



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

**«ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

**«ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ».**

**«BIOACTIVITY ASSESSMENT OF NATURAL
PRODUCTS AS ANTIGLYCAEMIC AGENTS».**

Τίτλος : «ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ».

Όνομα : Δημήτριος Ασημακόπουλος

Επιβλέπων καθηγητής : Βασιλική Σκαμνάκη

Εργαστήριο : Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ.

ΔΗΜΗΤΡΗΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ.

ΧΡΥΣΑΥΓΗ ΓΑΡΔΕΛΗ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ, ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ.

Περιεχόμενα

I.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
II.	ABSTRACT	7
III.	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	8
A.	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
1.1	Σακχαρώδης διαβήτης	9
1.2	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης)	11
1.3	Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (Μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης)	11
1.4	Γλυκογόνο	12
1.5	Μεταβολισμός του γλυκογόνου	14
1.6	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	15
1.7	Φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως φαρμακευτικός στόχος.....	17
1.8	Κέντρα.....	18
1.8.1	Καταλυτικό	18
1.8.2	Κέντρο αναστολής.....	19
1.8.3	Κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου	19
1.8.4	Αλλοστερικό κέντρο.....	20
1.8.5	Νέο αλλοστερικό κέντρο	20
1.8.6	Κέντρο πρόσδεσης κερσετίνης.....	20
1.9	Κίνηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (ρόλος, δομή, λειτουργία)	22
1.10	Κίνηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως φαρμακευτικός στόχος	22
1.11	Ανθοκυανίνες ροδιού και φαρμακευτικός ρόλος	23
IV.	Σκοπός.....	27
B.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	28
	Αντιδραστήρια	28
	Οργανολογία	29
B.1	Παρασκευαστικές μέθοδοι	29
2.1	Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου-β από σκελετικούς μύες κουνελιών ποικιλίας <i>Oryctolagus cuniculus</i>	30
2.2	Τα στάδια απομόνωσης της (rmGPb, Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase-b) είναι τα ακόλουθα:.....	31
B.2	Αναλυτικές μέθοδοι	34
2.3	Ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφορητικές τεχνικές	34
2.4	Προετοιμασία πηκτής ηλεκτροφόρησης	34

2.5	Κινητικές μελέτες της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου.....	35
2.6	Προσδιορισμός της ειδικής δραστικότητας → GPb	35
2.7	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου.....	36
2.7.1	Παρασκευή των διαλυμάτων ασκορβικού οξέως και διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου και οξικού ψευδαργύρου.....	36
2.8	Φωσφορυλίωση GP.....	37
2.9	Ενζυμικό διάλυμα	38
2.10	Υποστρώματα	38
2.10.1	Παρασκευή υποστρωμάτων για τον προσδιορισμό IC50 στην h1GPα με εκχύλισμα ροδιού (0,838 μg/ml).	39
2.10.2	Παρασκευή υποστρωμάτων για τον προσδιορισμό IC50 στην gmGPb με εκχύλισμα ροδιού (0,383 μg/ml).	40
2.11	Προσδιορισμός αναστολέα IC ₅₀	41
2.12	Ανάλυση των κινητικών δεδομένων με το πρόγραμμα «Grafit».	41
2.13	Προσδιορισμός γλυκόζης στο εκχύλισμα ροδιού	42
2.14	Κινητική μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	42
2.15	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός στα εκχυλίσματα ροδιού	45
Γ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
3.1	Απομόνωση – Καθαρισμός της gmGPb.....	46
3.2	Προσδιορισμός γλυκόζης στο εκχύλισμα ροδιού	47
3.3	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός στο εκχύλισμα ροδιού	47
3.4	Κινητική μελέτη του εκχυλίσματος ροδιού, ποικιλίας «Ερμιόνη»	48
3.5	Κινητικές μελέτες στην κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	50
V.	Συζήτηση.....	51
VI.	Παράρτημα	52
Δ.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα και αποτελεί μια σύνθετη ασθένεια που οφείλεται σε ευρύ φάσμα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Αυτός ο σχεδιασμός αναστολέων της φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*), που αποτελεί καθοριστικό ένζυμο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου, όσο και στην κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*PhK*), στοχεύει στην δημιουργία νέων φαρμάκων με υπογλυκαιμικές ιδιότητες. Οι αναστολείς θεωρούνται ως δυνητικοί αντι-διαβητικοί παράγοντες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η ανασταλτική δράση ανθοκυανινών, που εμπεριέχονται σε εκχύλισμα ροδιού ελληνικής ποικιλίας «Ερμιόνη», στην ηπατική και μυϊκή ισομορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου καθώς και στην κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε απομόνωση της GP από μύες κονίκλων (*rmGPb*) και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες τόσο στη *rmGPb* όσο και στην φωσφορυλιωμένη *hlGPa* και *PhK*. Οι τιμές των σταθερών αναστολής IC_{50} που υπολογίστηκαν για το εκχύλισμα ροδιού έναντι της *hlGPa* ήταν $0.32 \mu\text{g/ml}$, έναντι της *rmGPb* ήταν $0.83 \mu\text{g/ml}$, ενώ δεν εμφανίστηκε κάποια αναστολή έναντι της *PhK*.

II. ABSTRACT

Diabetes mellitus is characterized by high blood sugar levels and is a complex disease caused by a wide range of genetic and environmental factors. This the design of inhibitors of both glycogen phosphorylase (GP), a key enzyme in glycogen metabolism, and glycogen phosphorylase kinase (PhK), target the the development of novel drugs with hypoglycemic properties. Inhibitors are considered as potential anti-diabetic agents.

In the present thesis, the inhibitory effect of anthocyanins, contained in a pomegranate extract of the Greek variety "Ermioni", on the hepatic and muscular isoform of glycogen phosphorylase and glycogen phosphorylase kinase were studied. Specifically, rabbit muscle (rmGP) was isolated from GP and kinetic studies were then performed on both rmGPb and phosphorylated hGPa as well as PhK. The IC₅₀ inhibition constants values calculated for the pomegranate extract against hGPa were 0.32 µg / ml, against rmGPb was 0.83 µg / ml, and no inhibition was observed against PhK.

III. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στις εγκαταστάσεις του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (ΛΑΡΙΣΑ) το χρονικό διάστημα Φεβρουάριο 2019 - Οκτώβριο 2019. Επίσης το ερευνητικό τμήμα της διπλωματικής εργασίας διεκπεραιώθηκε στο εργαστήριο **Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας** υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική για το αμείωτο ενδιαφέρον και την πολύτιμη βοήθεια της καθώς και την καθοδήγηση σε όλη την διάρκεια της πειραματικής πορείας δίνοντας συμβουλές οι οποίες ήταν καταλυτικές για την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας τα οποία μέσω της βοήθειας και του ευχάριστου κλίματος με βοήθησαν στην ομαλή ένταξη μου στο εργαστηριακό χώρο. Ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Κούλα Συμεών και Τσαγκαράκου Αναστασία για την στήριξη και την υπομονή τους σε όλα στα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

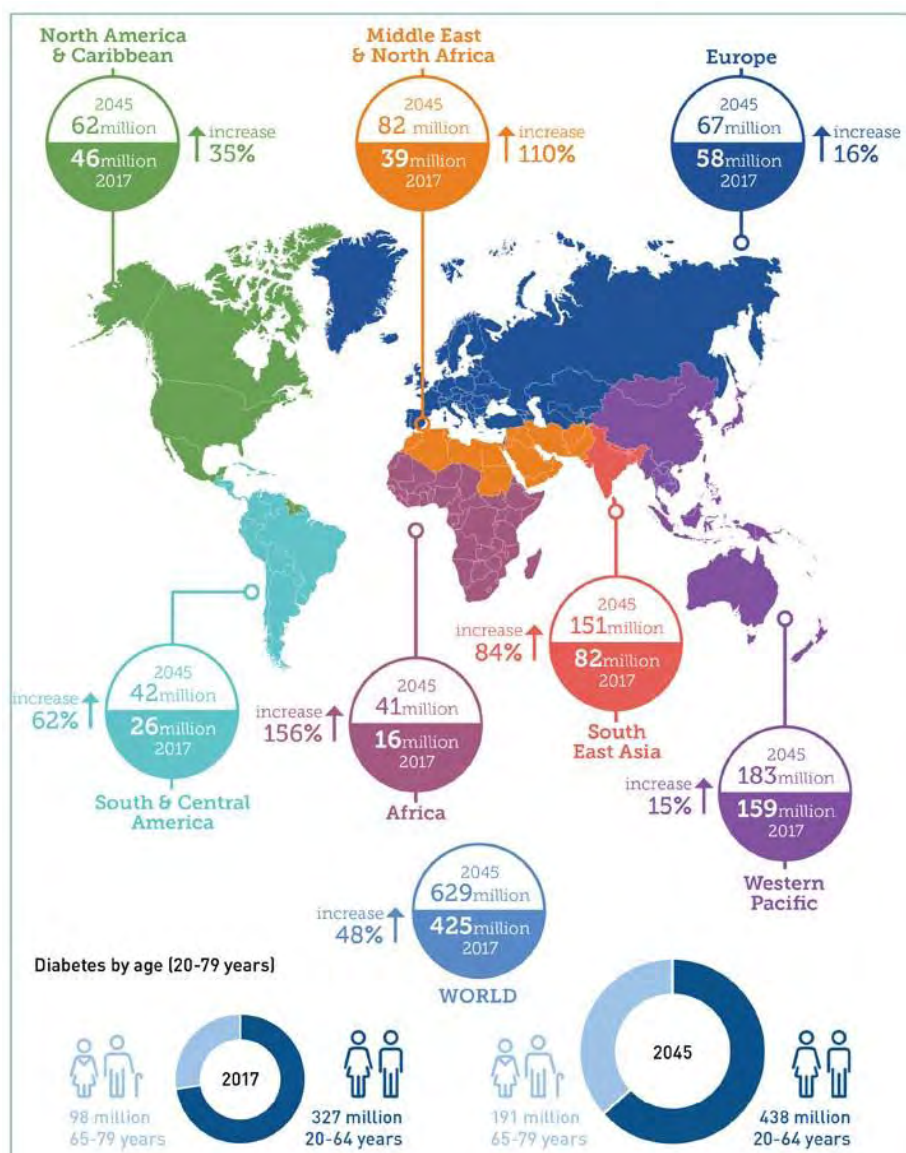
Τέλος , θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αμέριστη ηθική και υλική τους στήριξη όλα τα χρόνια των σπουδών μου, τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας που ήταν πάντα πρόθυμα να απαντήσουν σε κάθε ερώτησή μου και έδειξαν την απαραίτητη υπομονή μέχρι την προσαρμογή και την ένταξη μου, ως νέο μέλος, σε αυτή την ομάδα καθώς και τους φίλους μου.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια μεταβολική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία που οφείλεται στην ανεπάρκεια παραγωγής και έκκρισης ινσουλίνης καθώς και στην αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης ή και τα δύο (American Diabetes Association, 2014). Η ανεξέλεγκτη υπεργλυκαιμία μπορεί να οδηγήσει σε λήθαργο, κώμα και χωρίς την κατάλληλη θεραπεία οδηγεί σε θάνατο (Kharroubi & Darwish, 2015). Κατηγοριοποιείται σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και σακχαρώδη διαβήτη κύησης. Επίσης εκτός από αυτές τις τρεις κατηγορίες που αναφερθήκαμε, υπάρχουν και κάποιες κατηγορίες διαβήτη ειδικές, όπως η γενετήσια έλλειψη των β-παγκρεατικών κυττάρων, ενδοκρिनοπάθειες, μολύνσεις, ασθένειες του εξωκρινούς παγκρέατος και διαβήτης επαγόμενος από φάρμακα και χημικά.

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια σύνθετη ασθένεια που περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Πολλές μελέτες έχουν στραφεί στην αποσαφήνιση του ευρέος φάσματος γονιδίων που διαδραμάτισαν ρόλο στον μοριακό μηχανισμό ανάπτυξης διαβήτη (Frayling, 2007). Ωστόσο, παρά την τεράστια ροή των γενετικών πληροφοριών, συμπεριλαμβανομένης της αναγνώρισης πολλών γονιδιακών μεταλλάξεων και μιας μεγάλης σειράς μονοπυρηνικών πολυμορφισμών (SNPs) σε πολλά γονίδια που εμπλέκονται στις μεταβολικές οδούς που επηρεάζουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, ο ακριβής γενετικός μηχανισμός του διαβήτη παραμένει ασαφής (Doria *et al.*, 2008).



Εικόνα 1. Αριθμός ατόμων με διαβήτη σε παγκόσμια κλίμακα ανά περιοχή το έτος 2017 ως το 2045 (Πηγή: International Diabetes Federation, IDF, Diabetes Atlas 8th edit. Brussels, Belgium, International Diabetes Federation, 2017).

Εκτός από τον εμφανή διαβήτη, ο IDF εκτιμά ότι άλλα 352,1 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως θα έχουν προκαταρκτικό στάδιο διαβήτη, ποσοστό που αναμένεται να αυξηθεί 531,6 εκατομμύρια το 2045. Σε παγκόσμια κλίμακα, ο

διαβήτης πλήττει ιδιαίτερα τους «μεσήλικες» ανθρώπους μεταξύ 40 και 59 ετών, οι οποίοι προκαλούν σοβαρές οικονομικές και κοινωνικές επιπτώσεις. Επιπλέον, ο διαβήτης πλήττει ιδιαίτερα τις χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος, καθώς το 76% όλων των ατόμων που πάσχουν από διαβήτη παγκοσμίως ζει σε αυτές τις χώρες (IDF Diabetes Atlas, 2017).

1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (Ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης)

Ο διαβήτης τύπου 1 ονομάζεται ως ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης. Ονομάζεται και ως νεανικός διαβήτης, επειδή εμφανίζεται στην παιδική ηλικία. Εκκρίνεται ανεπαρκής ινσουλίνη από το πάγκρεας για τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Οι κετόνες παράγονται από το συκώτι ως εναλλακτική πηγή ενέργειας, ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα των κετονών μπορούν να οδηγήσουν σε μια επικίνδυνη κατάσταση γνωστή ως κετοξέωση. Διάφοροι κίνδυνοι συνδέονται με την συγκεκριμένη μορφή διαβήτη (Chiang et al., 2014). Τα άτομα με την συγκεκριμένη μορφή διαβήτη υπόκεινται σε θεραπεία με ενέσεις (Devendra et al., 2004).

