ποσότητα DMSO ίδια με την ποσότητα των ουσιών. Αντίστοιχα με τεστ MTT οι συγκεντρώσεις των ενώσεων και τα Control έχουν τις ίδιες συγκεντρώσεις στον τελικό όγκο του θρεπτικού. Πιο συγκεκριμένα για τις ενώσεις και το Control σε συγκέντρωση 1:500 (v/v) γίνεται προσθήκη 6 μ l στα 3ml του θρεπτικού. Για τις συγκεντρώσεις 1:1000 (v/v) και

1:2000(v/v) γίνεται προσθήκη 3 μ l στα 3ml του θρεπτικού. Μετά την επώαση 3 ωρών ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων.

2.5 Τεχνικές εκτός θαλάμου κυτταροκαλλιέργειών - Αναλυτικές Μέθοδοι

2.5.1 Harvest - Συλλογή κυττάρων

Αφαιρούμε το θρεπτικό μέσο και η συλλογή γίνεται με πλύση των κυττάρων με DMEM without all. Μετά την πλύση των κυττάρων με τη χρήση ειδικής συσκευής που ονομάζεται scrapper, τα κύτταρα συλλέγονται και μεταφέρονται σε καινούργια eppendorfs, τα οποία τοποθετούνται σε πάγο. Αφού συλλεχθεί όλο το κυτταρικό υλικό, τα eppendorfs υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 492 rcf (2000 rpm) και σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το κυτταρικό ίζημα είτε αποθηκεύεται στους -80°C είτε χρησιμοποιείται άμεσα για τα επόμενα βήματα του πειράματος.

Κυτταρική Λύση

Λύση με χρήση lysis buffer

Ο όγκος του lysis buffer και ο χρόνος επώασής του με τα κύτταρα ποικίλλουν ανάλογα με την κυτταρική σειρά και τη φύση του πειράματος. Στη συγκεκριμένη μελέτη, το buffer περιείχε 20 mM Hepes με pH 7.5, 0,05% w/v Triton X-100, 1 mM NaF και 0,1 M PMSF. Σε κάθε eppendorf με το κυτταρικό ίζημα προστίθενται 500 μ L lysis buffer, και τα κύτταρα επωάζονται για 15-20 min. Κατά τη διάρκεια της επώασης, το eppendorf αναδεύεται καλά για να εξασφαλιστεί η πλήρης κυτταρική λύση.

Λύση με υπερήχους (Sonication)

Μετά την επώαση με το lysis buffer, πραγματοποιείται περαιτέρω κυτταρική λύση και κατακερματισμός του DNA με τη χρήση υπερήχων. Στην παρούσα μελέτη, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε υπερήχους για 2-3 sec για 4 επαναλήψεις σε 40% Amplitude, 1 cycle, ενώ το διάστημα ανάμεσα στις επαναλήψεις ήταν 25 sec. Στη συνέχεια τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση για 15 min στους 4°C σε 20784 rcf (13.000 rpm). Μετά τη φυγοκέντρηση, συλλέγεται το υπερκείμενο, το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο Bradford και την κινητική μελέτη.

Χρωματομετρική μέθοδος Bradford

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για να μετρηθεί η ποσότητα των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο κυτταρικό διάλυμα και βασίζεται στο ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 δημιουργεί ένα μπλε χρώμα όταν συνδέεται με τις πρωτεΐνες, κυρίως με τα κατάλοιπα λυσίνης. Η σύνδεση της χρωστικής με την πρωτεΐνη σταθεροποιεί την ανιονική μπλε μορφή της Coomassie, με το σύμπλεγμα που σχηματίζεται να παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος

κύματος 595 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος γίνεται ο υπολογισμός της συνολικής συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στο κυτταρικό διάλυμα. Για τον σκοπό αυτό, πρώτα δημιουργείται μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας διαλύματα με γνωστή συγκέντρωση αλβουμίνης βόειου ορού (BSA). Η καμπύλη αυτή προκύπτει από τη μέτρηση των πρωτεϊνικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στα 595 nm και έχει τη μορφή $y = ax + b$, όπου το y αντιπροσωπεύει την τιμή της φωτομέτρησης του κυτταρικού εκχυλίσματος και το x την ποσότητα των πρωτεϊνών στο διάλυμα. Στην παρούσα μελέτη, η εξίσωση είναι $y = 0,0864x + 0,0681$.

2.5.2 Κινητικό πείραμα ex vivo των εκχυλισμάτων έναντι της hIGPb

Παρόμοια με το κινητικό των ενώσεων που αναλύσαμε προηγουμένως παρασκευάζουμε και σε αυτή την περίπτωση τα ενζυμικά μας διαλύματα τα οποία είναι διαφορετικά για την κάθε ένωση καθώς παίρνουμε 108μl από το υπερκείμενο που συλλέχθηκε μετά την κυτταρική λύση και 12 μl 1%γλυκογόνο ώστε να φτάσουμε τελικό όγκο στα ενζυμικά διαλύματα 120 μl. Στη συνέχεια επωάζονται για 15 λεπτά στους 30°C στο υδατόλουτρο. Από το διάλυμα αυτό μεταφέρονται 100 μl στα διαλύματα υποστρωμάτων. Αυτά παρασκευάζονται με 50 μl G1P(90mM) και 70 μl dH₂O τελικού όγκου 120 μl. Στη συνέχεια από το μίγμα που προκύπτει μεταφέρονται 40 μl σε eppendorf που περιέχει 10 μl SDS 1% w/v, ώστε να σταματήσει η αντίδραση λόγω μετουσίωσης της πρωτεΐνης. Οι χρόνοι στους οποίους γινόταν λήψη δείγματος για να σταματήσει η αντίδραση ήταν: 0, 10 min, 20 min, 30 min και 40 min μετά την έναρξή της. Ακολούθως, στα δείγματα προστίθενται 500 μl διαλύματος φωτομέτρησης (διάλυμα ασκορβικού οξέος- διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1/4) αφού έχει επωαστεί για 15 min ώστε να σχηματιστεί η έγχρωμη ένωση, για τον προσδιορισμό του φωσφόρου. Το μίγμα αφήνεται για 15 min σε θερμοκρασία 30°C στο υδατόλουτρο. Ακολουθεί φασματοφωτομέτρηση στα 850 nm.

- Τυφλό dH₂O: 10 μl SDS 1% (w/v) + 40μl dH₂O
- Τυφλό G1P (9mM) :10μl SDS 1% (w/v) + 31,1μl dH₂O + 8,9μl G1P
- Τυφλό Φωσφορικών ιόντων: 10 μl SDS 1% (w/v) + 30μl dH₂O + 10μl Pi (1mM)

2.6 Κρυσταλλογραφικές Μελέτες

Οι κρύσταλλοι φωσφορυλάσης που χρησιμοποιήθηκαν για τις κρυσταλλογραφικές μελέτες υπήρχαν στο εργαστήριο δομικής και λειτουργικής βιοχημείας από προηγούμενα πειράματα. Διεξήχθησαν κρυσταλλογραφικές αναλύσεις σε κρυστάλλους rmGPb προκειμένου να εξεταστεί η θέση και ο τρόπος πρόσδεσης των ενώσεων ως αναστολέων στη φωσφορυλάση. Ο σχηματισμός του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα επιτεύχθηκε μέσω της μεθόδου της εμβάπτισης (soaking), κατά την οποία οι ήδη σχηματισμένοι κρύσταλλοι του ενζύμου εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα που περιείχε τον αναστολέα. Παρασκευάστηκε ένα διάλυμα εμβάπτισης που περιείχε:

- Διάλυμα BES 100mM
- 30% DMSO (v/v)
- dH₂O

Σε ένα τριβλίο κρυστάλλωσης, το διάλυμα εμφύπτισης τοποθετείται στη μεγάλη δεξαμενή, ενώ σε κάθε μία από τις μικρές δεξαμενές προστίθεται ένα από τα διαλύματα εμφύπτισης κάθε ένωσης. Επιπλέον, στις μικρές δεξαμενές τοποθετούνται 1-2 προκατασκευασμένοι κρύσταλλοι rmGPb, οι οποίοι έχουν συλλεχθεί μέσω ειδικού εργαλείου. Το τριβλίο σφραγίζεται με διαφανή ταινία και διατηρείται σε θερμοκρασία 16°C. Η συλλογή των δεδομένων πραγματοποιείται μετά από τρεις ημέρες.