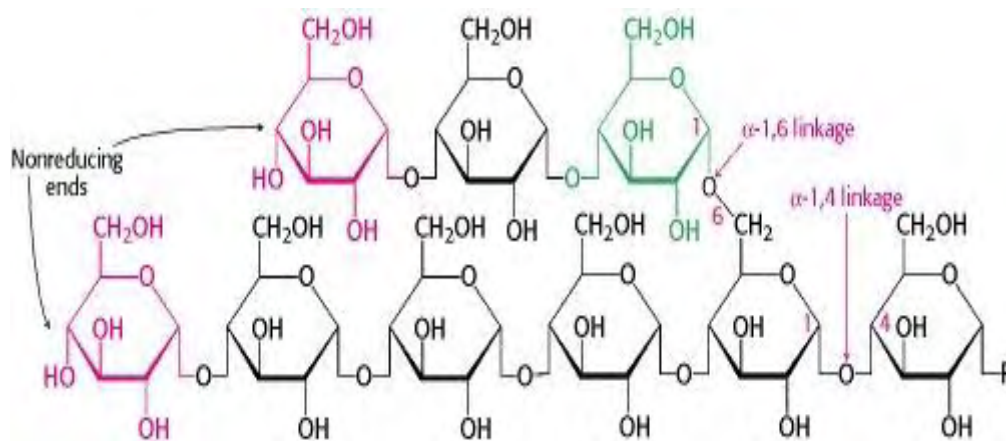
1.3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (Μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης)

Μέχρι στιγμής, η πιο συνηθισμένη μορφή διαβήτη είναι ο διαβήτης τύπου 2, που αντιπροσωπεύει το 95% των περιπτώσεων σε ενήλικες και είναι μια πιο ήπια μορφή διαβήτη από τον τύπο 1. Το πάγκρεας παράγει ινσουλίνη αλλά η ποσότητα που παράγεται δεν είναι αρκετή για τις ανάγκες του οργανισμού ή τα κύτταρα του σώματος είναι ανθεκτικά σε αυτό (Dabelea et al., 2009). Ο διαβήτης τύπου 2, μπορεί να προκαλέσει σημαντικές επιπλοκές στην υγεία. Ιδιαίτερα στα μικρότερα αιμοφόρα αγγεία του σώματος που τρέφουν τα νεφρά, τα νεύρα και τα μάτια. Ο διαβήτης τύπου 2 αυξάνει τον κίνδυνο καρδιακής νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου.

Τα άτομα που πάσχουν από παχυσαρκία διατρέχουν ιδιαίτερα υψηλό κίνδυνο για ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2, διότι παρουσιάζουν αντίσταση στην ινσουλίνη. Με την αντίσταση στην ινσουλίνη, το πάγκρεας πρέπει να εργαστεί υπερβολικά σκληρά για να παράγει περισσότερη ινσουλίνη. Ωστόσο μπορεί να ελέγχεται με την διαχείριση του βάρους, σωστή διατροφή και άσκηση. (Dabelea et al., 2009).

1.4 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο αποτελεί μια εύκολα κινητοποιημένη μορφή αποθήκευσης γλυκόζης. Πρόκειται για ένα διακλαδισμένο πολυμερές υπολειμμάτων γλυκόζης το οποίο διασπάται για να δώσει μόρια γλυκόζης όταν ο οργανισμός απαιτεί ενέργεια. Τα μόρια της γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με α -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α -1,6-γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι εντοπίζονται ανά δέκα μόρια γλυκόζης. (Stryer, 1997).

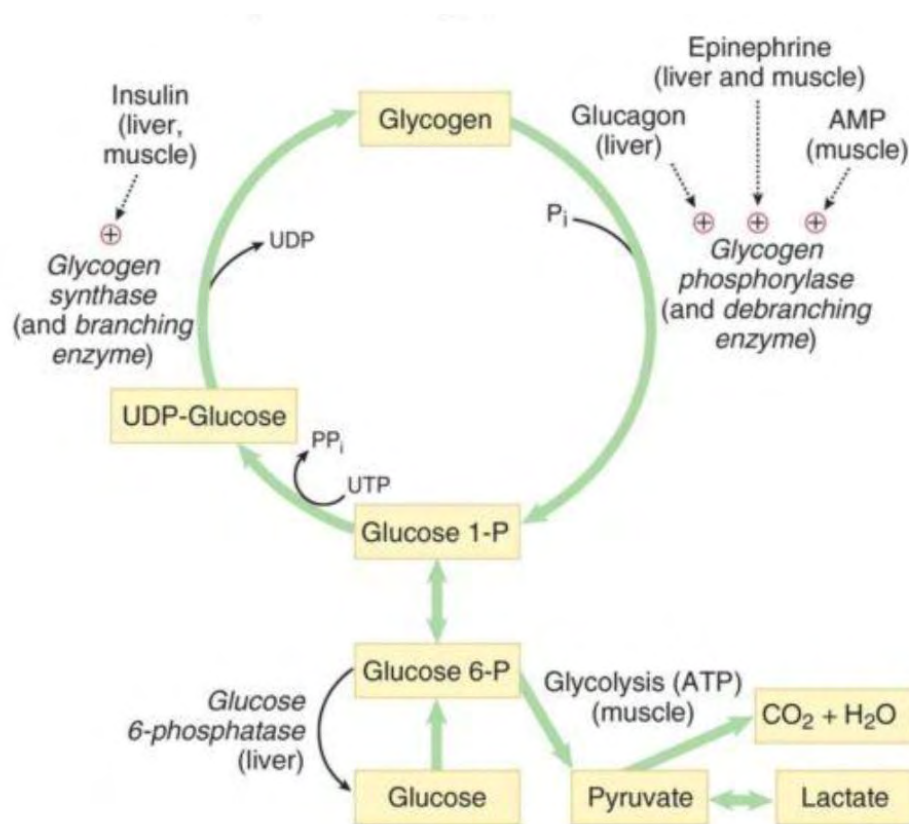


Εικόνα 2. Δομή του μορίου του γλυκογόνου (Πηγή: Berg et al., 2002).

Ο ρόλος του γλυκογόνου είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα διότι το μοναδικό καύσιμο που χρησιμοποιείται από τον εγκέφαλο, ουσιαστικά είναι η γλυκόζη. Η γλυκόζη κινητοποιείται εύκολα από το γλυκογόνο και ως εκ τούτου αποτελεί πηγή ενέργειας για οποιαδήποτε επίπονη δραστηριότητα στην καθημερινότητα.

Το ήπαρ καθώς και οι σκελετικοί μύες αποτελούν τις κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου. Το ήπαρ παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση από ότι παρουσιάζουν οι μύες, σε γλυκογόνο. Το ποσοστό αυτό για το ήπαρ κυμαίνεται στο 10% ενώ 2% για τους μύες. Στους σκελετικούς μύες ωστόσο, αποθηκεύεται μεγαλύτερη ποσότητα γλυκογόνου λόγω του ότι στους σκελετικούς μύες η μάζα είναι μεγαλύτερη.

1.5 Μεταβολισμός του γλυκογόνου



Εικόνα 3: Βασικές οδοί σύνθεσης και αποικοδόμησης του γλυκογόνου. Η σύνδεση του γλυκογόνου αρχικά γίνεται με πρόσληψη της εξωκυτάριας γλυκόζης από τα κύτταρα μέσω του μεταφορέα της γλυκόζης. Απαιτεί το σχηματισμό UDP-γλυκόζης από G1P και UTP, που καταλύεται από την πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης. Η γλυκαγονίνη-1 μέσω του μεγάλου της καρβοξυτελικού άκρου αλληλεπιδρά απευθείας με τη συνθάση του γλυκογόνου η οποία είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης του γλυκογόνου καταλύοντας το σχηματισμό των α -1,4 γλυκοσιδικών δεσμών χρησιμοποιώντας την UDP-γλυκόζη ως δότη γλυκοζυλίου. Το ένζυμο διακλάδωσης (GBE) του γλυκογόνου καταλύει τη μεταφορά μορίων α -1,4 γλυκόζης συνδεδεμένων στο εξωτερικό «μη αναγωγικό» άκρο μιας αναπτυσσόμενης αλυσίδας γλυκογόνου σε μια θέση α -1,6 της ίδιας αλυσίδας ή γειτονικής. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου απαιτεί το συγχρονισμό της ενεργοποίησης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και του ενζύμου αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση γλυκογόνου απελευθερώνει G1P από τον α -1,4 γλυκοσιδικό δεσμό και το ένζυμο αποδιακλάδωσης καταλύει την απομάκρυνση των διακλαδώσεων. Το GDE μεταφέρει 3 μόρια γλυκόζης σε μια άλλη αλυσίδα γλυκογόνου και μετά διασπά υδρολυτικά το εναπομείνον μόριο γλυκόζης της διακλάδωσης, παράγοντας ελεύθερη γλυκόζη. Η G1P που προέρχεται από το γλυκογόνο και η ελεύθερη γλυκόζη μπορούν να εισέλθουν στο μονοπάτι της γλυκολυτικής πορείας. (Zois et al.,2016).

1.6 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

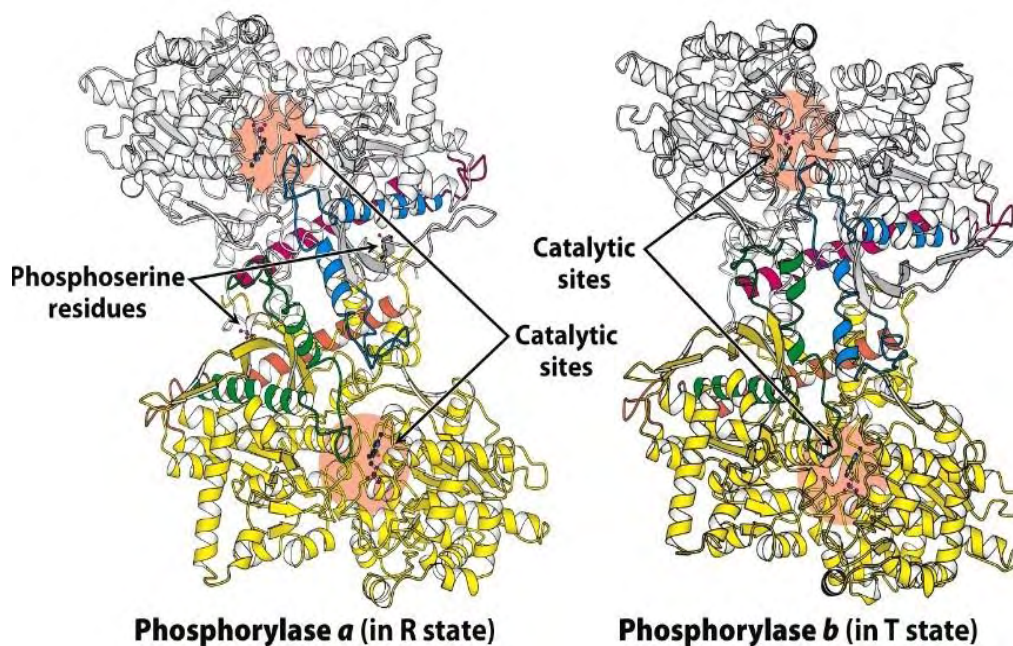
Αποτελεί το κύριο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου και καταλύει την αντίδραση της φωσφορυλάσης, ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη. Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν τρεις ισόμορφες, οι οποίες εμφανίζουν στην αλληλουχία τους ομολογία 80% και είναι:

- Φωσφορυλάση του εγκεφάλου.
- Φωσφορυλάση του ήπατος.
- Φωσφορυλάση των μυών.

Η κάθε μια από τις ισόμορφες έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει στους μύες ενέργεια, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου σε περιόδους έντονης υπογλυκαιμίας παρέχει γλυκόζη ενώ αντίθετα η φωσφορυλάση του ήπατος παρουσιάζει ομοιοστατικό ρόλο, διότι ρυθμίζει την παραγωγή/ελευθέρωση της γλυκόζης. Οι 2 πρώτες ισόμορφες παράγουν γλυκόζη όπου διοχετεύεται στους συγκεκριμένους ιστούς για αυτό τον λόγο απουσιάζει από τους ιστούς η φωσφατάση (ένζυμο) της 6-φωσφορικής γλυκόζης. (Stryer, 1997).

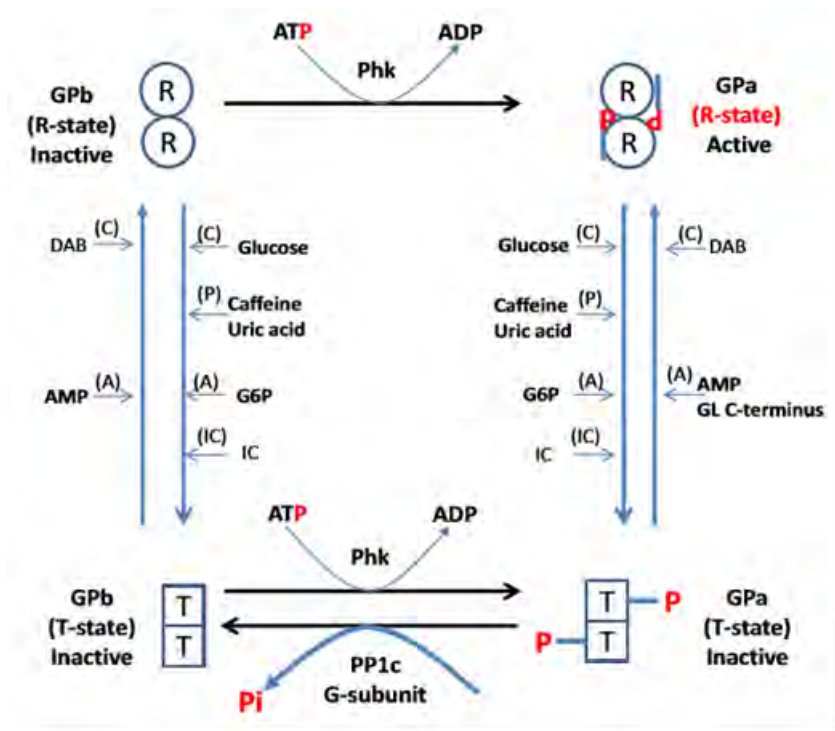
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελείται από δύο ταυτόσημες υπομονάδες με μοριακό βάρος 97 kDa και αποτελείται από 842 αμινοξέα. Επίσης αποτελείται από το PLP συνένζυμο (5'-φωσφορική πυριδοξάλη) που είναι παράγωγο της πυριδοξίνης (Vitamin B6) και είναι συνδεδεμένο με την Lys 680 σε κάθε μια υπομονάδα.