Συλλογή, ανάλυση και επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων

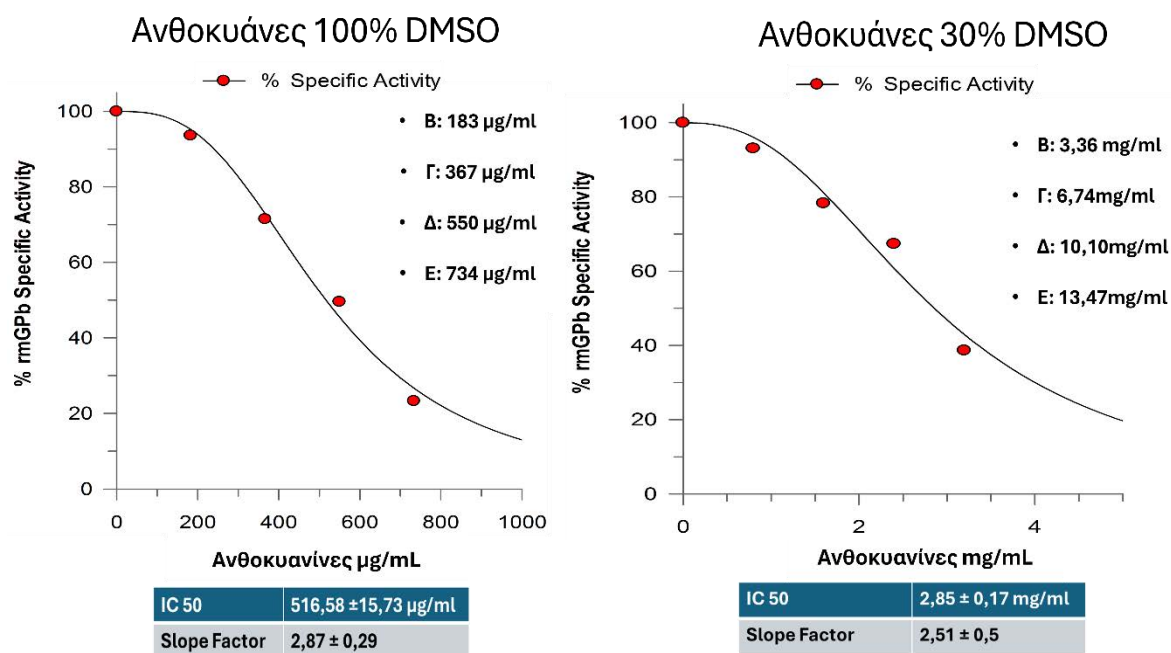
Για τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε συγχροτρονική ακτινοβολία στις εγκαταστάσεις του EMBL στο Αμβούργο (Station P13, PETRA III, EMBL-Hamburg). Η τρισδιάστατη δομή των αναστολέων δημιουργήθηκε μέσω του εργαλείου "Ligand builder" από το πρόγραμμα "Coot", όπως είχε αναφερθεί προηγουμένως. Οι τελικές βελτιώσεις στους χάρτες πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος "Refmac5" από το πακέτο λογισμικού "CCP4i". Επιπλέον, οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals που πιθανολογείται ότι σχηματίζονται μεταξύ του αναστολέα και των αμινοξέων του ενζύμου εντοπίστηκαν με τη βοήθεια του εργαλείου "Contact" από το πακέτο "CCP4". Ως μέγιστη απόσταση για τους δεσμούς υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε το όριο των 3.3 Å.

3. Αποτελέσματα

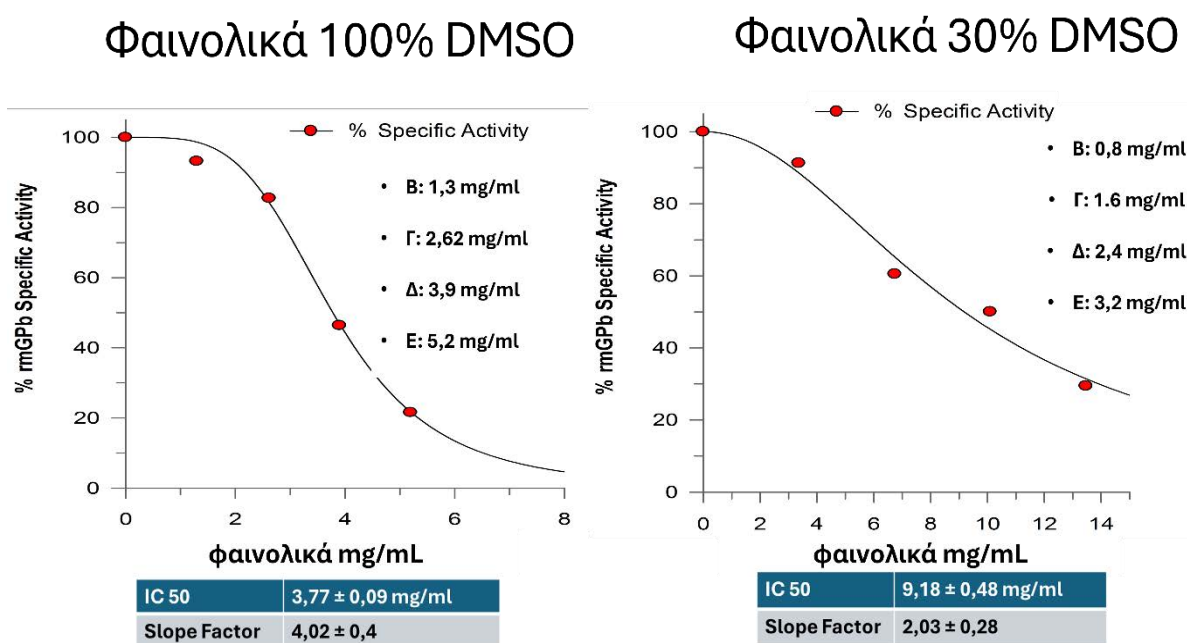
Προσδιορισμός της τιμής IC₅₀ των ενώσεων έναντι της rmGP

Η IC₅₀ του δείγματος των ανθοκυανινών υπολογίστηκε με την βοήθεια του προγράμματος GraFit. Η τιμή της υπολογίστηκε ότι είναι $516,58 \pm 15,73$ μg/ml για το δείγμα σε 100% DMSO και $2,85 \pm 0,17$ mg/ml για το δείγμα σε 30% DMSO (Εικόνα 9). Από αυτό γίνεται κατανοητό ότι τα εκχυλίσματα των ανθοκυανινών, είναι ικανά να προκαλέσουν αναστολή του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου (rmGPb).

Η IC₅₀ του δείγματος των φαινολικών υπολογίστηκε με την βοήθεια του προγράμματος GraFit. Η τιμή της υπολογίστηκε ότι είναι $3,77 \pm 0,09$ mg/ml για το δείγμα σε 100% DMSO και $9,18 \pm 0,48$ mg/ml για το δείγμα σε 30% DMSO (Εικόνα 10). Από αυτό γίνεται κατανοητό ότι τα εκχυλίσματα των φαινολικών, είναι ικανά να προκαλέσουν αναστολή του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου (rmGPb).



Εικόνα 9: Διαγράμματα για τον προσδιορισμό της IC₅₀ του εκχυλίσματος των ανθοκυανινών. Στον άξονα χ'χ υπάρχει η συγκέντρωση του εκχυλίσματος των ανθοκυανινών σε µg/ml για το δείγμα σε 100% DMSO και σε mg/ml για το 30% DMSO, ενώ στον άξονα ψ'ψ υπάρχει η % ειδική δραστηριότητα του ενζύμου.



Εικόνα 10: : Διαγράμματα για τον προσδιορισμό της IC₅₀ του εκχυλίσματος των φαινολικών. Στον άξονα χ'χ υπάρχει η συγκέντρωση του εκχυλίσματος των φαινολικών σε mg/ml, ενώ στον άξονα ψ'ψ υπάρχει η % ειδική δραστηριότητα του ενζύμου.

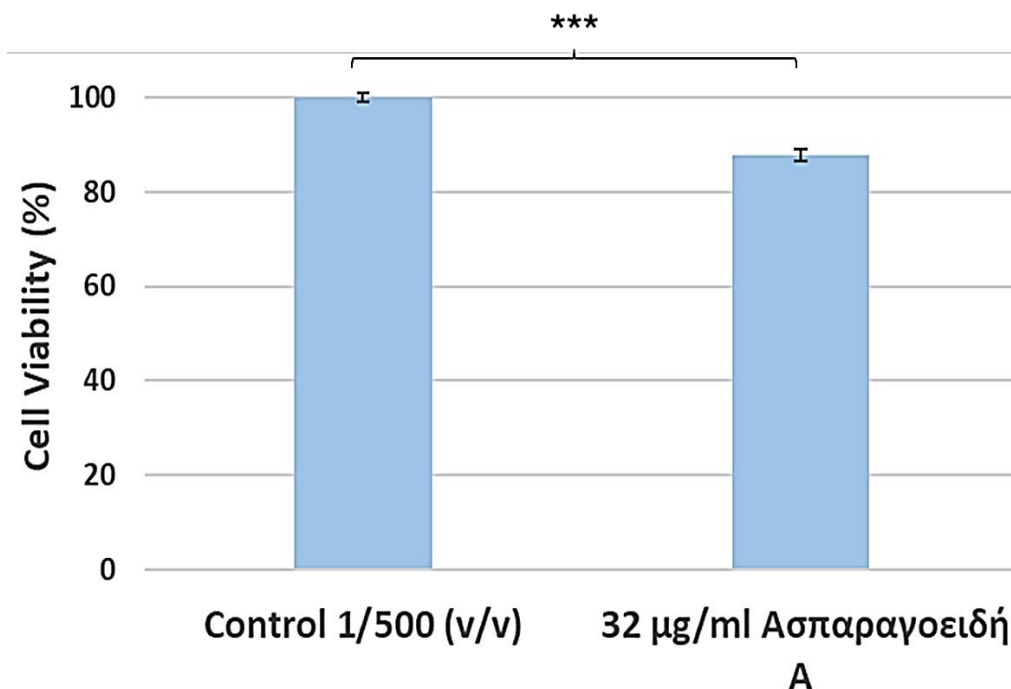
Η IC₅₀ του δείγματος των ανθοκυανών από τα Ασπαραγοειδή Α έχει γίνει σε προηγούμενη πτυχακή μελέτη του εργαστηρίου. Επομένως σε αυτή την πτυχακή μελέτη προχωρήσαμε σε

έλεγχο της κυτταροτοξικότητας του καθώς και σε ex vivo κινητική μελέτη που θα αναφερθεί στη συνέχεια.