Σχηματίζει διμερή και υπόκειται σε αλλοστερική ρύθμιση αλλά και ρύθμιση μέσω της φωσφορυλιωμένης μορφή καθώς και η από-φωσφορυλιωμένης, GP_a και GP_b, αντίστοιχα (εικόνα 4). Η φωσφορυλάση γλυκογόνου βρίσκεται σε ισοροπία ανάμεσα σε μια ενεργή χαλαρή R κατάσταση και μιας λιγότερο ενεργού τεταμένης T κατάστασης. Η φωσφορυλίωση από την PhK καθώς και η πρόσδεση αλλοστερικών ενεργοποιητών όπως είναι η AMP μετατοπίζει την ισοροπία στην R κατάσταση. Αντιθέτως, η αποφωσφορυλίωση από την 1-φωσφατάση (PP1) και πρόσδεση αναστολέων, όπως είναι η γλυκόζη, διεγείρουν την μετάβαση από την R κατάσταση στην T κατάσταση. (Hayes et al., 2014).



Εικόνα 4. Οι δομές της φωσφορυλάσης a και b. Η φωσφορυλάση a είναι φωσφορυλιωμένη και στις δύο υπομονάδες στη Ser14. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή κατάσταση R. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα ενώ η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα. Επίσης απεικονίζονται οι ρυθμιστικές περιοχές με πορτοκαλί και πράσινο χρώμα. Η φωσφορυλάση b δεν είναι φωσφορυλιωμένη και συναντάται κυρίως στην T κατάσταση.

Την μεγαλύτερη συγγένεια για υποστρώματα καθώς και για αλλοστερικούς τροποποιητές (AMP) παρουσιάζει η R κατάσταση. Αντιθέτως την μικρότερη συγγένεια για τα ορθοφωσφορικά και το γλυκογόνο την παρουσιάζει η T κατάσταση. Η πρόσδεση του AMP στα αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης καθώς και η φωσφοριλίωση της Ser14, ευνοεί την R κατάσταση. Το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης του AMP είναι ικανό να προσδέσει φωσφορολιτικούς προσδέτες όπως 1,6 φωσφορική γλυκόζη, ATP, IMP οι οποίοι σταθεροποιούν την T κατάσταση. Το καταλυτικό κέντρο προσδέει τα Pi και την G1P (υπόστρωμα) όπου σταθεροποιούν την R ενώ με την πρόσδεση γλυκόζης σταθεροποιεί την T κατάσταση. Στο αλλοστερικό κέντρο η στο κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου προσδέει το γλυκογόνο όπου ευνοεί την R κατάσταση. Στο αλλοστερικό κέντρο αναστολέων της πουρίνης, προσδέονται τα ανάλογα πουρίνης όπως AMP καθώς και καφεΐνη για να ταθεροποιηθεί η T κατάσταση, μαζί με γλυκόζη η οποία προδένεται στο καταλυτικό κέντρο.



Εικόνα 5: Έλεγχος της φωσφορυλάσης με φωσφορυλίωση και αλλοστερικές τροποποιήσεις. Η κινάση της φωσφορυλάσης (PhK) καταλύει τη μετατροπή της GPb σε GPa με φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου σερίνης στο N-τελικό άκρο της κάθε υπομονάδας του κάθε διμερούς. Οι αλλοστερικοί προσδέτες σταθεροποιούν είτε την R είτε την T διαμόρφωση. Οι προσδέτες που σταθεροποιούν την κατάσταση T είναι η γλυκόζη που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο, η καφεΐνη και το ουρικό οξύ (P) και η δ-φωσφορική γλυκόζη (P) που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο. Επίσης η AMP και το Στελικό άκρο της πρωτεΐνης GL προσδένονται στο κέντρο σύνδεσης της AMP και σταθεροποιούν την κατάσταση R. Οι αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μπορούν να σταθεροποιήσουν είτε την κατάσταση R (το DAB προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο), είτε την κατάσταση T. Στην κατάσταση T, το N-τελικό άκρο είναι προσβάσιμο για αποφωσφορυλίωση της σερίνης 14 από την πρωτεϊνική φωσφατάση-1 (PP1c) σε συνδυασμό με μία πρωτεΐνη στόχευσης γλυκογόνου (υπομονάδα G), με αποτέλεσμα τη μετατροπή της GPa σε GPb. (Agius Lorraine, 2015).

1.7 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως φαρμακευτικός στόχος

Αν και η διαθεσιμότητα πολλών και διαφορετικών υπογλυκαιμικών φαρμάκων είναι μεγάλη, τα θεραπευτικά σχήματα δεν έχουν την ικανότητα πολλές φορές να ελέγξουν ικανοποιητικά τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, ώστε να πετύχουν μια περισσότερο δραστική μείωση του αριθμού των επιπτώσεων και της σοβαρότητας των επιπλοκών που παρουσιάζει ο διαβήτης. Στους ασθενείς με διαβήτη τύπου II αυξάνεται από το ήπαρ η παραγωγή γλυκόζης και η

γλυκογονόλυση έχει αποδειχθεί πως αποτελεί έναν ιδιαίτερα κύριο παράγοντα αυτής της μη φυσιολογικής αυξημένης παραγωγής (Hayes et al., 2014). Έτσι, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου συνιστά φαρμακευτικό στόχο αφού στοχεύει στην μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Στόχο αποτελεί η ισομορφή του ήπατος από τη στιγμή που έχει το ρόλο της ρύθμισης των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, αποικοδομώντας με τον τρόπο αυτό το γλυκογόνο έχοντας έτσι ως στόχο την απελευθέρωση της γλυκόζης από το ήπαρ στην κυκλοφορία. Από την άλλη πλευρά, η μυϊκή φωσφορυλάση λειτουργεί με σκοπό να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες των μυϊκών κυττάρων κατά τη σύσπαση. Η εύρεση αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από φυσικές πηγές ή η ανάπτυξη συνθετικών αναστολέων με σκοπό την αναστολή της δράσης του ενζύμου αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για την θεραπεία του διαβήτη. Έχουν βρεθεί αρκετοί διαφορετικοί αναστολείς κατά της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης όπως το καταλυτικό κέντρο, το κέντρο πρόσδεση της AMP και το κέντρο πρόσδεσης του ινδολίου. Οι πιο διαδεδομένοι και ευρέως μελετημένοι αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι τα ανάλογα της γλυκόζης που προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο. Τα ανάλογα της γλυκόζης αποτελούνται από ένα μόριο γλυκόζης με κάποιον α- ή β- υποκαταστάτη στο C-1 του μορίου της γλυκόζης. Η ισχύς του αναστολέα εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις του με το περιβάλλον του καταλυτικού κέντρου κατά τη σύνδεση του σε αυτό. (Hayes et al., 2014).

1.8 Κέντρα

1.8.1 Καταλυτικό

Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στο κέντρο κάθε υπομονάδας του ενζύμου και περιλαμβάνει τον συμπαραγόνα PLP, όπου είναι προσβάσιμο στον διαλύτη μέσω καναλιού με μήκος 15 Å. στο καταλυτικό κέντρο προσδένονται αναστολείς, οι οποίοι σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του βρόχου -280s, με κατάλοιπα 282 – 287. Επιπλέον, εμποδίζουν την πρόσβαση υποστρώματος και προοθούν την T κατάσταση (ανενεργό). Τα ανάλογα γλυκόζης λειτουργούν ως αναστολείς και προσδένονται ισχυρά σε αυτό το κέντρο. Σύμφωνα με μελέτη του (Nagy et al., 2013) έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα γλυκόζης σε ποντίκια σε συνθήκες

φυσιολογικές καθώς και υπεργλυκαιμικές μειώνονται, λόγω της παρουσίας των αναλόγων της γλυκόζης. Τέλος, η α-D-γλυκόζη η οποία παρουσιάζει σταθερά αναστολής 1.7 mM στην gmGPb και αποτελεί τον φυσικό αναστολέα για την φωσφορυλάση γλυκογόνου. (Hayes JM et al., 2014).

1.8.2 Κέντρο αναστολής

Γνωστό και ως ‘κέντρο πρόσδεσης καφεΐνης’ το κέντρο αναστολής βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Οι προσδέτες συνδέονται στο κέντρο αναστολής μέσω της παρεμβολής αρωματικών αλυσίδων των καταλοίπων φαινυλαλανίνης -285 και τυροσίνης -613 μέσω σχηματισμού αλληλεπιδράσεων π-π. Παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης οι προσδέτες είναι πιο ισχυροί. Ο 1^{ος} αναστολέας που ανακαλύφθηκε ότι δεσμεύεται στο κέντρο αναστολής με σταθερά αναστολής 0,1 mM, είναι η καφεΐνη. (Hayes JM et al., 2014).

1.8.3 Κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου

Το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου βρίσκεται στην επιφάνεια της GP και απέχει 30 Å από το καταλυτικό κέντρο. Απαρτίζεται από 2 έλικες και ένα βρόχο που ενώνει δύο αντί-παράλληλους κλώνους. Κινητικές καθώς και κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί στην gmGP για την πρόσδεση α-β-γ κυκλοδεξτρινών. (Pinotsis et al., 2003). Επίσης, αναστολείς όπως ακαρβόζη, μαλτο-πεντόζη/επταόζη προσδένονται στη θέση αυτή. Δομικά η βάση πρόσδεσης των προσδετών αυτών πανομοιότητη και λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις με μόρια νερού. Τα κατάλοιπα υδρογόνου είναι σερίνη, λυσίνη και του νερού βαλίνη και αργινίνη. (Hayes et al., 2014).

1.8.4 Αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο αποτελεί μια θέση για την πρόσδεση φυσικών αλλοστερικών τροποποιητών όπως 1) 6-φωσφορική γλυκόζη, 2) AMP, 3)ATP και 4) IMP. Η θέση αυτή είναι μεταξύ της έλικας-α2 και α8-έλικας. Ο ισχυρότερος αναστολέας (φυσικός) για την GPb η οποία προσδένεται στο αλλοστερικό κέντρο ($K_d = 30-70 \mu\text{M}$ για την GPb, $K_d-1800 \mu\text{M}$ για την GPα), είναι η 6-φωσφορική γλυκόζη. Με την σύνδεση των τροποποιητών αυτών, παράγονται μεταβολές, κυρίως δομικές οι οποίες μεταφέρονται στο καταλυτικό κέντρο και αναστέλλουν την δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είτε με την σταθεροποίηση της ανενεργού T διαμόρφωσης είτε συναγωνίζοντας τον φυσιολογικό ενεργοποιητή (AMP). (Chrysina et al., 2005).

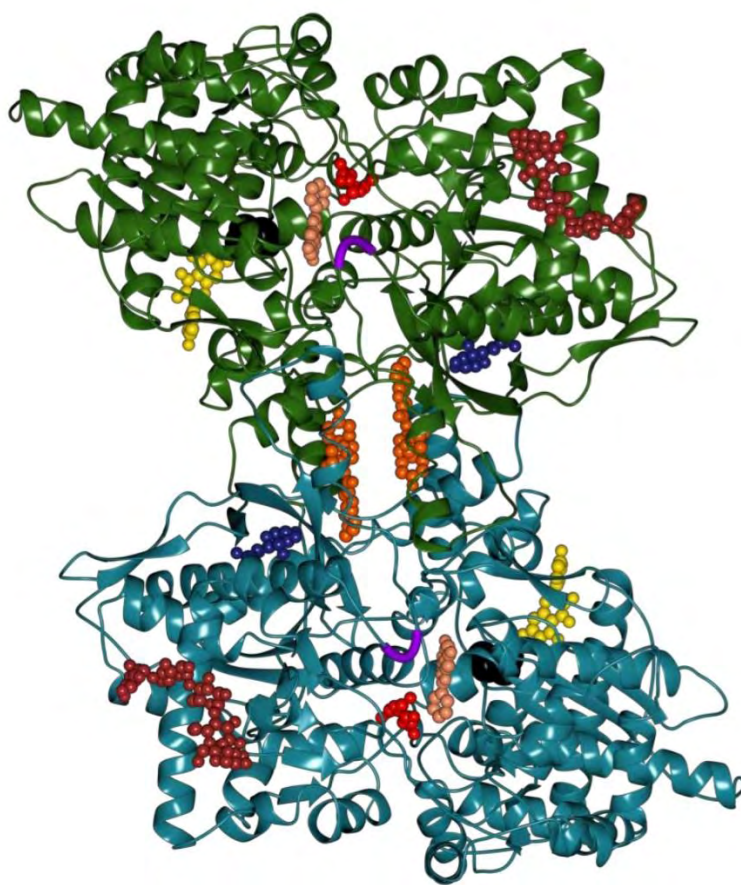
1.8.5 Νέο αλλοστερικό κέντρο

Το Νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται κοντά στην κεντρική κοιλότητα του διμερούς ενζύμου, το οποίο σχηματίζεται από τις 2 υπομονάδες. Απέχει από το αλλοστερικό κέντρο 15 \AA καθώς και από το καταλυτικό κέντρο και το κέντρο αναστολέα 33 \AA και 37 \AA , αντίστοιχα. Το ινδόλιο χαρακτηρίζεται ως ο ισχυρότερος αναστολέας (φυσικός) για το συγκεκριμένο κέντρο. Οι αναστολείς οι οποίοι προσδένονται μπορούν να λειτουργήσουν ως συνηθισμένοι αλλοστερικοί αναστολείς και σταθεροποιούν την ανενεργό T κατάσταση. Τέλος, μπορούν όπως με την γλυκόζη (αναστολέας) να παρουσιάσουν συνδυασμένη δράση. (Kosmopoulou et al., 2004).

1.8.6 Κέντρο πρόσδεσης κερσετίνης

Το κέντρο αυτό έχει απόσταση από το ενεργό κέντρο 15 \AA , ενώ από το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο 32 \AA και 43 \AA , αντίστοιχα. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι εκτός από την φλαβοπυριδόλη και την χρυσίνη οι οποίες συνδέονται

στο αλλοστερικό κέντρο η κερσετίνη προσδένεται σε νέο κέντρο. Η κερσετίνη έχει βρεθεί ότι ανάμεσα από δεκατρία πολυφαινολικά εκχυλίσματα τα οποία προέρχονταν από προϊόντα και υποπροϊόντα οινοποίησης της ελληνικής ποικιλίας «Vitis Vinifera» είναι το πιο βιοδραστικό ως συστατικό (Kantsadi et al.,2014). Επίσης, σχηματίζει την C περιοχή από κατάλοιπα Lys544, Arg551, Lys665, Tyr548 ενώ την N περιοχή την σχηματίζει με κατάλοιπα Glu120, Glu123. Τέλος με την πρόσδεση της κερσετίνης στο συγκεκριμένο κέντρο ευνοείται η λιγότερο ενεργή κατάσταση T, μέσω σταθεροποίησης της διαμόρφωσης του βρόχου με κατάλοιπα 548 & 556 στην T κατάσταση.



Εικόνα 6: Η κρυσταλλική δομή της GPb με τα 6 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.

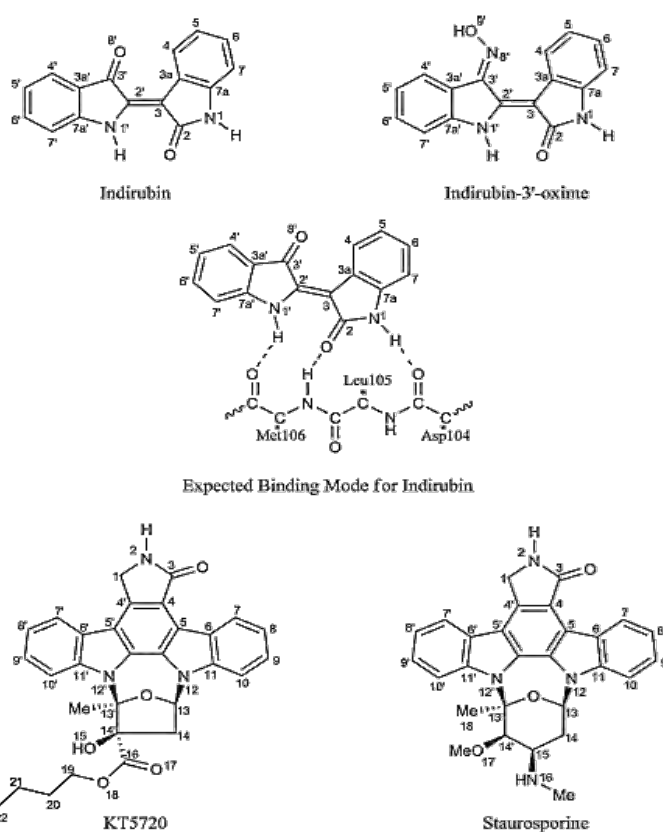
1.9 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (ρόλος, δομή, λειτουργία)

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου έχει μοριακό βάρος 1.3×10^6 Da και αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες. Η στοιχειομετρία των υπομονάδων αυτών, είναι (α-β-γ-δ. Η α-υπομονάδα αποτελείται από 1237 αμινοξέα ενώ η β-υπομονάδα από 1092 αμινοξέα. Η δ-υπομονάδα (16,7 kDa) αποτελείται από 148 αμινοξέα και έχει δράση καλμοδουλίνης. Η καταλυτική δραστηριότητα βρίσκεται στη γ υπομονάδα (~45 kDa). Υπάρχουν μυϊκές και ηπατικές ισομορφές της υπομονάδας α (PHKA1 και PHKA2) και της υπομονάδας γ (PHKG1 και PHKG2). Η κινάση βρίσκεται υπό τον έλεγχο δύο μηχανισμών. Η φωσφορυλίωση της κινάσης στην υπομονάδα β τη μετατρέπει σε ένα υψηλής δραστηριότητας ένζυμο. Η φωσφορυλίωση αυτή πραγματοποιείται από την PKA (πρωτεϊνική κινάση A), που ξεκινά να λειτουργεί με ένα δεύτερο αγγελιοφόρο, την κυκλική AMP. Επιπλέον, η ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφορυλάσης μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά ένα μέρος από επίπεδα Ca^{2+} της τάξεως του 10^{-6} M. Η ρυθμιστική υπομονάδα δ που ανιχνεύει τα επίπεδα ιόντων ασβεστίου ενεργοποιεί το ένζυμο. Για την πλήρη λειτουργία της κινάσης απαιτείται η τροποποίηση της και με φωσφορυλίωση αλλά και με ενεργοποίηση της δ υπομονάδας με δέσμευση Ca^{2+} (Agius Loranne, 2015).

1.10 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ως φαρμακευτικός στόχος

Οι συνεχείας προσπάθειες για την εύρεση νέων σκευασμάτων με υπογλυκαιμικές ιδιότητες έχουν ως στόχο να αναστείλουν την ηπατική ανθρώπινη φωσφορυλάση καθώς και την καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Αποτελούν ένζυμα τα οποία λειτουργούν ως κλειδί για τον ανθρώπινο μεταβολισμό του γλυκογόνου, καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση – αποθήκευση της γλυκόζης. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής της ανενεργής GPb προς την ενεργή GPα μορφή. Μέσω μεταλλάξεων, κυρίως γενετικών στα γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για να

κωδικοποιούν τις υπομονάδες της PhK, μπορεί να δημιουργηθούν ασθένειες οι οποίες σχετίζονται με την αποθήκευση γλυκογόνου. Εν κατακλείδι η εύρεση ισχυρών αναστολέων του συγκεκριμένου ενζύμου παρουσιάζουν κλινικό ενδιαφέρον στην θεραπεία ατόμων με διαβήτη. Ειδικότερα αναζητούνται ουσίες που λειτουργούν ως αναστολείς της PhK- γ -trunc. Πρόσφατα μελετήθηκαν ως αναστολείς, ανάλογα σταυροσπορίνης καθώς και ανάλογα ινδουβιδίνης. Ο πιο εξειδικευμένος αναστολέας KT.5720 καθώς και ο αναστολέας Indirubin-3-oxime αποτέλεσαν τους πιο ισχυρούς αναστολέες της PhK. (Hayes *et al.*, 2011)



Εικόνα 7: Δομές της Ινδουβιδίνης και της σταυροσπορίνης καθώς και των αντίστοιχων αναστολέων τους indirubin-3'-oxime και KT5720 (Hayes *et al.*, 2011).

1.11 Ανθοκυανίνες ροδιού και φαρμακευτικός ρόλος

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει ωφέλιμες επιπτώσεις στην υγεία που συνδέονται με την πρόληψη των ασθενειών λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε βιοδραστικά συστατικά. Τα φρούτα, κυρίως τα κόκκινα όπως είναι οι φράουλες, τα κεράσια, τα σταφύλια και τα ρόδια, έχουν χαρακτηριστεί ως τέτοιες πηγές, επειδή είναι πλούσιες σε φαινολικές ενώσεις όπως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και τανίνες. Ειδικότερα,

το ρόδι έχει αποκτήσει ευρεία δημοτικότητα ως λειτουργικό τρόφιμο λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε βιοδραστικά συστατικά στο χυμό και στα εκχυλίσματά του (Trichoroulou & Naska, 2002).

Τα εκχυλίσματα από όλα τα μέρη του καρπού του ροδιού παρουσιάζουν θεραπευτικές ιδιότητες (Lansky & Newman, 2007) και στοχεύουν σε μια σειρά ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές διαταραχές, ο διαβήτης, η ανδρική υπογονιμότητα, η νόσος του Alzheimer (Jurenka, 2008), η γήρανση και το AIDS (Neurath et al., 2004). Αν και τα εκτεταμένα θεραπευτικά οφέλη του ροδιού μπορούν να αποδοθούν σε έναν αριθμό μηχανισμών, οι περισσότεροι ερευνητές έχουν προσδιορίσει τις αντιοξειδωτικές, αντι-καρκινογόνες και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του.

Οι ανθοκυανίνες είναι μία από τις υποκατηγορίες των φαινολικών φυτοχημικών. Η ανθοκυανίνη είναι υπό τη μορφή γλυκοσίδης ενώ η ανθοκυανιδίνη είναι γνωστή ως αγλυκόνη. Η ανθοκυανίνη είναι ένα από τα βιοδραστικά συστατικά ως (nutraceutical) τροφοφάρμακο και παραδοσιακό φάρμακο. Έχει παραδοσιακά χρησιμοποιηθεί ως φυτοφαρμακευτικό, διεγερτικό της όρεξης, καθώς και για τη θεραπεία πολλών άλλων ασθενειών. Σαν nutraceutical, η βιοδιαθεσιμότητα της ανθοκυανίνης είναι ο βασικός παράγοντας για τη διατήρηση της καλής υγείας καθώς και την πρόληψη ασθενειών. Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα των ανθοκυανινών προκαλεί χαμηλή απορρόφηση αυτών των ενώσεων στο σύστημα κυκλοφορίας του αίματος και υψηλό ποσοστό έκκρισης ανθοκυανινών στα ούρα και τα κόπρανα, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των ανθοκυανινών κατά την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών. Η ανθοκυανίνη με υψηλή βιοδιαθεσιμότητα μειώνει αποτελεσματικά την υπεροξειδωση των κυτταρικών λιπιδίων, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο πολλών ασθενειών. Τα πιθανά οφέλη των ανθοκυανινών για την υγεία οφείλονται στην αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιμικροβιακή τους ικανότητα καθώς και στην προστασία ενάντια της παχυσαρκίας (Khoo et al., 2017).

Πρόσφατα, έχουν προκύψει οι σημαντικοί ρόλοι της πρόσληψης ανθοκυανινών για τη ρύθμιση του μικροβιόματου του εντέρου και της υγείας του εντέρου. Τα δεδομένα δείχνουν ότι τα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία που αποκομίζονται από την πρόσληψη αυτών εξαρτώνται εν μέρει από τα εντερικά μικρόβια (Wankhade et al., 2019).

Από τις κυριότερες βιο-λειτουργικές ιδιότητες του εκχυλίσματος ροδιού αποτελεί η υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Lansky and Newman, 2007). Για να μπορέσει ένα μόριο να χαρακτηριστεί ως αντιοξειδωτικό πρέπει να ισχύουν 2 κριτήρια:

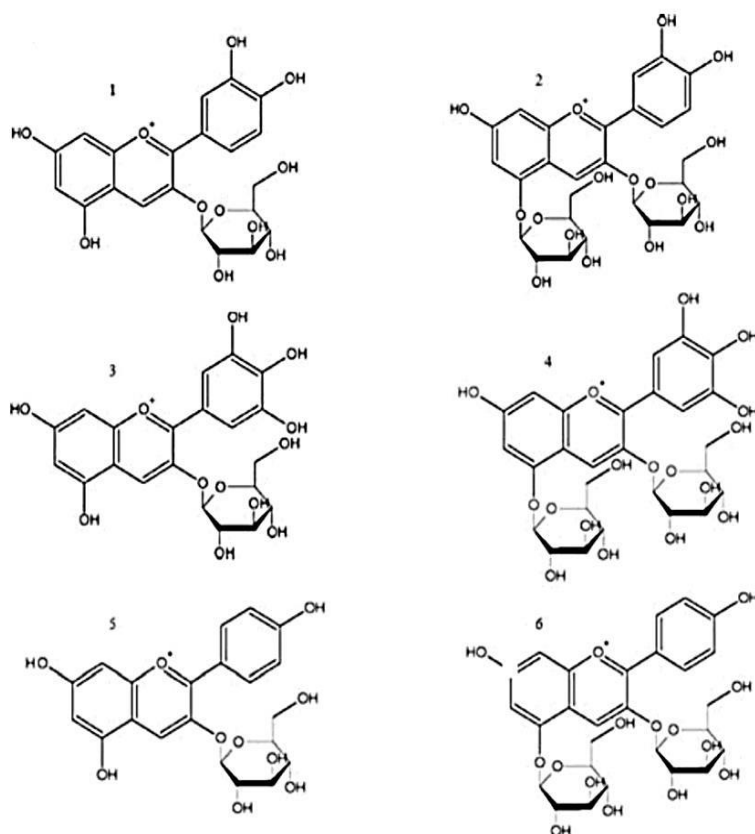
- Σε χαμηλή συγκέντρωση σε σχέση με το υπόστρωμα να μπορεί να αποτρέψει/καθυστερήσει την αυτοοξείδωση του υποστρώματος.
- Να προκύπτει σταθερή ρίζα έτσι ώστε να σταματήσει η αντίδραση της οξείδωσης.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα του εμπορικού χυμού ροδιού είναι τριπλάσια από την ικανότητα του ερυθρού κρασιού και του πράσινου τσαγιού. (Gill et al., 2000). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του χυμού ροδιού το καθιστούν ελκυστικό για την παραγωγή συμπληρωμάτων υγείας και συμπληρωμάτων nutraceuticals. Η αντιοξειδωτική του δράση συσχετίζεται, εν μέρει, με τις τρεις κύριες ανθοκυανιδίνες που βρίσκονται στο εκχύλισμα σπόρων ροδιού (Noda et al., 2002). Η περιεκτικότητα του ροδιού σε ανθοκυανίνες εξαρτάται από παράγοντες όπως το είδος, οι ποικιλίες, ο δείκτης ωριμότητας, οι εποχιακές συνθήκες, ο τύπος μεταποίησης ή οι συνθήκες αποθήκευσης των προϊόντων διατροφής. Η εφαρμογή διαφόρων μεθόδων εξαγωγής ανθοκυανινών επηρεάζει επίσης την αξιολόγηση των αντιοξειδωτικών δραστικών ουσιών των εκχυλισμάτων (Gill et al., 2000).

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν την μεγαλύτερη και πιο σημαντική ομάδα φλαβονοειδών, οι οποίες βρίσκονται στα επισπέρμια του ροδιού. Αυτές οι χρωστικές είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό σκούρο κόκκινο χρώμα στο χυμό του ροδιού. (Afaq et al., 2005). Μεγάλη ποικιλία ανθοκυανινών περιέχονται στον χυμό του ροδιού, όπως :

- Κυανιδίνη -3-O -γλυκοζίτης.
- Κυανιδίνη -3,5-δι-O -γλυκοζίτης.
- Δελφινίνη -3-O- γλυκοζίτης.
- Δελφινίνη -3,5-δι-O- γλυκοζίτης.
- Πελαργονιδίνη -3-O- γλυκοζίτης.
- Πελαργονιδίνη -3,5-δι-O- γλυκοζίτης.

Υπάρχουν διαφορές μεταξύ τους κυρίως στον αριθμό των υδροξυλιωμένων ομάδων, στην φύση καθώς και στον αριθμό των σακχάρων που είναι συνδεδεμένο στη δομή τους, στις αρωματικές καρβοξυλομάδες που είναι συνδεδεμένες με το σάκχαρο και στη θέση των ομολόγων αυτών. (Lansky and Newman, 2007, Jaiswal et al., 2010).



Εικόνα 8: Ανθοκυανίνες που περιέχονται στο εκχύλισμα ροδιού, 1) Κυανιδίνη-3-Ο-γλυκοζίτης, 2) Κυανιδίνη-3,5-δι-Ο-γλυκοζίτης, 3) Δελφινίνη-3-Ο-γλυκοζίτης, 4) Δελφινίνη-3,5-δι-Ο-γλυκοζίτης, 5) Πελαργονιδίνη-3-Ο-γλυκοζίτης, 6) Πελαργονιδίνη-3,5-δι-Ο- γλυκοζίτης.