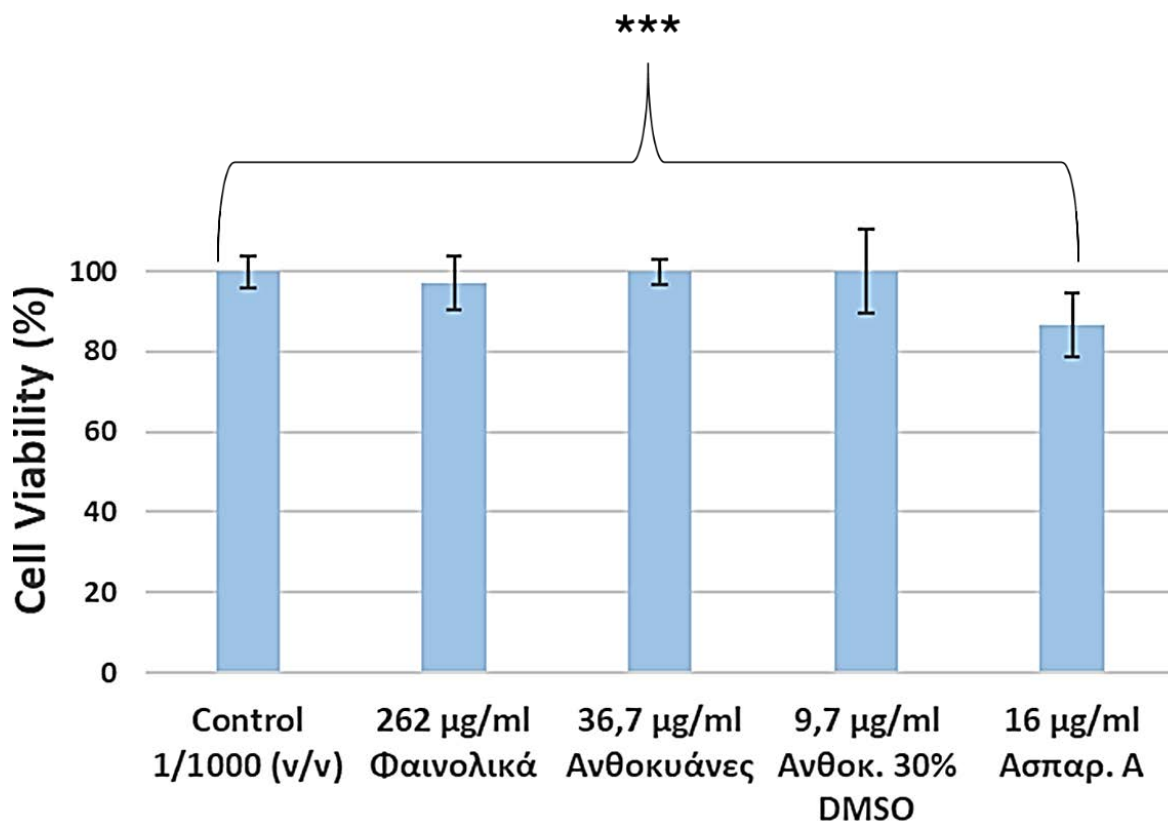
Όσον αφορά τα αποτελέσματα της IC_{50} της ένωσης του Gentisic Acid τόσο σε dH₂O όσο και σε DMSO δεν έδειξαν ιδιαίτερη αναστολή.

Έλεγχος κυτταροτοξικότητας των εκχυλίσμάτων

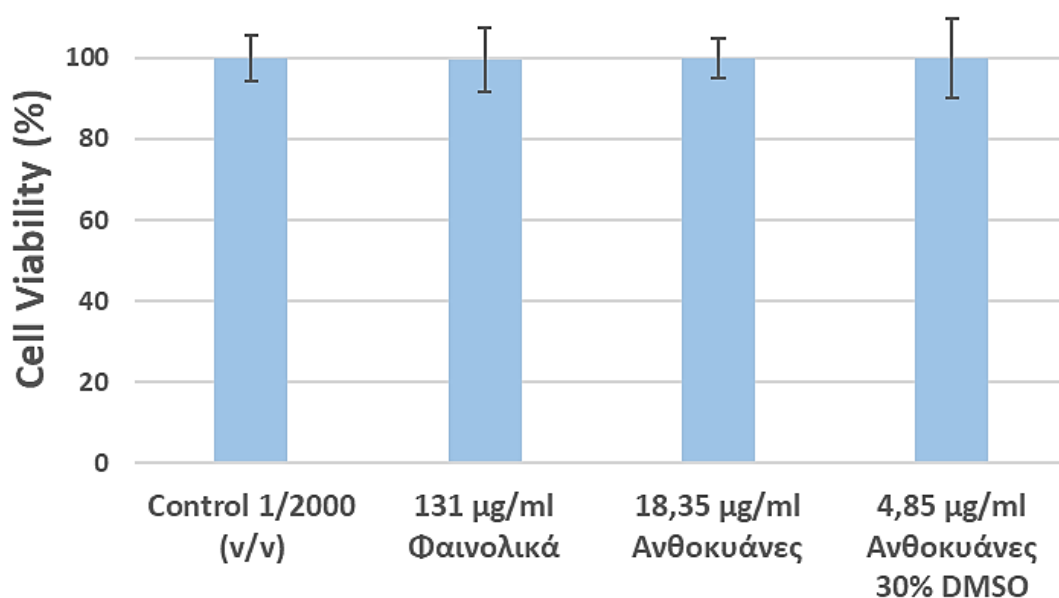
Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος ανθοκυανινών και φαινολικών ενώσεων, καθώς και των εκχυλίσμάτων μανιταριών και του εκχυλίσματος ανθοκυανινών από τα Ασπαραγοειδή, σε κύτταρα HepG2, με στόχο τον προσδιορισμό του εύρους των ασφαλών και μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, εφαρμόστηκε η μέθοδος MTT. Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων σε σχέση με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος, όπου κάθε τιμή αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο από τρεις επαναλήψεις.



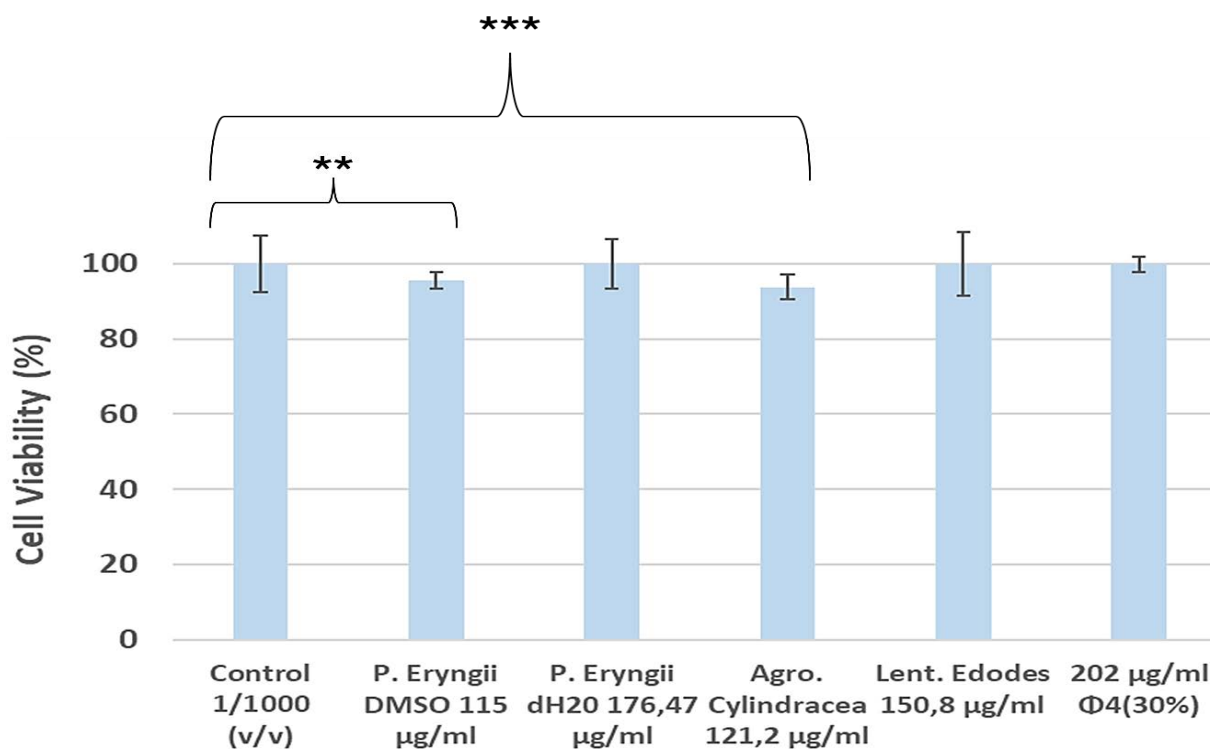
Γράφημα 1: Έλεγχος κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος ανθοκυανινών Ασπαραγοειδή Α σε καρκινικά ηπατοκύτταρα HepG2 με τη δοκιμή του MTT σε συγκέντρωση 1:500 (v/v). Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο control και στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος που δηλώνεται από τους τρεις αστερίσκους και δείχνει μια πολύ ισχυρή διαφορά με $p < 0,001$.