Η ποικιλία ροδιού Ερμιόνη (το όνομά της προέρχεται από την ομώνυμη αναπτυσσόμενη περιοχή της Πελοποννήσου), έχει μεγάλο οικονομικό ενδιαφέρον για την Ελλάδα. Η καλλιέργειά της έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια - από 4000 στρέμματα το 2007 σε 10.000 το 2014 - και έχει επεκταθεί σε αρκετές περιοχές της Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας (Gardeli et al., 2019).

V. Σκοπός

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος έρευνας η οποία διεξάγεται από το εργαστήριο «Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας» του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου καθώς και η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι τα κύρια ένζυμα του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Για το λόγο αυτό αποτελούν μοριακό στόχο για την δημιουργία νέων φαρμάκων με υπογλυκαιμικές ιδιότητες. Οι αναστολείς θεωρούνται ως δυνητικοί αντι-διαβητικοί παράγοντες.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής, αρχικά έγινε απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης γλυκογόνου (rmGP-b) από κόνικλους ποικιλίας «*Oryctolagus cuniculus*» και ακολούθησε η φωσφορυλίωση της ηπατικής φωσφορυλάσης γλυκογόνου (hlGP-a). Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε κινητικές μελέτες σε αναστολείς (ανθοκυανίνες) οι οποίες περιέχονταν σε εκχύλισμα ροδιού Ελληνικής ποικιλίας «ΕΡΜΙΟΝΗ» και υπολογίσαμε την σταθεράς αναστολής IC50, τόσο στην rmGP-b όσο και στην hlGP-a (φωσφορυλιωμένη) και στην κινάση της φωσφορυλάσης γλυκογόνου *PhK*. Η ηπατική GP ως προς την αμινοξική ακολουθία είναι ομόλογη κατά 80% με την μυϊκή GP. Στην περιοχή του ενεργού κέντρου η ομολογία αυτή φτάνει στο 100%.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια

<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Εταιρία</u>
Acetic acid (CH ₃ COOH)	SdS
a-D-Glucose, 1-Phosphate Dipotassium	Sigma
Acrylamide	Serva
Activated Charcoal	Sigma
Adenosine Monophosphate, (AMP)	Sigma
Adenosine Triphosphate, (ATP)	Sigma
Ammonium Molybdate	Sigma
Ammonium Persulfate, (APS)	Serva
Ammonium Sulfate	ChemLab
BES	Sigma
Bis Acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin, (BSA)	New England Bio labs
Bradford Protein Assay 5x	Bio-Rad
Bromophenole Blue	Research Organics
Caffeine	Serva
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl Sulfoxide, (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol, (DTT)	Applichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid, (EDTA)	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine (C ₂ H ₅ NO ₂)	Serva
Glycogen from oyster type 2	Sigma
Hepes	Serva
Hydrochloric acid 37%, (HCL)	Applichem
Imidazole 99%	Sigma

Imidazole bio Ultra	Sigma
KHCO ₃	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma
Magnesium Acetate tetrahydrate, (CH ₃ COOH) ₂ Mg	Appllichem
Methanol	Scharleu
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaCl	Scharleu
NaOH	Merck
Potassium Chloride, (KCl)	Merck
SDS	Serva
Sodium carbonate anhydrous	Sds
Sodium Hydroxide, (NAOH)	Merck
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra Pure	Appllichem
Zinc acetate	Sigma
α-D-Glucose-1-Phosphate	Sigma
β-GP	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Πυκνό διάλυμα Αμμωνίας	Fluka
Glucose Liquid Fast	Zafiropoulos Diagnostica

Οργανολογία

<u>Όργανο</u>	<u>Εταιρεία</u>
Φυγόκεντρος –Z36HK	HermLe
Φυγόκεντρος HITACHI CR-22N	Himac
Πεχάμετρο	Metrohm
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης	BioRad
Υδατόλουτρο, (Wise Bath)	Wisd
Φωτόμετρο	VWR
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma

B.1 Παρασκευαστικές μέθοδοι

Τα εκχυλίσματα ροδιού τα οποία είχαν συγκέντρωση 0,383 μg/ml και 1,3 μg/ml, αντίστοιχα, στάλθηκαν από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Ο καθαρισμός των μιγμάτων ροδιού έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο (Gardeli C et al., 2019).

2.1 Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου-β από σκελετικούς μύες κουνελιών ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus*.

Η απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου-β έγινε με την μέθοδο Fisher & Krebs από σκελετικούς μύες αρσενικών κουνελιών (rmGPb, Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase-b). Η μοναδική τροποποίηση σε όλα τα στάδια της πειραματικής πορείας ήταν ότι χρησιμοποιήσαμε 2-μερκαπτοαιθανόλη αντί για L-κυστεΐνη.

ΥΛΙΚΑ & ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ:

• Τρεις κόνικλοι αρσενικοί (<i>oryctolagus cuniculus</i>)
• Διάλυμα CH ₃ COOH 1N (οξικό οξύ)
• Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης του ενζύμου 50:50:1 , Ph 6.8 (50Mm 2-μερκαπτοαιθανόλη, 50Mm β-φωσφογλυκερόλη, 1Mm EDTA, 0,5Mm DTT-διθειοθρεϊτόλη).
• Διάλυμα KHCO ₃ (κεκορεσμένο).
• Διάλυμα 90 % w/v (NH ₄) ₂ SO ₄ .
• Διάλυμα 0.3 M 2-μερκαπτοαιθανόλη, pH 7.0.
• Διάλυμα EDTA 0.1 M, Ph 7.0.
• Διάλυμα Tris 2.0 M.
• Ρυθμιστικό διάλυμα Tris {τρεις-(υδροξυμέθυλο)-αμινομεθανίου}/HCl 0.001M}.
• Μεμβράνες διαπίδυσης, οι οποίες υποβλήθηκαν σε κατεργασία με NaCO ₃ και 10 Mm EDTA σε θερμοκρασία 100 °C, συνεχόμενες πλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από κάθε χρήση. Αποθήκευση σε αιθανόλη 100 % στους 4° C.
• Διάλυμα Οξικού Μαγνησίου (CH ₃ COO) ₂ Mg 1 M, pH 7.0.
• Διάλυμα AMP (5'-Φωσφορική Αδενοσίνη) 0.1 M, pH 7.0.
• Γλυκερόλη 100%.

ΟΡΓΑΝΑ

• Αναλυτικός ζυγός ακριβείας
• Πεχάμετρο – Πεχαμετρικό χαρτί
• Φυγόκεντρος
• Μηχανή άλεσης κρέατος
• Φασματοφωτόμετρο
• Γάζα – Υαλοβάμβακα
• Χωνί Buchner

2.2 Τα στάδια απομόνωσης της (rmGPb, Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase-b) είναι τα ακόλουθα:

1^ο Στάδιο: Α) Παραλαβή μυϊκού ιστού και έκχυση του ενζύμου.

Αρχικά αφαιρέθηκαν οι σκελετικοί μύες, κυρίως από τα πίσω πόδια και τους ραχιαίους μύες από τρεις κόνικλους αρσενικούς. Οι σκελετικοί μύες αλέσθηκαν με μηχανή άλεσης κρέατος και στην συνέχεια ο κιμάς ζυγίστηκε. Ύστερα ακολούθησαν τρεις εκχυλίσεις στον αλεσμένο ιστό με απιονισμένο νερό το οποίο ήταν σε θερμοκρασία 4 °C. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια γάζας καθ' όλη την πορεία της εκχύλισης. Οι δύο αρχικές εκχυλίσεις έγιναν με όγκο ίσο με το βάρος του κιμά ενώ η τρίτη με μισό όγκο του βάρους των σκελετικών μυών. Ο χρόνος των τριών εκχυλίσεων είναι 30 λεπτά. Στην συνέχεια φιλτραρίστηκε με την χρήση υαλοβάμβακα με χρήση μάσκας έτσι ώστε να κρατηθούν τα αιωρούμενα συσσωματώματα.

2^ο Στάδιο: Καταβύθιση πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον.

Στο διάλυμα που παραλάβαμε από το πρώτο στάδιο, ρυθμίστηκε το pH στο 5.1. Αυτό επιτεύχθηκε με την προσθήκη CH₃COOH 1N και παραμονή του εκχυλίσματος στον πάγο για 5 λεπτά. Παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση της θολερότητας λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών οι οποίες ήταν ανεπιθύμητες. Με φυγοκέντρηση στις 5.000rpm σε θερμοκρασία 4°C για 30 λεπτά έγινε η απομάκρυνση των πρωτεϊνών αυτών. Τέλος, το pH του διηθήματος ρυθμίστηκε στο 6.8 με προσθήκη διαλύματος KHCO₃ (κορεσμένο) και στην συνέχεια ογκομετρήθηκε.

3^ο Στάδιο: Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο.

Έγινε καταβύθιση του ενζύμου με θειικό αμμώνιο 41% (κορεσμού) ύστερα από την προσθήκη θειικού αμμωνίου 90% με 0,837 ανά λίτρο ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα στην συνέχεια παραμένει σε θερμοκρασία 4 °C για 18 ώρες. Στην συνέχεια

με την βοήθεια αντλίας το υπερκείμενο αποχύνεται και με φυγοκέντρηση στις 5.000rpm για 30 λεπτά στους 5°C συλλέχθηκε το ίζημα. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου νερού σε θερμοκρασία 37 °C. Τέλος, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση έναντι του διαλύματος Tris 0,001 M με pH 7,5 για 18 ώρες.

4° Στάδιο: Θερμική επεξεργασία σε pH υψηλό.

Μετά το πέρας των 18 ωρών και την ολοκλήρωση της διαπίδυσης συλλέχθηκε το διάλυμα όπου με φυγοκέντρηση στις 5.500rpm στους 4 °C για 30 λεπτά, ακολούθησε η διαύγαση. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη των διαλυμάτων:

- ✓ Διάλυμα 2-μερκαπτοαιθανόλης 0,3 M με pH 7.0 και όγκο ίσο με το 1/9 του πρωτεϊνικού διαλύματος.
- ✓ EDTA 0,1 M με pH 7.0 και όγκο ίσο με 0,005 του πρωτεϊνικού διαλύματος.
- ✓ Διάλυμα αλκαλικού διαλύματος Tris, έτσι ώστε να γίνει ρύθμιση του pH στο 8,8.

Στην συνέχεια έγινε επώαση στους 37 °C για 60 λεπτά και ήπια ανάδευση. Ύστερα έγινε προσθήκη του διαλύματος CH₃COOH 1N, για να ρυθμιστεί το pH στο 7.0 και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 15.500rpm. Τέλος, ακολούθησε ογκομέτρηση στον υπερκείμενο διάλυμα για να προσδιοριστεί ο όγκος του.

5° Στάδιο: Κρυστάλλωση και Ανακρυστάλλωση.

Στο ενζυμικό διάλυμα έγινε προσθήκη AMP 0,1M σε όγκο 1 ml και (CH₃COO)₂Mg 1M, με pH 7.0 ανά 100 ml υπερκείμενου διαλύματος. Η προσθήκη πραγματοποιήθηκε στους σωλήνες φυγοκέντρησης οι οποίοι παρέμειναν στους 0 °C για 8 ώρες, ώσπου να επιτευχθεί η κρυστάλλωση του ενζύμου. Η συλλογή των κρυστάλλων πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντρηση στις 15.500rpm σε θερμοκρασία 4 °C για 10 λεπτά. Στην συνέχεια το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε θερμοκρασία 30 °C με την προσθήκη διαλύματος αραίωσης το οποίο περιείχε (β-GP, Merk, EDTA, 50:50:1 pH

6,8). Στην συνέχεια έγινε πάλι φυγοκέντρηση του εναιωρήματος στις 17.500rpm σε θερμοκρασία 25 °C για 12 λεπτά έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα σωματίδια. Η πρώτη ανακρυστάλλωση ακολούθησε με την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$. Το μίγμα αφέθηκε στους 0 °C για να πραγματοποιηθεί η κρυστάλλωση του ενζύμου για χρόνο περίπου 9 ωρών. Τα στάδια της κρυστάλλωσης και ανακρυστάλλωσης εκτελέστηκαν τουλάχιστον 4 φορές με την μόνη διαφορά ότι στην τελευταία ανακρυστάλλωση δεν έγινε η προσθήκη AMP 0,1M και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M.

6^ο Στάδιο: Συλλογή – Αποθήκευση του ενζύμου.

Πραγματοποιήθηκε η συλλογή των κρυστάλλων οι οποίοι διαλυτοποιήθηκαν με επώαση στους 37 °C. Τέλος, με φωτομέτρηση του δείγματος σε μήκος κύματος 280nm ακολούθησε ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ενζύμου. Η αποθήκευση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη γλυκερόλης 100% ίσου όγκου και το διάλυμα αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

*Κατά τα στάδια της απομόνωσης, ληφθείσαν δείγματα τα οποία θα χρησιμοποιήσουμε στην συνέχεια για τον προσδιορισμό της ποσότητας και καθαρότητας της πρωτεΐνης. Τα δείγματα αυτά φαίνονται επιγραμματικά στον παρακάτω (πίνακα 1):

ΔΕΙΓΜΑ 1	Πριν τη προσθήκη θειικού αμμωνίου, μετά την καταβύθιση των πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον και πριν την ρύθμιση του pH.
ΔΕΙΓΜΑ 2	Μετά την προσθήκη θειικού αμμωνίου.
ΔΕΙΓΜΑ 3	Μετά τη διαπίδυση σε 1 mM Tris-HCl, pH 7.5.
ΔΕΙΓΜΑ 4	Μετά τη διαύγαση, υπερκείμενο.
ΔΕΙΓΜΑ 5	1 ^η κρυστάλλωση.
ΔΕΙΓΜΑ 6	1 ^η ανακρυστάλλωση.
ΔΕΙΓΜΑ 7	1 ^η ανακρυστάλλωση.
ΔΕΙΓΜΑ 8	3 ^η ανακρυστάλλωση.
ΔΕΙΓΜΑ 9	4 ^η ανακρυστάλλωση.
ΔΕΙΓΜΑ 10	5 ^η ανακρυστάλλωση.

Πίνακας 1: Δείγματα τα οποία λήφθηκαν κατά τα στάδια της απομόνωσης της GP από αρσενικούς κονίκλους ποικιλίας «*Oryctolagus cuniculus*».

B.2 Αναλυτικές μέθοδοι

2.3 Ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων με ηλεκτροφορητικές τεχνικές

Η ανάλυση των πρωτεϊνών στα πειράματα που έγιναν, πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου όπου πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση της πηκτής (SDS – PAGE ηλεκτροφόρηση), με παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων.