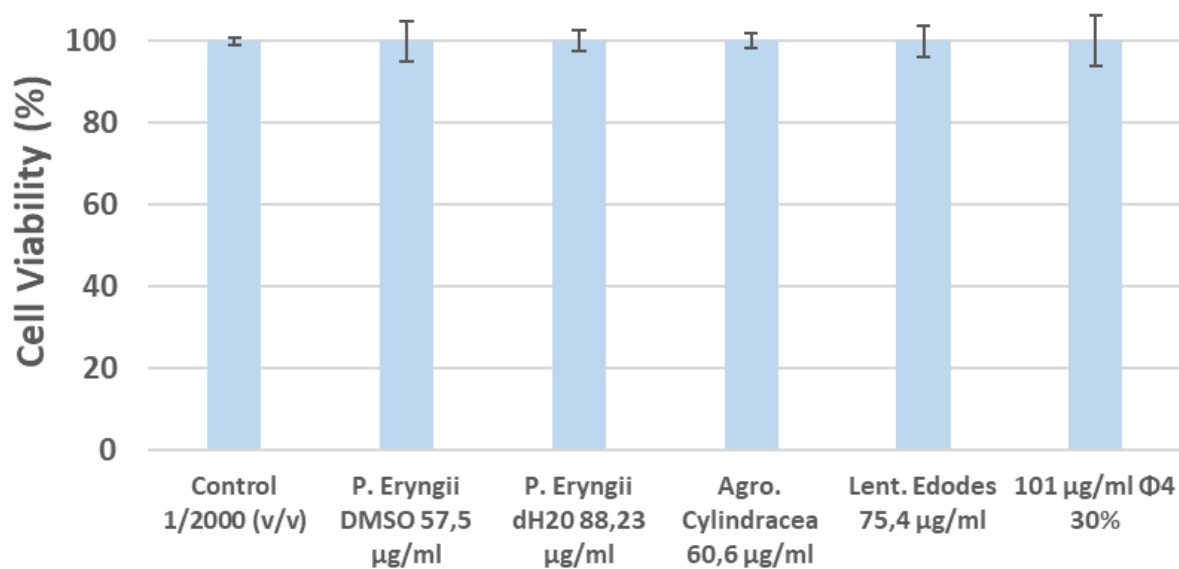
Γράφημα 2: Έλεγχος κυτταροτοξικότητας στα εκχυλίσματα ανθοκυανών και φαινολικών σε συγκέντρωση 1:1000 (v/v). Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο control και στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος ανθοκυανών του Ασπαραγοειδούς που δηλώνεται από τους τρεις αστερίσκους και δείχνει μια πολύ ισχυρή διαφορά με $p < 0,001$.



Γράφημα 3: Έλεγχος κυτταροτοξικότητας στα εκχυλίσματα ανθοκυανών και φαινολικών σε συγκέντρωση 1:2000 (v/v).



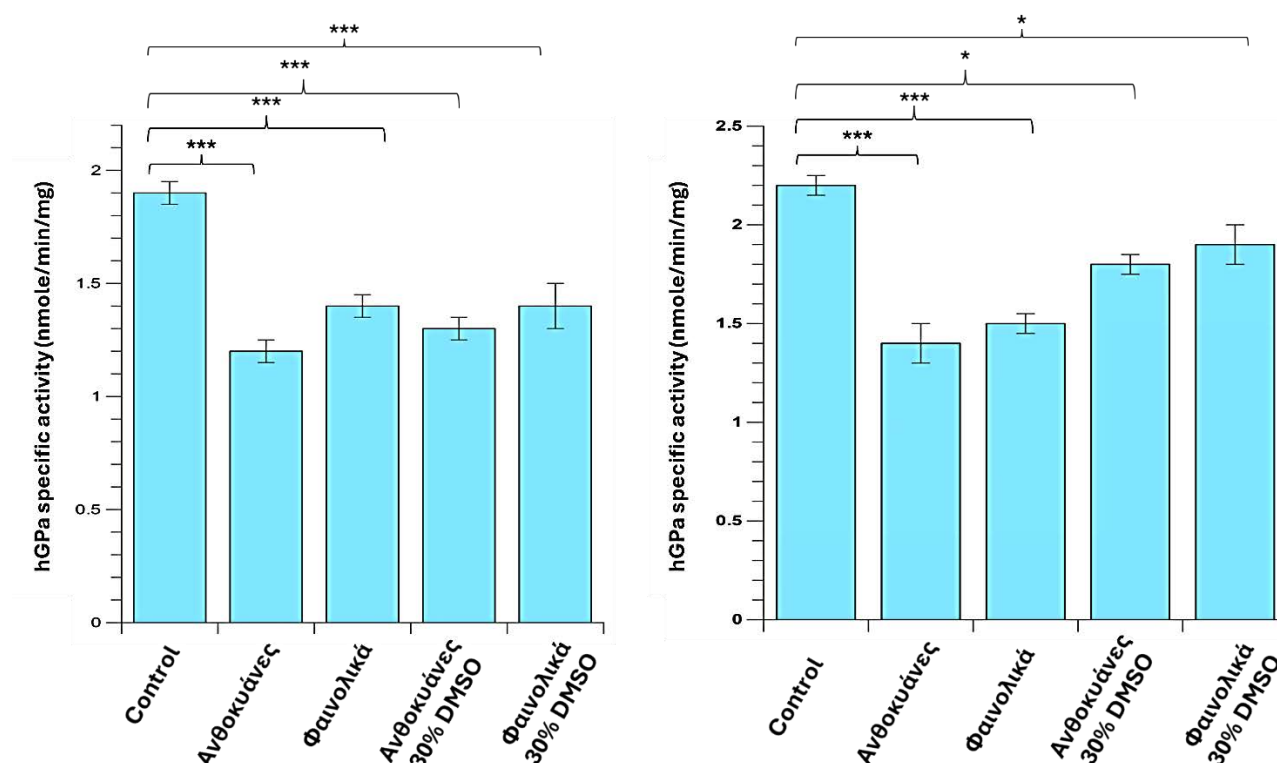
Γράφημα 4: Έλεγχος κυτταροτοξικότητας στα εκχυλίσματα φαινολικών και σε αυτά που προήλθαν από τα μανιτάρια σε συγκέντρωση 1:1000 (v/v). Υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο control και στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος Agro. Cylindracea που δηλώνεται από τους τρεις αστερίσκους και δείχνει μια πολύ ισχυρή διαφορά με $p < 0,001$, ενώ υπάρχει στατιστική διαφορά ανάμεσα στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος P. Eryngii σε DMSO που δηλώνεται από τους δύο αστερίσκους και δείχνει μια διαφορά με $p < 0,01$.



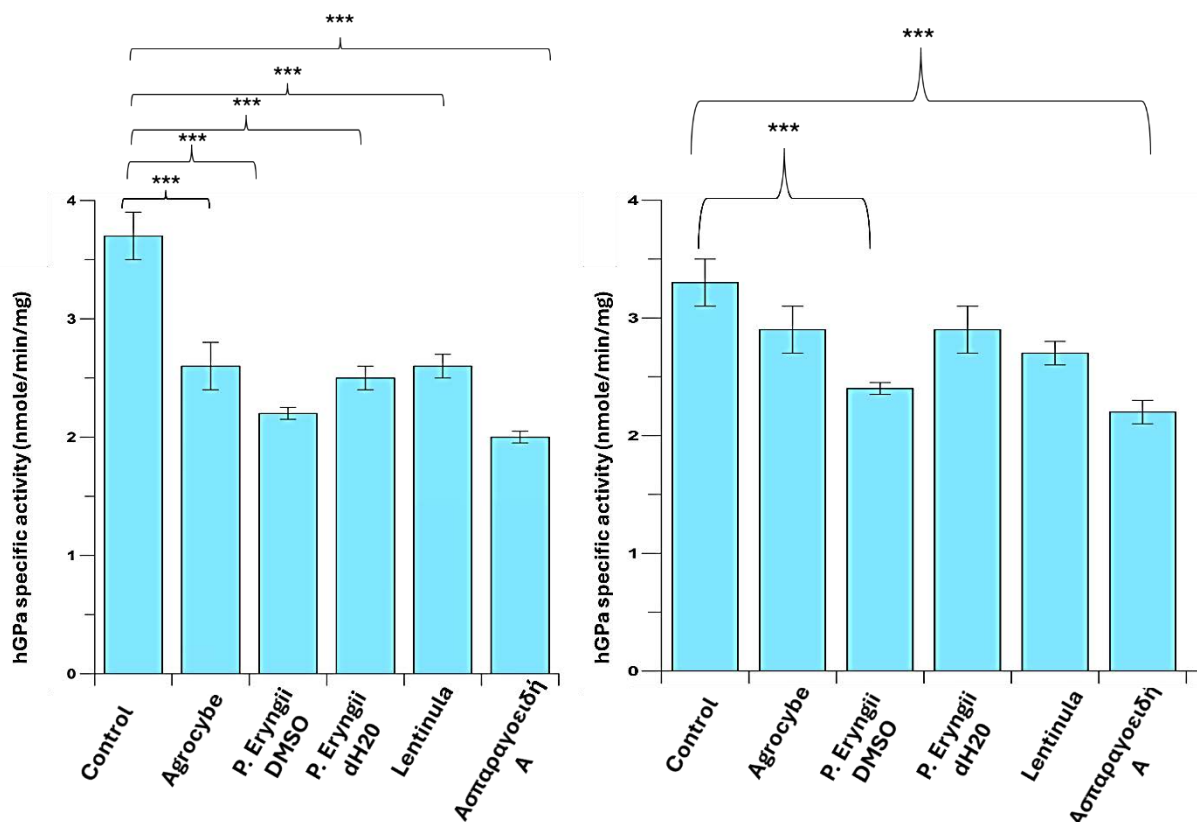
Γράφημα 5: Έλεγχος κυτταροτοξικότητας στα εκχυλίσματα φαινολικών καθώς και σε αυτά που προήλθαν από τα μανιτάρια σε συγκέντρωση 1:2000 (v/v).

Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα προκάλεσε μια μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων HepG2, στις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος από το δείγμα Ασπαραγοειδή Α. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε καμία κυτταροτοξικότητα στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.

Εκ vivo κινητικές μελέτες των εκχυλισμάτων έναντι της hGPb



Γράφημα 6: Διάγραμμα της δραστηριότητας της GP σε αντιδράσεις ελέγχου (χωρίς αναστολέα) και σε αντιδράσεις με αναστολέα (εκχυλίσματα ανθοκυανών και φαινολικών). Η δραστηριότητα της GP εκφράζεται ως nmol / min / mg πρωτεΐνης. Στο γράφημα αριστερά είναι η συγκέντρωση 1:1000 v/v των αναστολέων και στα δεξιά η συγκέντρωση 1:2000 (v/v). Παρατηρούμε στο αριστερό γράφημα πως υπάρχουν στατιστικές σημαντικές διαφορές όλων το δειγμάτων έναντι του control που δηλώνεται με τρεις αστερίσκους και δείχνει μια πολύ ισχυρή διαφορά με $p < 0,001$. Στο δεξί γράφημα τα εκχυλίσματα ανθοκυανών και φαινολικών παρουσιάζουν στατιστικές σημαντικές διαφορές με τρεις αστερίσκους ενώ οι ανθοκυάνες και τα φαινολικά σε DMSO δείχνουν μια στατιστική σημαντική διαφορά που δηλώνεται με έναν αστερίσκο σε σχέση με το control με $p < 0,05$ αλλά όχι τόσο ισχυρή όσο αυτά με τρεις αστερίσκους.



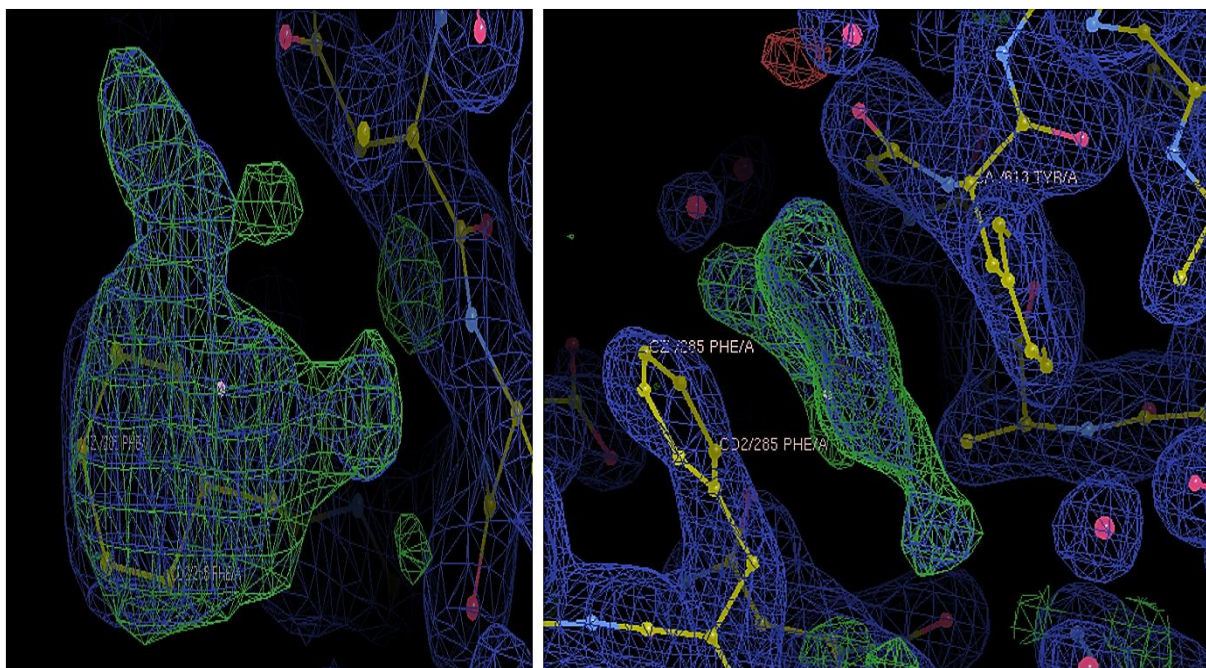
Γράφημα 7: Διάγραμμα της δραστηριότητας της GP σε αντιδράσεις ελέγχου (χωρίς αναστολέα) και σε αντιδράσεις με αναστολέα (εκχυλίσματα μανιταριών και ανθοκυανών από Ασπαραγοειδή). Η δραστηριότητα της GP εκφράζεται ως nmol / min / mg πρωτεΐνης. Στο γράφημα αριστερά είναι η συγκέντρωση 1:1000 (v/v) των αναστολέων και στα δεξιά η συγκέντρωση 1:2000 (v/v). Παρατηρούμε στο αριστερό γράφημα πως υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές όλων το δειγμάτων έναντι του control που δηλώνεται με τρεις αστερίσκους και δείχνει μια πολύ ισχυρή διαφορά με $p < 0,001$. Στο δεξί γράφημα τα εκχυλίσματα του *P. Eryngii* και του Ασπαραγοειδούς παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τρεις αστερίσκους δείχνουν μια στατιστική σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το control.

Οι πειραματικές διαδικασίες έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα αναστέλλουν τη δραστηριότητα της GP σε κύτταρα HepG2. Στο γράφημα 6 παρατηρούμε πως το εκχύλισμα των ανθοκυανών παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αναστολή με περίπου 40% στη συγκέντρωση 1:1000 (v/v) ενώ λίγο μικρότερη και στη συγκέντρωση 1:2000 (v/v). Στο γράφημα 7 παρατηρούμε πως το εκχύλισμα των ανθοκυανών από το Ασπαραγοειδές καθώς και από το μανιτάρι *P. Eryngii* εμφανίζουν με τη μεγαλύτερη αναστολή με περίπου 40% και στις δύο συγκεντρώσεις.

Βιοπληροφορικός έλεγχος πιθανών ενώσεων ως αναστολείς της rmGPb

Ύστερα από την ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και την κατασκευή των χαρτών με τον τρόπο που αναφέρθηκε προηγουμένως δεν βρέθηκε κάποια ένωση στο κέντρο αναστολής λόγω πιθανής τοξικότητας των ενώσεων στους κρυστάλλους της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου εξαιτίας της μεγάλης τους συγκέντρωσης. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν αδημοσίευτα κρυσταλλογραφικά δεδομένα από κρυστάλλους rmGPb του

υποψήφιου διδάκτορα Σεραφείμ Αλεξόπουλου ώστε να γίνει έλεγχος για πιθανές ενώσεις που βρίσκονται στα διαλύματα ανθοκυανών και φαινολικών.



Εικόνα 11: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας (2 Fo-Fc) όπου φαίνεται η πρόσδεση της ένωσης στο κέντρο της αναστολής στον ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (κατάλοιπα 285-613). Στα αριστερά μια πιο διευρυμένη εικόνα όπου φαίνεται ο σχηματισμός του p-stacking. Πηγή: αδημοσίευτα δεδομένα του υποψήφιου διδάκτορα Σεραφείμ Αλεξόπουλου.

Στην συνέχεια εξετάστηκαν με το πρόγραμμα Phenix πιθανές ενώσεις που βρίσκονται στα εκχυλίσματα των δειγμάτων με 15 άτομα άνθρακα 27 άτομα άνθρακα καθώς και άλλες πιθανές ενώσεις όπως φαίνεται στους πίνακες που ακολουθούν:

Compounds	CC(1,2)	CC(1,3)	CC(2,3)	CC(1,2)	CC(1,3)	CC(2,3)	Result
TAN-931	0,5842	0,6081	0,5861	0,6006	0,4552	0,6597	Bulk or noise
Bracteatin	0,6619	0,6992	0,6872	0,6289	0,5035	0,6884	Bulk or noise
Morin	0,5568	0,6291	0,6814	0,457	0,4089	0,643	Bulk or noise
Robinetin	0,5855	0,6444	0,6544	0,5432	0,4532	0,6485	Bulk or noise
Isoetin	0,5515	0,6827	0,6315	0,546	0,5577	0,6092	Bulk or noise
Hypolaetin	0,5578	0,5869	0,5945	0,4577	0,4019	0,6044	Bulk or noise
6-hydroxyluteolin	0,5117	0,6515	0,5777	0,3555	0,4399	0,6081	Bulk or noise
8-hydroxykaempferol	0,5607	0,6332	0,6745	0,4646	0,472	0,5863	Bulk or noise
6-hydroxykaempferol	0,5623	0,6204	0,6554	0,4567	0,5498	0,49	Bulk or noise
2-(4-hydroxyphenyl)-5,6,7,8-tetrahydroxy-4H-1-benzopyran-4-one	0,5443	0,3456	0,5673	0,6534	0,5443	0,6342	Bulk or noise
Tricetin	0,576	0,6517	0,6696	0,4912	0,4952	0,6457	Bulk or noise
5,6,7,3",4"-Pentahydroxyisoflavone	0,5951	0,6889	0,6377	0,5492	0,6305	0,5876	Bulk or noise
2",4",5,7,8-Pentahydroxyisoflavone	0,5567	0,6867	0,6214	0,4709	0,4834	0,5733	Bulk or noise
5,7,8,3",4"-Pentahydroxyisoflavone	0,4579	0,5102	0,4983	0,4603	0,5022	0,5122	Bulk or noise

Πίνακας 12: Ενώσεις με 15 άτομα άνθρακα που εξετάστηκαν στο πρόγραμμα Phenix. Βλέπουμε το CC που μας δείχνει την πιθανότητα η ένωση που τοποθετήσαμε στο κέντρο αναστολής μπορεί να συνδεθεί. Από αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ότι για καμία ένωση το CC δεν είναι μεγαλύτερο από 0.75 .

Μετά την προσθήκη της κάθε ένωσης στο κέντρο αναστολής ακολουθεί η χρήση του προγράμματος Polder Maps με στόχο τη βελτίωση της ακρίβειας και της σαφήνειας των χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας που δημιουργήσαμε με την προσθήκη της κάθε ένωσης. Βελτιώνεται η οπτικοποίηση των ασθενών ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων επιτρέποντας καλύτερη ταυτοποίηση και μοντελοποίηση των ελλειπόντων ατόμων ή μορίων. Αυτό αυξάνει την αξιοπιστία των ατομικών μοντέλων και μειώνει την αβεβαιότητα στην ταυτοποίηση των ενώσεων ως αναστολείς.

Έτσι το πρόγραμμα μας δίνει τα αποτελέσματα που αφορούν τους συντελεστές συσχέτισης CC(1,2), CC(1,3) και CC(2,3) και αφορούν διαφορετικά μέτρα συσχέτισης για να αξιολογήσουν την αξιοπιστία των πειραματικών και υπολογισμένων δεδομένων. Αν τα υποσύνολα αυτά έχουν υψηλή τιμή η οποία είναι μεγαλύτερη από το 0,75 έχουν υψηλή συσχέτιση και αυτό μας δείχνει ότι τα πειραματικά δεδομένα όσο και το μοντέλο που αναπτύξαμε είναι αξιόπιστα και ακριβή.

Στην δικιά μας περίπτωση οι πιθανές ενώσεις που μπορεί να υπάρχουν στο διάλυμα των ανθοκυανών και φαινολικών έδειξαν χαμηλά σκορ κάτω από 0,75 με εξαίρεση το σαλικυλικό οξύ και το σιναπικό οξύ τα οποία εμφάνισαν τιμές μεγαλύτερες από 0,75 όπως φαίνεται στους πίνακες 12,13,14.

Compounds	CC(1,2)	CC(1,3)	CC(2,3)	CC(1,2)	CC(1,3)	CC(2,3)	Result
<i>Petiolaroside</i>	0,4567	0,4356	0,4367	0,3962	0,2339	0,3256	Bulk or noise
<i>Quercetin 4''-O-alpha-L-rhamnopyranosyl-3-O-beta-D-allopyranoside</i>	0,3245	0,4352	0,4362	0,4325	0,4262	0,3256	Bulk or noise
<i>5,6,7,4''-tetrahydroxyflavonol-3-O-rutinoside</i>	0,3245	0,2562	0,5935	0,4256	0,4262	0,3259	Bulk or noise
<i>Quercetin-7-O-[alpha-L-rhamnopyranosyl-(1->6)-beta-D-galactopyranoside]</i>	0,2356	0,5325	0,4324	0,3245	0,3452	0,3562	Bulk or noise
<i>Quercetin 3-O-beta-D-glucopyranosyl-(1->2)-rhamnopyranoside</i>	0,4356	0,5432	0,4563	0,4523	0,5432	0,3425	Bulk or noise
<i>Kaempferol 3-O-beta-D-glucosyl-(1->2)-beta-D-glucoside</i>	0,4252	0,4333	0,5436	0,5495	0,5683	0,5632	Bulk or noise
<i>Lucenin-2</i>	0,5632	0,5532	0,6003	0,5643	0,554	0,6002	Bulk or noise
<i>Isoorientin 7-O-glucoside</i>	0,5934	0,5693	0,5334	0,6053	0,5689	0,5993	Bulk or noise
<i>Kaempferol-3-O-beta-D-glucopyranosyl-7-O-beta-D-glucopyranoside</i>	0,4503	0,4534	0,4983	0,5834	0,5693	0,5385	Bulk or noise
<i>Cyanidin 3,7-di-O-beta-D-glucoside betaine</i>	0,5623	0,4987	0,5102	0,569	0,509	0,5483	Bulk or noise
<i>Cyanin betaine</i>	0,4823	0,45	0,5092	0,5	0,4921	0,4892	Bulk or noise
<i>Quercetin 7-(rhamnosylglucoside)</i>	0,4987	0,5212	0,5109	0,4982	0,5333	0,5102	Bulk or noise
<i>Quercetin 3-galactoside 7-rhamnoside</i>	0,45	0,4923	0,5423	0,5749	0,4825	0,4732	Bulk or noise
<i>Calendoflavobioside</i>	0,5723	0,5724	0,4724	0,4723	0,4273	0,4349	Bulk or noise
<i>Isoquercitrin 4'''-rhamnoside</i>	0,4329	0,4283	0,4824	0,4204	0,4852	0,4724	Bulk or noise
<i>Quercetin 8-C-(2'''-rhamnosylglucoside)</i>	0,5467	0,5353	0,6635	0,6473	0,453	0,6245	Bulk or noise
<i>Quercetin 7-rutinoside</i>	0,4924	0,4243	0,4235	0,5823	0,5735	0,6534	Bulk or noise
<i>Isorhamnetin 3-O-[b-D-xylopyranosyl-(1->6)-b-D-glucopyranoside]</i>	0,4249	0,4298	0,6532	0,5235	0,6532	0,5634	Bulk or noise
<i>Quercetin 3-(2-glucosylrhamnoside)</i>	0,5693	0,593	0,5643	0,6001	0,4593	0,5693	Bulk or noise
<i>Multinoside A</i>	0,5465	0,5346	0,4353	0,5403	0,535	0,5302	Bulk or noise
<i>Panasenoside</i>	0,5772	0,5972	0,7476	0,5387	0,4777	0,7397	Bulk or noise
<i>Meloside L</i>	0,5432	0,5214	0,5324	0,5355	0,6304	0,6093	Bulk or noise
<i>Kaempferol 7-sophoroside</i>	0,6423	0,5439	0,5209	0,5493	0,5434	0,5694	Bulk or noise
<i>Luteolin 6-C-glucoside 8-C-arabinoside</i>	0,6594	0,6503	0,6953	0,6049	0,6059	0,6958	Bulk or noise
<i>Isoorientin 7-glucoside</i>	0,6094	0,6543	0,6844	0,6864	0,6748	0,6745	Bulk or noise
<i>Paeonoside</i>	0,6767	0,7363	0,7295	0,6893	0,6557	0,74	Bulk or noise
<i>Rheinoside A</i>	0,6756	0,72	0,7447	0,604	0,5576	0,678	Bulk or noise
<i>Allivicin</i>	0,6553	0,6453	0,6535	0,6352	0,6473	0,6353	Bulk or noise

Πίνακας 13: Ενώσεις με 27 άτομα άνθρακα που εξετάστηκαν στο πρόγραμμα Phenix. Βλέπουμε το CC που μας δείχνει την πιθανότητα η ένωση που τοποθετήσαμε στο κέντρο αναστολής να μπορεί να συνδεθεί. Από αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται ότι για καμία ένωση το CC δεν είναι μεγαλύτερο από 0.75 .