2.4 Προετοιμασία πηκτής ηλεκτροφόρησης

Η πηκτή του ακρυλαμιδίου, χωρίζεται σε δύο ίσα μέρη. Το 1^ο μέρος αποτελείται από την πηκτή επιστοιβαξής (Stacking gel), εκεί οι πρωτεΐνες πακετάρονται υπό σταθερή τάση. Έχει ακρυλαμίδιο 5 % (σταθερό) και είναι ανεξάρτητο από το μέγεθος των πρωτεϊνών που αναλύουμε (πίνακας 2).

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Όγκος σε ml</u>
Ακρυλαμίδιο 30 %	0,5 ml
SDS 10 %	0,03 ml
1,0M Tris-HCl (pH 6.8)	0,38 ml
dH ₂ O	2,1 ml
APS 10 %	0,03 ml
TEMED	0,003 ml

Πίνακας 2: Σύσταση πηκτής επιστοιβαξής (Stacking gel), με συγκέντρωση 5 %.

Το 2^ο μέρος περιλαμβάνει την πηκτή διαχωρισμού (Separating gel ή Running gel). Το ποσοστό του ακρυλαμίδιου στο μέρος αυτό εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς τον διαχωρισμό (πίνακας 3).

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση 10 %
	Όγκος σε ml
Ακρυλαμίδιο 30 %	1,7 ml
SDS 10 %	0,05 ml
1,5 Tris-HCl (pH 8,8)	1,3 ml
dH ₂ O	1,9 ml
APS 10 %	0,05 ml
TEMED	0,002 ml

Πίνακας 3: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού (Separating-Running gel), ανάλογα με το ποσοστό ακρυλαμίδιου.

Αφού προσθέσουμε όλα τα αντιδραστήρια στο τέλος προστίθενται το APS 10 % και το TEMED, τα οποία είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό του ακρυλαμίδιου.

2.5 Κινητικές μελέτες της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου

2.6 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας → GPb

Συνιστά έκφραση της ποσότητας καθώς και της δραστηριότητας του ενζύμου. Μπορεί να οριστεί ως χιλιόγραμμα (mg) ενζύμου τα οποία προκαλούν την μετατροπή ενός (1) μmol του υποστρώματος καθώς και την παρασκευή ενός (1) μmol ανά λεπτό σε συγκεκριμένες συνθήκες. Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες in vitro στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και μελετήθηκε η αντίστροφη πορεία της αντίδρασης προς την σύνθεση γλυκογόνου με ενσωμάτωση της φωσφορικής-1-γλυκόζης που συνδέεται σε αυτό, έτσι ώστε να παραχθεί γλυκογόνο με ένα κατάλοιπο γλυκόζης με την ταυτόχρονη απελευθέρωση φωσφορικών (Pi) από την GP.

Glycogen (n) + Pi ↔ Glycogen (n-1) +glucose -1-P

Η αντίδραση η οποία καταλύεται από την φωσφορυλάση είναι αμφίδρομη. Η ποσοτικοποίηση των φωσφορικών ιόντων (Pi) γίνεται με τη χρήση φασματοφωτόμετρου, όπου ελέγχτηκε η ικανότητα αναστολής ανθοκυανινών από εκχύλισμα ροδιού ελληνικής ποικιλίας «Ερμιόνη».

2.7 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου

Ο υπολογισμός κινητικών παραμέτρων στηρίζεται στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του φωσφόρου, όπου δημιουργεί σύμπλοκο ένωσης χρωμοφόρου. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Παρουσία Zn^{2+} σε pH ίσο με 5 το ανόργανο φωσφορικό σχηματίζει με το μολυβδαινικό αμμώνιο ένα σύμπλοκο που απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία. Στην συνέχεια παράγεται ένα χρωμοφόρο σύμπλοκο μετά από αναγωγή με το ασκορβικό οξύ, το οποίο απορροφά στα 850 nm, μήκος κύματος. Δεν πραγματοποιείται η παραγωγή του χρωμοφόρου συμπλόκου με την απουσία ορθοφωσφορικών ιόντων. Το σύμπλοκο φωσφο-μολυβδενικού ελαττώνεται λόγω ασκορβικού οξέως σε pH ίσο με 5 με την παρουσία Zn^{2+} .

2.7.1 Παρασκευή των διαλυμάτων ασκορβικού οξέως και διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου και οξικού ψευδαργύρου.

Μέθοδος ασκορβικού οξέως:

Βασίζεται στην δημιουργία έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης παρουσία οξικού ψευδαργύρου σε όξινο περιβάλλον και την αναγωγή με το ασκορβικό οξύ. Ο προσδιορισμός γίνεται φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 850 nm.

- ✓ Διάλυμα μολυβδαινίου, pH 5.0. Αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο (Ammonium molybdate) 15 mM και οξικό ψευδάργυρο (Zinc acetate) 100

mM. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε γυάλινο σκούρο μπουκάλι. Το pH ρυθμίζεται με HCl 1N.

- ✓ Διάλυμα ασκορβικού οξέως (10 % w/v), pH 5.0. Φυλάσσεται σε γυάλινο σκουρόχρωμο μπουκάλι μακριά από φωτεινές πηγές και παρασκευάζεται την ίδια μέρα.

*Η ανάμιξη γίνεται σε αναλογία **1:4** όγκους αντιδραστηρίου ασκορβικού οξέως προς διάλυμα μολυβδαινίου.

Πορεία:

Με το πέρας των 15 λεπτών προσθέτουμε στα δείγματα τα οποία έχουμε λάβει από το κινητικό πείραμα, 700 μ L από το διάλυμα φωτομέτρησης. Ακολουθεί ανάδευση και στην συνέχεια τοποθετούμε σε υδατόλουτρο 30°C για 15 λεπτά. Τέλος, σε μήκος κύματος 850 nm ακολουθεί φωτομέτρηση των δειγμάτων. Επίσης σε πρότυπο δείγμα γίνεται ο προσδιορισμός των φωσφορικών.

2.8 Φωσφορυλίωση GP

Η PhK φωσφορυλιώνει την GP. Συγκεκριμένα η γ -καταλυτική υπομονάδα Ser 14 της GP. Στο πειραματικό μέρος η φωσφορυλίωση της h1GPb, πραγματοποιήθηκε παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο περιείχε Hepes 1X, ATP 1mM και PhK 16ng/ml. Το stock της PhK αρχικά ήταν 0,9 mg/ml, έτσι αραιώσαμε το διάλυμα φωσφορυλίωσης έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι ίση με 16 ng/ml. Επιπλέον ο ελάχιστος όγκος της αντίδρασης της φωσφορυλίωσης βρέθηκε ότι είναι 26 μ L, έτσι ώστε οι συγκεντρώσεις να είναι τελικά στο διάλυμα Hepes 1X, ATP 1mM και PhK 16 ng/ml. Επίσης, το διάλυμα αραιώσεως της κινάσης περιέχει Hepes 1X και BSA 5 mg/ml. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη του ATP, το οποίο προστίθενται στο τέλος μέσα σε υδατόλουτρο και σε θερμοκρασία 30 °C για χρόνο 1h:45min μακριά από φωτεινές πηγές. Τέλος, η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη του μίγματος σε πάγο.

Όγκος της φωσφορυλίωσης στα 26 μ l	
hlGPb	1,7 mg/ml
Hepes	1X
ATP	1mM
PhK	16 ng/ml

2.9 Ενζυμικό διάλυμα

Κατά την παρασκευή του ενζυμικού διαλύματος η συγκέντρωση για την rmGPb ήταν 15 μ g/ml ενώ η συγκέντρωση για την hlGPa ήταν 5 μ g/ml. Ο όγκος του ενζυμικού διαλύματος ήταν 240 μ l έτσι ο τελικός όγκος της αντίδρασης ο οποίος ήταν 180 μ l οι τελικές συγκεντρώσεις της rmGPb και hlGPa να είναι 3 μ g/ml και 1 μ g/ml, αντίστοιχα. Στο ενζυμικό διάλυμα προσθέσαμε τα παρακάτω διαλύματα στις αναγραφόμενες αναλογίες:

rmGPb	
<u>Αρχικές Συγκεντρώσεις</u>	<u>Τελικές Συγκεντρώσεις</u>
Glucogen 10% (w/v), 24 μ l	Glucogen 1% (w/v)
P.Δ 50:50:1, 12 μ l	P.Δ 2,5:2,5:0,05
rmGPb 15 μ g/ml, 8,6 μ l	rmGPb 3 μ g/ml
dH ₂ O, 195,4 μ l	-
$V_{\text{ΤΕΛΙΚΟ}} = 240 \mu\text{l}$	

hlGPa	
<u>Αρχικές Συγκεντρώσεις</u>	<u>Τελικές Συγκεντρώσεις</u>
Glucogen 10% (w/v), 24 μ l	Glucogen 1% (w/v)
hlGPa 5 μ g/ml,	hlGPa 1 μ g/ml
TEA Buffer	
dH ₂ O	
$V_{\text{ΤΕΛΙΚΟ}} = 240 \mu\text{l}$	

Τοποθετούμε σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C για 15 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνδεση του ενζύμου με το γλυκογόνο.

2.10 Υποστρώματα

Μελετήσαμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου δηλαδή η προσθήκη της G1P στο γλυκογόνο, οπότε τα υποστρώματα στις συγκεκριμένες κινητικές μελέτες ήταν η α -D-1-φωσφορική

γλυκόζη. Παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα 1 (Assay Buffer 1), το οποίο περιέχει 400 mM KCl, 200 mM ιμιδαζόλιο, 4 mM DTT, 4 mM EDTA. Στην συνέχεια από το ρυθμιστικό διάλυμα 1 (Assay Buffer 1) παρασκευάζουμε ρυθμιστικό διάλυμα 2 (Assay Buffer 2), με αραιώση, το οποίο περιέχει 270 mM KCl, 135 mM ιμιδαζόλιο, 2,7 mM DTT, 2,7 mM EDTA. Στο ρυθμιστικό διάλυμα 2 (Assay Buffer 2) βρίσκονται οι συγκεντρώσεις του υποστρώματος που μελετάμε.

Παρασκευάσαμε ένα υδατικό διάλυμα G1P με συγκέντρωση 90 mM από πυκνό υδατικό διάλυμα G1P 400 mM, pH 6,8 και αποθηκεύτηκε στους -20°C .

Αρχικές Συγκεντρώσεις	Τελικές Συγκεντρώσεις
G1P 400 Mm, 225 μL	G1P 90 mM
dH ₂ O, 100 μL	-
Assay Buffer 1, 675 μL	Assay Buffer 2
$V_{(\text{ΤΕΛΙΚΟ})}=1000 \mu\text{L}$	

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις G1P που χρησιμοποιήθηκαν, παρασκευάστηκαν με αραιώση της G1P με συγκέντρωση 90 mM, χρησιμοποιώντας το (Assay Buffer 2), όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	G1P στα 180 μl της αντίδρασης
90 mM	9 mM	2 mM
90 mM	4,5 mM	1 mM

Χρησιμοποιήσαμε 2 mM για τον προσδιορισμό της IC_{50} στην rmGPb και 1 mM για τον προσδιορισμό της IC_{50} στην hGPα.

Τοποθετούνται για επώαση στους 30°C για 3 λεπτά.

2.10.1 Παρασκευή υποστρωμάτων για τον προσδιορισμό IC_{50} στην hGPα με εκχύλισμα ροδιού (0,838 $\mu\text{g/ml}$).

Για την εύρεση και τον υπολογισμό της IC_{50} , παρασκευάζονται διαλύματα αναστολέα με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Επίσης παρασκευάζεται επιπλέον ένα πείραμα ελέγχου (control) στο οποίο δεν υπάρχει αναστολέας. Οι συγκεντρώσεις της G1P και AMP παραμένουν σταθερές καθ' όλη την διάρκεια.

Δεδομένου ότι το pH του εκχυλίσματος ροδιού ήταν όξινο το αραιώσαμε σε TEA Buffer με pH 8,2, έτσι ώστε το pH του εκχυλίσματος να έρθει κοντά στο 7.

Έχουμε (Stock) εκχύλισμα ροδιού με συγκέντρωση 0,383 µg/ml. Πραγματοποιούμε πρώτη αραιώση 1/10, δηλαδή (63 µl TEA + 7 µl εκχύλισμα ροδιού),(Stock) ώστε ο τελικός όγκος να είναι 70 µl και η τελική συγκέντρωση μετά την αραιώση 38 µg/ml. Στόχος μας ήταν στην τελική αντίδραση με όγκο 180 µl το TEA Buffer να είναι σταθερό στα 10 mM. Εφαρμόζοντας τον τύπο $n_{ολικό} = n_1 + n_2$, προέκυψε ο παρακάτω πίνακας:

µg/ml	Εκχύλισμα ροδιού	TEA (100 mM)	G ₁ P (9mM)	dH ₂ o
Control	-	18 µl	40 µl	86 µl
0,146 µg/ml	6,9 µl	11,8 µl	40 µl	85,3 µl
0,300 µg/ml	13,8 µl	5,6 µl	40 µl	84,6 µl
0,590 µg/ml	2,8 µl	15,5 µl	40 µl	85,7 µl
0,870 µg/ml	4,1 µl	14,3 µl	40 µl	85,6 µl
1,170 µg/ml	5,5 µl	13 µl	40 µl	85,5 µl

2.10.2 Παρασκευή υποστρωμάτων για τον προσδιορισμό IC₅₀ στην rmGPb με εκχύλισμα ροδιού (0,383 µg/ml).

µg/ml	Εκχύλισμα ροδιού	G ₁ P (2mM)	dH ₂ o
Control	-	40 µl	104 µl
0,29 µg/ml	10 µl (5,3 µg/ml)	40 µl	94 µl
0,44 µg/ml	10 µl (7,9 µg/ml)	40 µl	94 µl
0,59 µg/ml	10 µl (10,6 µg/ml)	40 µl	94 µl
0,74 µg/ml	10 µl (13,2 µg/ml)	40 µl	94 µl
1,18 µg/ml	10 µl (21,2 µg/ml)	40 µl	94 µl
1,47 µg/ml	10 µl (26,5 µg/ml)	40 µl	94 µl
1,77 µg/ml	10 µl (31,8 µg/ml)	40 µl	94 µl

2.11 Προσδιορισμός αναστολέα IC₅₀

Για να ελέγξουμε πόσο αποτελεσματική είναι μια ουσία να εμποδίζει την βιολογική-βιοχημική δράση χρησιμοποιείται η IC₅₀ (Half Maximal Inhibitory Concentration). Η IC₅₀ εκφράζει την συγκέντρωση του αναστολέα και στην δική μας περίπτωση ως αναστολείς έχουμε τις ανθοκυανίνες από εκχύλισμα ροδιού με την οποία μειώνεται στο 50% η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.