Compounds	CC(1,2)	CC(1,3)	CC(2,3)	CC(1, 2)	CC(1, 3)	CC(2, 3)	Result
<i>Caffeic acid</i>	0,5785	0,7399	0,7128	0,5917	0,6459	0,7124	Bulk or noise
<i>Genistein</i>	0,6199	0,7582	0,6682	0,5967	0,6289	0,6654	Bulk or noise
<i>3,4-Dihydroxybenzoic acid</i> (<i>Protocatechuic acid</i>)	0,7233	0,7954	0,7215	0,7607	0,7491	0,7327	Bulk or noise
<i>Catechol</i>	0,6051	0,792	0,7167	0,656	0,7598	0,7582	Bulk or noise
<i>4-hydroxybenzoic acid</i>	0,7352	0,7587	0,7102	0,7102	0,7287	0,7152	Bulk or noise
<i>3-hydroxybenzoic acid</i>	0,746	0,7865	0,725	0,7847	0,7338	0,7419	Bulk or noise
<i>Catechin</i>	0,6115	0,7937	0,7114	0,6631	0,7596	0,752	Bulk or noise
<i>Salicylic Acid</i>	0,7064	0,8399	0,7204	0,7387	0,813	0,7444	Is likely to fit
<i>Resveratrol</i>	0,6593	0,6491	0,6041	0,6929	0,5545	0,5668	Bulk or noise
<i>Taxifolin (Dihydro quercetin)</i>	0,6673	0,7189	0,6484	0,6964	0,5922	0,6489	Bulk or noise
<i>3,4,5-Trimethoxy-benzoic acid</i> (<i>eudesmic acid</i>)	0,7131	0,7592	0,6806	0,7274	0,6823	0,7037	Bulk or noise
<i>Tyrosol</i>	0,7124	0,7716	0,6857	0,7666	0,7156	0,7086	Bulk or noise
<i>benzoic acid</i>	0,7216	0,7698	0,6543	0,7527	0,7337	0,7541	Bulk or noise
<i>Syringic acid</i>	0,7085	0,7336	0,6728	0,7404	0,6491	0,688	Bulk or noise
<i>Sinapic acid</i>	0,6713	0,8051	0,6688	0,712	0,7554	0,7006	Is likely to fit
<i>Quinic acid</i>	0,6835	0,7963	0,7769	0,7247	0,7515	0,8065	Bulk or noise
<i>Galangin</i>	0,5695	0,6076	0,7129	0,5769	0,4591	0,7338	Bulk or noise
<i>Pinocembrin</i>	0,6154	0,7393	0,6963	0,6384	0,6237	0,7142	Bulk or noise
<i>Vanillic acid</i>	0,7008	0,7457	0,6968	0,7368	0,674	0,7179	Bulk or noise
<i>Rosmarinic acid</i>	0,6809	0,7006	0,7399	0,5543	0,4692	0,6007	Bulk or noise
<i>Cinnamic acid</i>	0,6192	0,6292	0,7558	0,5719	0,4868	0,7322	Bulk or noise
<i>Maslinic acid</i>	0,4864	0,5764	0,5498	0,4467	0,5498	0,5444	Bulk or noise
<i>Verbascoside</i>	0,4969	0,5897	0,5463	0,5467	0,5396	0,5467	Bulk or noise
<i>Rutin</i>	0,6376	0,5745	0,6528	0,5993	0,5236	0,5565	Bulk or noise
<i>Ethyl caffeate</i>	0,6534	0,7695	0,6076	0,6845	0,6826	0,6873	Bulk or noise
<i>2',4'-Dihydroxychalcone</i>	0,6393	0,6772	0,7532	0,5786	0,5769	0,699	Bulk or noise
<i>2-cis,4-trans-Absciscic acid</i>	0,6384	0,6979	0,7059	0,6154	0,5524	0,7087	Bulk or noise
<i>8-Prenylnaringenin</i>	0,6534	0,6198	0,6376	0,6453	0,6521	0,6372	Bulk or noise
<i>Apigenin</i>	0,4524	0,6405	0,6811	0,3309	0,4804	0,631	Bulk or noise
<i>Epicatechin</i>	0,6204	0,7057	0,7356	0,5728	0,5386	0,6893	Bulk or noise
<i>Eriodictyol</i>	0,5429	0,621	0,7108	0,4736	0,4715	0,7179	Bulk or noise
<i>Ethyl vanillin</i>	0,6689	0,7485	0,7143	0,7091	0,6683	0,7196	Bulk or noise
<i>Ferulic acid</i>	0,6898	0,7376	0,715	0,6599	0,6389	0,6999	Bulk or noise
<i>Gallic acid</i>	0,7511	0,7729	0,7133	0,7932	0,7152	0,726	Bulk or noise
<i>Hesperetin</i>	0,6734	0,6398	0,6368	0,6465	0,6543	0,6328	Bulk or noise
<i>Kaempferol</i>	0,5465	0,6654	0,6342	0,6521	0,6342	0,6742	Bulk or noise
<i>Luteolin</i>	0,5429	0,621	0,7108	0,4736	0,4715	0,7179	Bulk or noise
<i>Myricetin</i>	0,4563	0,6784	0,5678	0,5386	0,4736	0,5674	Bulk or noise
<i>Pinobanksin</i>	0,6432	0,5467	0,6542	0,4326	0,5643	0,5745	Bulk or noise
<i>Naringenin</i>	0,5674	0,5643	0,5646	0,5764	0,5235	0,5543	Bulk or noise
<i>Hydroxytyrosol</i>	0,7397	0,7695	0,6956	0,7997	0,7085	0,7126	Bulk or noise
<i>Homovanillic acid</i>	0,6253	0,7028	0,7211	0,6326	0,6121	0,7092	Bulk or noise
<i>Syringaldehyde</i>	0,673	0,768	0,7097	0,7186	0,7052	0,7326	Bulk or noise
<i>p-coumaric acid</i>	0,6979	0,7766	0,6583	0,7404	0,7286	0,7787	Bulk or noise
<i>Pinoresinol</i>	0,5465	0,6654	0,6342	0,6526	0,6214	0,6242	Bulk or noise
<i>Phloretin</i>	0,5845	0,5445	0,5556	0,5674	0,5647	0,5643	Bulk or noise
<i>Phloridzin</i>	0,5265	0,6154	0,6342	0,6521	0,6342	0,6742	Bulk or noise
<i>Diosmetin</i>	0,4567	0,5467	0,4567	0,3426	0,3935	0,4355	Bulk or noise
<i>Acacetin</i>	0,3256	0,4325	0,4235	0,3566	0,4356	0,4536	Bulk or noise
<i>Sakuranetin</i>	0,6547	0,6753	0,6543	0,6347	0,6845	0,6345	Bulk or noise
<i>Isofraxidin</i>	0,5683	0,519	0,523	0,523	0,534	0,5678	Bulk or noise
<i>Fraxidin</i>	0,6548	0,6834	0,6432	0,6535	0,6453	0,6345	Bulk or noise
<i>Capsaicin</i>	0,5632	0,5534	0,5567	0,5347	0,5783	0,5934	Bulk or noise
<i>Citric acid</i>	0,7595	0,7807	0,7357	0,8015	0,7274	0,7662	Bulk or noise

Πίνακας 14: Επιπλέον ενώσεις που εξετάστηκαν στο πρόγραμμα Phenix. Βλέπουμε το CC που μας δείχνει την πιθανότητα η ένωση που τοποθετήσαμε στο κέντρο αναστολής μπορεί να συνδεθεί. Έτσι βλέπουμε ότι οι πυκνότητες Salicylic Acid και το Sinapic Acid ταιριάζουν στην πυκνότητα του κέντρου αναστολής.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η πιθανή ανασταλτική επίδραση εκχυλισμάτων ανθοκυανινών και φαινολικών από το φυτά Ασπαραγοειδών καθώς και της ένωσης Gentisic acid έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από κουνέλια σε *in vitro* κινητικές μελέτες ενώ ακολούθησε η *ex vivo* μελέτη των εκχυλισμάτων αυτών καθώς επίσης και εκχυλισμάτων από μανιτάρια και εκχύλισμα ανθοκυανινών από φυτά Ασπαραγοειδών έναντι της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας αυτών των εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις με τα αποτελέσματα να μην εμφανίζουν αρνητική επίδραση στα κύτταρα. Ακολούθησε ο έλεγχος της δομική βάσης της αναστολής με κρυσταλλογραφικές μελέτες και ανάλυση με βιοπληροφορικά εργαλεία. Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών έδειξαν αναστολή της φωσφορυλάσης τόσο στα *in vitro* όσο και στα *ex vivo* κινητικά πειράματα ενώ τα αποτελέσματα των δοκιμών κυτταροτοξικότητας δεν εμφάνισαν αρνητικά αποτελέσματα.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια εντοπισμού της ένωσης που προσδένεται στο κέντρο αναστολής. Μέσω του λογισμικού Phenix, εξετάστηκαν πιθανές ενώσεις με δομές που παρουσιάζουν ομοιότητες με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του χάρτη, προκειμένου να εντοπιστεί η βιοδραστική ένωση που αλληλεπιδρά με τη φωσφορυλάση. Από τις ενώσεις που εξετάστηκαν, μόνο το σαλικυλικό οξύ και το σιναπικό οξύ πληρούσαν τις προϋποθέσεις που θέτει το πρόγραμμα, και απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να αποδειχθεί η πιθανή χρήση τους ως αναστολείς.

Συμπερασματικά, τα πειράματα δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα ασκούν ανασταλτική δράση στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, αν και οι δομικές και υπολογιστικές μελέτες δεν κατόρθωσαν να εντοπίσουν την ακριβή δραστική ένωση που ευθύνεται για αυτή τη δράση. Ως μελλοντικός στόχος, προτείνεται η αξιολόγηση του σιναπικού οξέος και του σαλικυλικού οξέος ως πιθανών αναστολέων μέσω κινητικών πειραμάτων, καθώς και η περαιτέρω διερεύνηση της βιοδραστικής ένωσης που προκαλεί την αναστολή στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στη δυνητική χρήση της για την ανάπτυξη αντιυπεργλυκαιμικών φαρμάκων.

5. Βιβλιογραφία

- [1] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS., «Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes.».
- [2] Zois CE, Harris AL., «Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy,» *Journal of Molecular Medicine*, αρ. 94, 2016.
- [3] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L., Biochemistry, 7 επιμ., New York: W.H. Freeman, 2012.
- [4] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L., Biochemistry, 7th ed. επιμ., New York: W.H. Freeman, 2012.
- [5] Thorens B, Mueckler M., «Glucose transporters in the 21st Century,» *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, Τόμ. 1 από 2E141-5, αρ. 298.
- [6] Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S, «Molecular biology of mammalian glucose transporters,» *Diabetes Care*, αρ. 13, pp. 198-208, March 1990.
- [7] Qaid & Abdelrahman, «Role of insulin and other related hormones in energy metabolism- A review,» *Cogent Food & Agriculture*, 2016.
- [8] DYANNE P. WESTERBERG, DO, «Diabetic Ketoacidosis:Evaluation and Treatment». *Cooper Medical School of Rowan University, Camden, New Jersey*.
- [9] Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS., «Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes Biochem J,» pp. 763-787, 2012.
- [10] Mathieu BOLLEN , Stefaan KEPPENS and Willy STALMANS, «Specific features of glycogen metabolism in the liver,» *Biochem J*, 1998.
- [11] Kantsadi AL, Bokor E, Kun S, Stravodimos GA, Chatzileontiadou DS, Leonidas DD, et al, «Synthetic,enzyme kinetic, and protein crystallographic studies of C-beta-dglucopyranosyl pyrroles and imidazoles reveal and explain low nanomolar inhibition of human liver glycogen phosphorylase,» *Eur J Med Chem*, 2016.

- [12] Mathieu C, de la Sierra-Gallay IL, Duval R, Xu X, Cocaïgn A, Leger T, et al., «Insights into Brain Glycogen Metabolism: THE STRUCTURE OF HUMAN BRAIN GLYCOGEN PHOSPHORYLASE,» *J Biol Chem*, 2016.
- [13] Oikonomakos, N.G., «Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy,» *Curr. Protein Pept. Sci*, 2002.
- [14] Oikonomakos, N. G., «New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents,» *Curr. Med. Chem*, pp. 2933-2983, 2008.
- [15] Favaro, E., Bensaad, K., Chong, M. G., Tennant, D. A., Ferguson, D. J. P., Snell, C., Harris, A. L., «Glucose Utilization via Glycogen Phosphorylase Sustains Proliferation and Prevents Premature Senescence in Cancer Cells,» *Cell Metabolism*, ap. 3, pp. 751-764, 2012.
- [16] Harvey, A. L., Edrada- Ebel, R. & Quinn, R. J., «The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era,» *Nat. Rev. Drug Discov.*, ap. 14, p. 111–129, 2015.
- [17] Atanas G. Atanasov, Sergey B. Zotchev, Verena M. Dirsch , the International Natural Product Sciences Taskforce and Claudiu T. Supuran, «Natural products in drug discovery: advances and opportunities,» *Nature Reviews | Drug Discovery*, 2021.
- [18] Cragg, G. M., Schepartz, S. A., Suffness, M. Grever, M. R., «The taxol supply crisis New NCI policies for handling the large- scale production of novel natural product anticancer and anti- HIV agents.,» *J. Nat. Prod*, p. 1657–1668, 1993.
- [19] Fabiana Giglio, Maria Antonietta Castiglione Morelli , Ilenia Matera, Chiara Sinisgalli, Rocco Rossano, «Muscari comosum L. Bulb Extracts Modulate Oxidative Stress and Redox Signaling in HepG2 Cells,» *Molecules*, 2021.
- [20] Toma, I. S., et al, «Flavonoids and saponins in Mediterranean plants: A review of their bioactivities and potential uses,» *Phytotherapy Research*, pp. 453-462, 2014.
- [21] Mattila P, Konko K, Eurola M et. al., «Contents of vitamins,mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms,» *J Agric Food Chem*, ap. 49, p. 2343–2348, 2001.
- [22] Zervakis, G.I., Venturella, G., and Papadopoulou, K., «Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by

- RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters,» *Microbiology*, ap. 147, p. 3183–3194, 2001a.
- [23] Wasser, S.P., and Weis, A.L., «Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review).,» *Int. J. Med. Mushrooms*, ap. 1, pp. 31-62, 1999.
- [24] Wasser, S.P., «Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, ap. 60, pp. 258-274, 2002.
- [25] Ali, S.H., «The World of β -Glucans—A Review of Biological Roles Applications and Potential Areas of Research,» *University Hospital of North Norway, Tromsø*, 2010.
- [26] H.O. Kim a, J.M. Lim a, J.H. Joo a, S.W. Kim a, H.J. Hwang a, J.W. Choi b, J.W. Yun, «Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*».
- [27] Elena Rosello-Soto et.al., «Application of Non-conventional Extraction Methods: Toward a Sustainable and Green Production of Valuable Compounds from Mushrooms,» *Food Eng Rev*, ap. 8, p. 214–234, 2016.
- [28] Andrea P. Sánchez-Camargo, Lidia Montero, Jose A. Mendiola, M. Herrero,, «Novel Extraction Techniques for Bioactive Compounds from Herbs and Spices,» *Herbs, Spices and Medicinal Plants: Processing, Health Benefits and Safety*, 2020.
- [29] Tsuda T., «Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies,» *Mol Nutr Food Res*, pp. 159-170, 2012.
- [30] Morton, L. W., Caccetta, R. A-A., Puddey, I. B., & Croft, K. D., «Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds:relevance to cardiovascular disease,» *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, pp. 152-162, 2000.
- [31] Van Holde KE, Curtis W, Shing Ho P., «Principles of Physical Biochemistry,» *Pearson Education*, 2006.
- [32] Branden C, Tooze J, «Introduction to protein structure,» 1999.
- [33] Two Methods, One Goal: Structural Differences between Cocrystallization and Crystal Soaking to Discover Ligand Binding Poses, «Dr. Barbara Wienen-Schmidt, Matthias Oebbeke, Dr. Khang Ngo, Prof. Dr. Andreas Heine, Prof. Dr. Gerhard Klebe,» 2020.

- [34] P Emsley, B Lohkamp, W Scott, and K Cowtan *Acta Cryst*, «Features and Development of Coot,» *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, τόμ. 66, pp. 486-501, 2010.
- [35] D. Liebschner, P. V. Afonine, M. L. Baker, G. Bunkóczi, V. B. Chen, T. I. Croll, B. Hintze, L. W. Hung, S. Jain, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. D. Oeffner, B. K. Poon, M. G. Prisant, R. J. Read, J. S. Richardson, D. C. Richardson, M. D. Sammito,, «Macromolecular structure determination using x-rays, neutrons and electrons: recent developments in phenix.,» *Acta Crystallogr D Struct Biol*, αρ. 75, p. 861–877, 2019.
- [36] D. Liebschner, P. V. Afonine, N. W. Moriarty, B. K. Poon, O. V. Sobolev, T. C. Terwilliger and P. D. Adams,, «Polder maps: Improving OMIT maps by excluding bulk-solvent,» *Acta Cryst. D.*, αρ. 73, pp. 148-157.
- [37] T.C. Terwilliger, P.D. Adams, N.W. Moriarty, and J.D. Cohn, «Ligand identification using electron-density map correlations,» *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, αρ. 63, pp. 101-107, 2006.
- [38] Elizabeth Potterton, Peter Briggs, Maria Turkenburg and Eleanor Dodson, «A graphical user interface to the CCP4 program suite,» *Acta. Cryst. D59*, pp. 1131-1137, 2003.
- [39] G. Murshudov, A.Vagin and E.Dodson, «Application of Maximum Likelihood Refinement,» *in the Refinement of Protein structures, Proceedings of Daresbury Study Weekend*, 1996.
- [40] Tadeusz Skrzynski,, London, 1988.
- [41] Price NC, Stevens L, *Fundamentals of Enzymology: Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins*, 3η επιμ., Oxford University Press, 2015.
- [42] Leatherbarrow RJ, «GraFit version 4.06,» 1998.
- [43] [Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.cretanflora.com/bellevalia_dubia.html.

6. Παράρτημα

Όργανο	Εταιρία
Ζυγός ακριβείας KERN	KERN
Πεχάμετρο Metrohm	Metrohm
Υδατόλουτρο Wisd	Wisd
Φωτόμετρο VWR	VWR
Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους- ορατού (UV-VIS)	VWR
Plate φασματοφωτόμετρου	Sigma
Φυγόκεντρος	HermLe Z36 HK
Sonicator:	Helscher Ultrasound Technologies, modelUP400S
Επωαστικός κλίβανος CO ₂	Galaxy 170S, New Brunswick

Αντιδραστήρια

Ammonium Molybdate tetrahydrate	Sigma
BES	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	New England Biolabs
Dithiothreitol (DTT)	Panreac
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Applichem
Glycogen	Panreac
Hepes	Sigma
Hydrochloric Acid (HCl)	Serva
Imidazole	Applichem
L-Ascorbic acid	Sigma
Potassium Chloride (KCl)	Sigma
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck

Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Zinc Acetate	Sigma
α -D-glucose-1-phosphate	Sigma
β -GP	Sigma