Για τον προσδιορισμό της IC₅₀ πρέπει να μελετήσουμε το ένζυμο κινητικά με την παρουσία αναστολέα στην περιοχή της IC₅₀ και η συγκέντρωση της G₁P να είναι καθορισμένη.

Στο μίγμα της αντίδρασης η παρουσία αναστολέα (εκχύλισμα ροδιού-ανθοκυανινών) οδηγεί στην μείωση της ταχύτητας της σύνθεσης του γλυκογόνου καθώς και την απελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή με βάση τα μοντέλα ενζυμικής αναστολής (Segel, 1975).

2.12 Ανάλυση των κινητικών δεδομένων με το πρόγραμμα «Grafitt».

Γεγονός του ότι η α-D-Glc-1-P παρουσιάζει φυσική υδρόλυση και στο ενζυμικό διάλυμα εμφανίζονται φωσφορικά οι απορροφήσεις μετατρέπονται σε μοι-φωσφορικών. Αυτό επιτυγχάνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη των φωσφορικών. Τέλος ακολούθησε ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας που εμφανίζει το ένζυμο με την απουσία αναστολέα η παρουσία αναστολέα.

Με την βοήθεια της εξίσωσης Michaelis Menten, γίνεται ο υπολογισμός της σταθεράς Michaelis Menten (Km, mol).

$$v = V_{max} [S] / K_m + [S], \text{ όπου}$$

v: ταχύτητα, **V_{max}**: μέγιστη ταχύτητα, **S**: συγκέντρωση του υποστρώματος, **K_m**: σταθερά Michaelis Menten.

Για τον υπολογισμό της IC₅₀ οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου που έχουν αναστολέα μετατρέπονται σε % αναστολή με την βοήθεια της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου με απουσία αναστολέα.

2.13 Προσδιορισμός γλυκόζης στο εκχύλισμα ροδιού

Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης στο εκχύλισμα του ροδιού, χρησιμοποιήθηκε το kit «Glucose Liquid Fast». Οι όγκοι κατά την πειραματική πορεία που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον πίνακα παρακάτω.

Πειραματική πορεία:

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν στο εκχύλισμα ροδιού (90μl εκχύλισμα + 10μl TEA) 1/10 αραιώση με TEA Buffer pH 6.8 και στην συνέχεια δύο διαδοχικές αραιώσεις (1/10 και 1/100). Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται παρακάτω:

Control	20 μl TEA + 2ml kit
T (1/10)	20 μl εκχύλισμα (1/10 αραιώση) + 2ml kit
T (1/100)	20 μl εκχύλισμα (1/100 αραιώση) + 2ml kit
ΠΡΟΤΥΠΟ	20 μl (ΠΡΟΤΥΠΟ kit) + 2ml kit

Στην συνέχεια ακολουθεί ήπια ανάδευση και στην συνέχεια επώαση 10 λεπτά σε θερμοκρασία 37 °C. Ο προσδιορισμός της γλυκόζης γίνεται με φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 510 nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη που είχε προηγουμένως υπολογιστεί. Μηδενίσαμε με το τυφλό και οι τιμές που λάβαμε φαίνονται παρακάτω:

OD nm	0'
T (1/10)	0,005
T (1/100)	0,000
ΠΡΟΤΥΠΟ	0,330

2.14 Κινητική μελέτη της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Παρασκευάζεται διάλυμα BSA 10 mg/ml, Tris 40 mM με pH 8.2 για την αραιώση της PhK. Στην τελική αντίδραση η συγκέντρωση του BSA και Tris είναι 0,5 mg/ml και 2mM, αντίστοιχα. Το πρωτεϊνικό διάλυμα περιέχει επιπλέον BSA έτσι ώστε κατά την πειραματική διαδικασία να αποφύγουμε την προσκόλληση του ενζύμου στα τοιχώματα. Στην συνέχεια παρασκευάζεται διάλυμα 50:50:1 (50 mM 2-

μερκαπτοαιθανόλη, 50 mM β-φωσφογλυκερόλη, 1 mM EDTA) με pH 6.8, έτσι ώστε να επιτευχθεί η αραίωση της GPb. Τέλος, παρασκευάζεται το διάλυμα Buffer 4×, με pH 8.2 το οποίο περιέχει Tris 200 mM, Hepes 200 mM, CaCl₂ 2 mM, DTT 8 mM, MgCl₂ 40 mM.

Η μελέτη της h1PhK-γ-trunc, αποτελείται από δύο στάδια. Το κάθε στάδιο περιλαμβάνει δύο αντιδράσεις. Η 1^η αντίδραση έχει υπόστρωμα την ATP, το οποίο φωσφορυλιώνει τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) και την μετατρέπει στην ενεργό μορφή a από την ανενεργό μορφή b. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 20 μL, της αντίδρασης σε TEA buffer 100 mM, pH 6.8, με όγκο 980 μL, χωρίς να αποδιατάσσονται τα ένζυμα. Μόλις ολοκληρωθεί η πρώτη αντίδραση, 100 μL προστίθενται από την αντίδραση αυτή στην δεύτερη αντίδραση.

Η δεύτερη αντίδραση αποτελεί την αντίστροφη πορεία, δηλαδή την ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο πολυμερές του γλυκογόνου, έτσι προκύπτει γλυκογόνο με ένα ή περισσότερα κατάλοιπα γλυκόζης με ταυτόχρονη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών από την G₁P. Η μέτρηση των ιόντων γίνεται φασματοφωτομετρικά και η ποσοτικοποίηση γίνεται με την μέθοδο του ασκορβικού οξέος. Στο τέλος η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 40 μL της δεύτερης αντίδρασης σε 10 μL SDS 1% με ανάδευση. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα αντιδραστήρια καθώς και η δράση τους.

Πρώτη αντίδραση → Υπόστρωμα h1PhK-γ-trunc

ATP	Υπόστρωμα κίνησης για την μεταφορά της φωσφορικής ομάδας και τη φωσφορυλίωση της GPb
GPb	Μετατρέπει σε GPa στην 1^η φάση και στη 2^η φάση (ως GPa) συνδέει την G1P με γλυκογόνο για την σχηματισμό Glycogen (n+1) και ορθοφωσφορικών (Pi)
PhK	Μετατρέπει την ανενεργό μορφή GPb σε ενεργό μορφή GPa
Buffer 4X	Tris 200 mM pH 8.2, Hepes 200 mM, MgCl₂ 40 mM, CaCl₂ 2 mM, DTT 8 mM

Δεύτερη αντίδραση → Υπόστρωμα GP

G1P	Ενώνεται με το γλυκογόνο και σχηματίζει Glycogen (n+1) και ορθοφωσφορικά (Pi) από την GPa
AMP Caffeine	Ο συνδυασμός των δύο στις συγκεντρώσεις που περιγράφονται παρακάτω αφήνει ενεργό μόνο την GPa και απενεργοποιεί την GPb
Glycogen	Μετατρέπεται σε Glycogen (n+1) και ορθοφωσφορικά (Pi) από την GPb

Στα ενζυμικά διαλύματα η προσθήκη του ATP έγινε τελευταία. Στην συνέχεια τα διαλύματα τοποθετούνται για επώαση σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C για 3 λεπτά. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν μάρτυρες (τυφλά), που περιείχαν Buffer αραίωσης κινάσης αντί για κινάση. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 20 μ L κινάσης ή 20 μ L Buffer αραίωσης κινάσης στους μάρτυρες (τυφλά). Στον πίνακα φαίνονται οι τελικές συγκεντρώσεις στην 1^η αντίδραση.

BAK	1X
HlPhK	20 ng/ml
rmGPb	1 mg/ml
ATP	0,1 mM
Εκχύλισμα ροδιού	1.915 μg/ml

Ο τελικός όγκος της 1^{ης} αντίδρασης ήταν 200 μ L. Σε χρονικά διαστήματα 3 λεπτών, 20 μ L από το μίγμα της αντίδρασης προστέθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι βρίσκονταν στον πάγο και περιείχαν 980 μ L TEA. Κατά το 2^ο στάδιο της αντίδρασης, λήφθηκαν από το διάλυμα TEA (980 μ L TEA + 20 μ L κινάση), 100 μ L τα οποία προστέθηκαν σε 100 μ L διαλύματος το οποίο περιέχει τελικές συγκεντρώσεις (AMP 10 μ M, G1P 10 mM, Glycogen 0,2 %, Caffeine 0,5 mM), αφού είχε προηγηθεί επώαση στους 30°C για 3 λεπτά. Ο συνολικός χρόνος της 2^{ης} αντίδρασης είναι 12 λεπτά και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 30°C. Μόλις ολοκληρωθεί η 2^η αντίδραση 40 μ L προστίθενται σε διάλυμα SDS 1 % w/v, όγκου 10 μ L και ακολουθεί ανάδευση. Παρουσία απορρυπαντικού τα ένζυμα αποδιατάσσονται. Τέλος ακολούθησε ο προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών (Pi) φασματοφωτομετρικά με την μέθοδο ανάλυσης με διάλυμα ασκορβικού οξέος, τόσο στα δείγματα όσο και στους μάρτυρες (τυφλά). Οι μάρτυρες περιείχαν SDS 1 % και ορθοφωσφορικά (Pi). Για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας ο οποίος περιείχε dH₂O και SDS 1 %.

Κατά την πειραματική πορεία το εκχύλισμα του ροδιού διαλύθηκε σε TEA Buffer pH 6.8 στην GP, ενώ στην κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου διαλύθηκε σε Hepes Buffer 20 mM με pH 8.2. Αυτό συμβαίνει διότι στο pH 6.8 αναστέλλεται η

δράση της PhK. Η αραιώση που πραγματοποιήθηκε στην κινάση ήταν [5 μ l εκχύλισμα ρόδι (0,383 μ g/ml) + 5 μ l HEPES pH 8.2, (20mM)].

2.15 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός στα εκχυλίσματα ροδιού

Η φασματοφωτομετρία στο ορατό και υπεριώδες φάσμα (UV-Visible) είναι μια γρήγορη και απλή μέθοδος. Χρησιμοποιήθηκε το Φασματοφωτόμετρο (VWR). Η σάρωση πραγματοποιήθηκε στα 200nm με 400 nm για το υπεριώδες φάσμα και 400nm με 700nm για το ορατό φάσμα. Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στα εκχυλίσματα ροδιού φαίνονται παρακάτω:

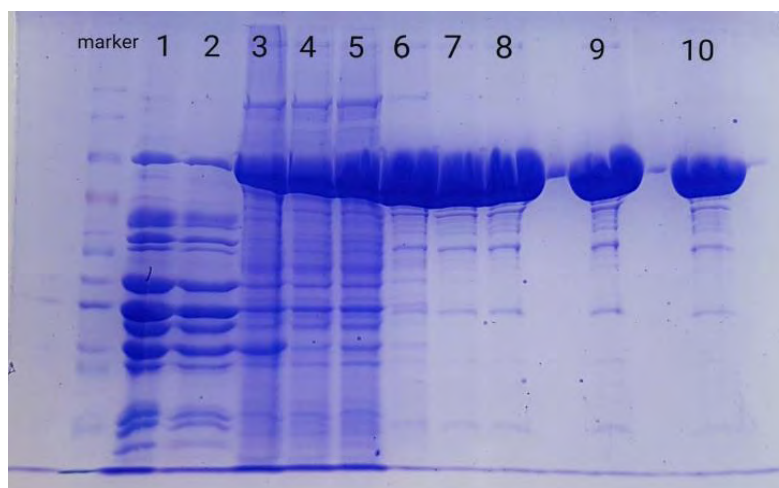
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑ ΡΟΔΙ	TEA	ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ
Ρόδι 1,3 μ g/ml	20 μ l	980 μ L	1000 μ l
Ρόδι 0,383 μ g/ml	20 μ l	980 μ L	1000 μ l

Τα εκχυλίσματα του ροδιού με την προσθήκη του TEA Buffer παρατηρήθηκε αλλαγή του χρώματος λόγω του ότι το pH του διαλύματος τείνει προς το 7.0.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Απομόνωση – Καθαρισμός της gmGPb

Η απομόνωση της gmGPb, έγινε από τρεις κόνικλους σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος. Στην (εικόνα 3.1) φαίνεται η πηκτή ακρυλαμιδίου με πυκνότητα 10 % υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Τα δείγματα που απομονώθηκαν από τα διάφορα στάδια της πειραματικής μεθόδου, αναλύθηκαν τόσο ως προς την καθαρότητα όσο και την ποσότητα.



Εικόνα 3.1: Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κόνικλων (97 kDa), ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus*. 10 % SDS-PAGE. Ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών, παρουσιάζεται αρχικά. Στην συνέχεια, πορεία 1: Πριν τη προσθήκη θειικού αμμωνίου, μετά την καταβύθιση των πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον και πριν την ρύθμιση του pH, πορεία 2: Μετά την προσθήκη θειικού αμμωνίου, πορεία 3: Μετά τη διαλύση σε 1 mM Tris-HCl, pH 7.5, πορεία 4: Μετά τη διαύγαση, υπερκείμενο, πορεία 5: 1^η κρυστάλλωση, πορεία 6: 1^η ανακρυστάλλωση, πορεία 7: 2^η ανακρυστάλλωση, πορεία 8: 3^η ανακρυστάλλωση, πορεία 9: 4^η ανακρυστάλλωση, πορεία 10: 5^η ανακρυστάλλωση.

Στην παραπάνω (εικόνα 3.1), φαίνεται ότι ο εμπλουτισμός και η καθαρότητα της πρωτεΐνης κατά τα στάδια των κρυσταλλώσεων και των ανακρυσταλλώσεων της gmGPb, αυξάνονται σημαντικά, ενώ οι πρωτεΐνες οι οποίες δεν κρυσταλλώνονται στις συνθήκες αυτές απομακρύνονται με την διαδικασία της φυγοκέντρησης. Τέλος, στην πορεία 10, το ποσοστό καθαρότητας που έφτασε η φωσφορυλάση του

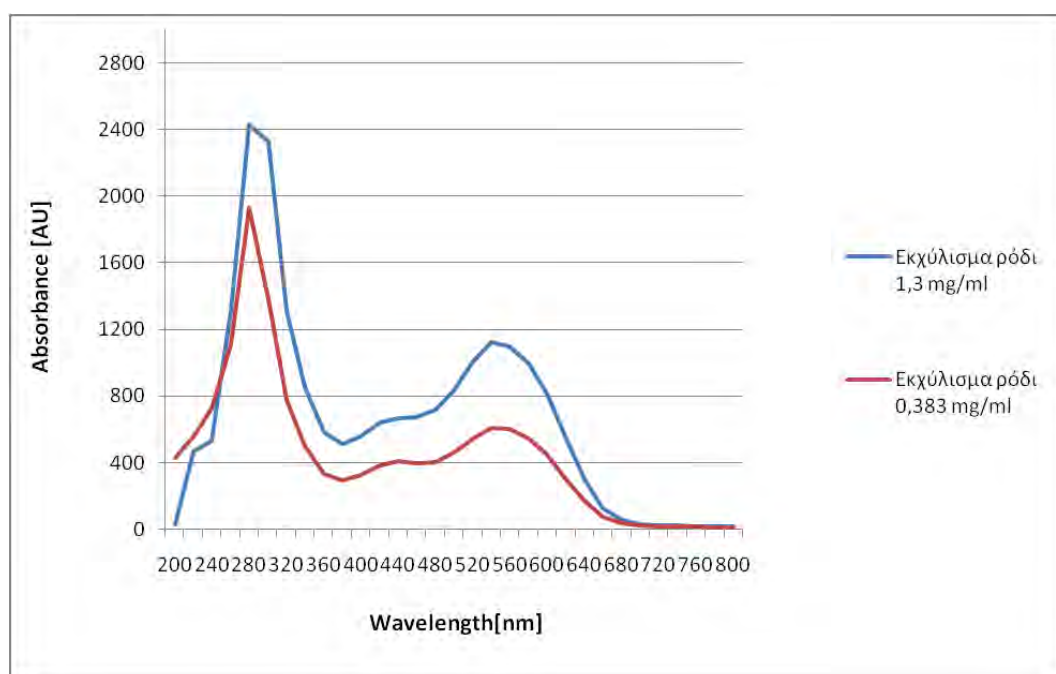
γλυκογόνου ήταν μεγαλύτερο του 95 %. Το ποσοστό αυτό επιτρέπει στο ένζυμο να κρυσταλλωθεί. Η συνολική απόδοση της απομόνωσης και καθαρισμού της πρωτεΐνης ήταν:

336,2 mg gmGPb ανά kg σκελετικών μυών κονίκλων.

3.2 Προσδιορισμός γλυκόζης στο εκχύλισμα ροδιού

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λάβαμε από το πειραματικό μέρος και τα οποία αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα, διαπιστώσαμε ότι τα προς εξέταση δείγματα δεν περιείχαν ή περιείχαν γλυκόζη χαμηλότερης συγκέντρωσης από τα όρια ευαισθησίας του συγκεκριμένου kit που χρησιμοποιήσαμε για τον προσδιορισμό της γλυκόζης στο εκχύλισμα του ροδιού με συγκέντρωση 1,3 $\mu\text{g/ml}$.

3.3 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός στο εκχύλισμα ροδιού



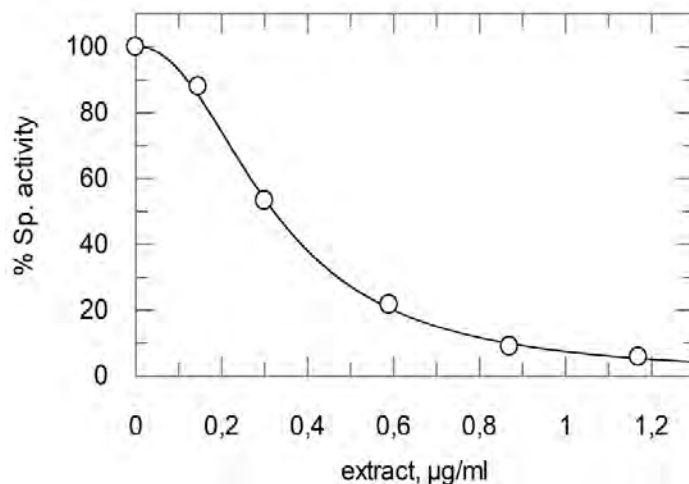
Εικόνα 3.2: Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός στα δύο εκχυλίσματα ροδιού με συγκέντρωση 1,3 $\mu\text{g/ml}$ και 0,383 $\mu\text{g/ml}$.

Στην παραπάνω (εικόνα 3.2) παρουσιάζονται οι απορροφήσεις που πραγματοποιήθηκαν στα δύο εκχυλίσματα ροδιού με συγκέντρωση 1,3 $\mu\text{g/ml}$ και 0,383 $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα. Η σάρωση πραγματοποιήθηκε στα 200nm έως 400nm για το υπεριώδες φάσμα όπου το εκχύλισμα ροδιού με συγκέντρωση 1,3 mg/ml παρουσίασε μεγαλύτερη απορρόφηση (peak-2427) στα 280nm. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε σάρωση και στο ορατό φάσμα 400nm έως 800nm όπου εκεί φαίνεται ότι το εκχύλισμα με συγκέντρωση 1,3 mg/ml παρουσίασε και πάλι μεγαλύτερη απορρόφηση (peak-1122) στα 540nm. Η αραίωση πραγματοποιήθηκε σε TEA Buffer pH 6.8 και για τα δύο εκχυλίσματα.

3.4 Κινητική μελέτη του εκχυλίσματος ροδιού, ποικιλίας «Ερμιόνη»

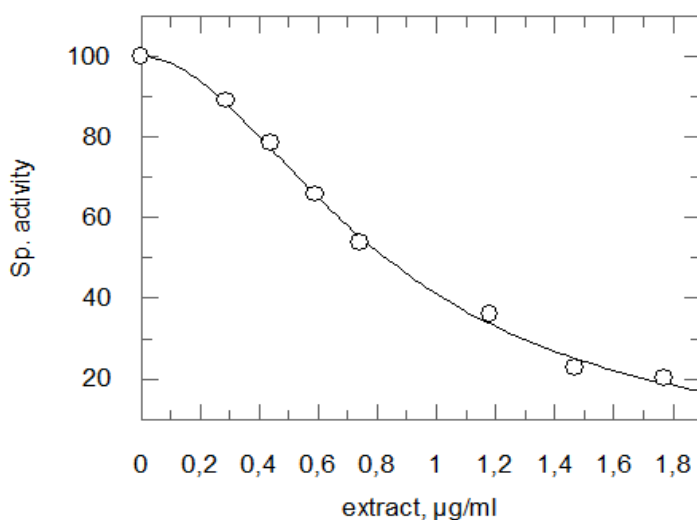
Αφού πραγματοποιήθηκε η απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, μελετήσαμε το εκχύλισμα ροδιού για να διαπιστωθεί πειραματικά η ικανότητα των ανθοκυανινών στο να αναστέλλουν την δράση του ενζύμου. Συγκεκριμένα μελετήσαμε δύο ένζυμα την gmGPb και hlGPα έτσι ώστε να διαπιστωθεί, αν υπάρχει καλύτερη αναστολή σε αυτά τα δύο ένζυμα. Τα αποτελέσματα καθώς και οι γραφικές παραστάσεις των κινητικών πειραμάτων που προέκυψαν από το πρόγραμμα «GRAFIT», παρουσιάζονται παρακάτω.

- **IC₅₀ των ανθοκυανινών με συγκέντρωση (0,383 µg/ml) έναντι της hIGP-a και rmGP-b.**



Εικόνα 3.3: Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών και υπολογισμός της IC₅₀ στο hIGP-a. Τα µg/ml του αναστολέα που απεικονίζονται στο διάγραμμα είναι οι εξής: **0 µg/ml (κοντρόλ), 0,146 µg/ml, 0,300 µg/ml, 0,590 µg/ml, 0,870 µg/ml, 1,170 µg/ml.**

Parameter	Value	Std. Error
IC ₅₀	0,3209 µg/ml	0,0143 µM
Slope factor	2,2210 µg/ml	0,1 µM



Εικόνα 3.4: Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών και υπολογισμός της IC₅₀ στο rmGP-b. Τα µg/ml του αναστολέα που

απεικονίζονται στο διάγραμμα είναι οι εξής: **0 µg/ml (κοντρόλ), 0,29 µg/ml, 0,44 µg/ml, 0,59 µg/ml, 0,74 µg/ml, 1,18 µg/ml, 1,47 µg/ml, 1,77 µg/ml.**

Parameter	Value	Std. Error
IC ₅₀	0,8286 µg/ml	0,0252 µM
Slope factor	1,9154 µg/ml	0,1 µM

3.5 Κινητικές μελέτες στην κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Ύστερα από κινητικές μελέτες που υποβλήθηκε το εκχύλισμα ροδιού (ποικιλίας Ερμιόνη) και συγκεκριμένα οι ανθοκυανίνες, δεν παρουσιάστηκε καμία αναστολή στην δράση της hI_{Ph}K. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση ροδιού-αναστολέα (1,915 µg/ml

VI. Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήσαμε μελέτες για την ανασταλτική δράση που παρουσιάζουν οι ανθοκυανίνες από εκχύλισμα ροδιού ποικιλίας «ΕΡΜΙΟΝΗ» με συγκέντρωση 0,383 μg/ml. Ο σχεδιασμός αναστολέων τόσο στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*), που αποτελεί καθοριστικό ένζυμο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου, όσο και στην κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*PhK*), αποτελούν μοριακό στόχο για την δημιουργία νέων φαρμάκων με υπογλυκαιμικές ιδιότητες. Οι αναστολείς θεωρούνται ως δυνητικοί αντι-γλυκαντικοί παράγοντες.

Οι τιμές των σταθερών αναστολής IC_{50} που υπολογίστηκαν έναντι της h1GPα ήταν $0,32 \pm 0,014 \mu\text{M}$, ενώ έναντι της rmGPb ήταν $0,83 \pm 0,025 \mu\text{M}$, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην δραστικότητα της PhK.

Θα ακολουθηθεί μια σειρά μελετών ενζυμικής κινητικής και κρυσταλλογραφία συγγένειας, ώστε να προσδιοριστεί το πιο δραστικό μόριο το οποίο περιέχεται στο μίγμα ανθοκυανινών και να προσδιοριστεί το κέντρο σύνδεσης της φωσφορυλάσης γλυκογόνου.

VII. Παράρτημα

AMP	Adenosine Monophosphate
ATP	Adenosine Triphosphate
APS	Ammonium Persulfate
PhK	Phosphorylase Kinase
PLP	Pyridoxal Phosphate
GP	Glycogen Phosphorylase
rmGP	Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase
hlGP	Human Liver Glycogen Phosphorylase

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Agius Loranne, Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism, *Molecular Aspects of Medicine* 46 (2015) 34–45.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl 1:S81–S90.
3. Berg Jeremy M., John L. Tymoczko, Lubert Stryer, (2017) Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, ISBN 978-960-524-189-6.
4. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Chapter 21, Glycogen Metabolism. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21190/>.
5. Brunetti A, Chiefari E, Foti D. Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2014;5:128–140.
6. Chiang JL, Kirkman MS, Laffel LM, Peters AL; Type 1 Diabetes Sourcebook Authors. Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2014;37:2034–2054.
7. Chrysina, E. D.; Kosmopoulou, M. N.; Kardakaris, R.; Bischler, N.; Leonidas, D. D.; Kannan, T.; Loganathan, D.; Oikonomakos, N. G., (2005) Binding of β -d-glucopyranosyl bismethoxyphosphoramidate to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Biorg. Med. Chem.* 13 (3), 765- 772.
8. Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Saydah S, Imperatore G, Linder B, Divers J, Bell R, Badaru A, Talton JW, Crume T, et al. Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. *JAMA*. 2014;311:1778–1786.
9. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. 2004;328:750–754.
10. Doria A, Patti ME, Kahn CR. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2008;8:186–200.
11. Frayling TM. A new era in finding Type 2 diabetes genes-the unusual suspects. *Diabet Med*. 2007;24:696–701

12. Gardeli C., Varela K., Krokida E. and Mallouchos A., Investigation of Anthocyanins Stability from Pomegranate Juice (*Punica Granatum* L. Cv Ermioni) under a Simulated Digestion Process, *Medicines* 2019, 6, 90; doi:10.3390/medicines6030090
13. Gil M.I, Tomas-Barberan F.A, Hess-Pierce B, Holcroft D.M, Kader A.A. (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.* 48(10):4581–4589.
14. Hayes JM, Kantsadi AL, Leonidas DD. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochemistry Reviews* 2014;13:471-98
15. Hayes Joseph M., Anastassia L. Kantsadi, Demetres D. Leonidas, Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes, *Phytochem Rev* (2014) 13:471–498.
16. Hayes, J.M., Skamnaki, V.T., Archontis, G., Lamprakis, C., Sarrou, J., Bischler, N., et al. Kinetics, in silico docking, molecular dynamics, and MM-GBSA binding studies on prototype indirubins, KT5720, and staurosporine as phosphorylase kinase ATP-binding site inhibitors: The role of water molecules examined. *Proteins.* 2011, 79, 703-19
17. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 8th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017. <http://www.diabetesatlas.org>
18. Jurenka J. (2008) Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Alternative Medicine Review.* 13(2):128–144.
19. 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
20. Kantsadi Anastassia L., Anna Apostolou, Stavroula Theofanous, George A. Chatzileontiadou, Kalliope Pegiou, Vassiliki T. Skamnaki, Dimitrios Stagos, Dimitrios Kouretas, Anna-Maria G. Psarra, Serkos A. Haroutounian, Demetres D. Leonidas, Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification

- byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase, *Food and Chemical Toxicology* 67 (2014) 35–43.
21. Kharroubi, A. T., & Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World journal of diabetes*, 6(6), 850–867. doi:10.4239/wjd.v6.i6.850
 22. Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). *Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits*. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779. doi:10.1080/16546628.2017.1361779.
 23. Kosmopoulou, M. N.; Leonidas, D. D.; Chrysina, E. D.; Bischler, N.; Eisenbrand, G.; Sakarellos, C. E.; Pauptit, R.; Oikonomakos, N. G., (2004) Binding of the potential antitumour agent indirubin-5-sulphonate at the inhibitor site of rabbit muscle glycogen phosphorylase b. Comparison with ligand binding to pCDK2-cyclin A complex. *Eur. J. Biochem.* 271 (11), 2280-90.
 24. Lansky EP, Newman RA. (2007) *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 109(2):177–206.
 25. Müller TD, Finan B, Clemmensen C, DiMarchi RD, Tschöp MH. The New Biology and Pharmacology of Glucagon. *Physiological Reviews*. 2017;97(2):721–766.
 26. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide Trends in Diabetes since 1980: A Pooled Analysis of 751 Population-Based Studies with 4·4 Million Participants. *Lancet*. 2016; 387(10027):1513–30.
 27. Neurath AR, Strick N, Li Y-Y, Debnath AK. (2004) *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infectious Diseases*. 4, article 41.
 28. Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. (2002) Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem*. 50(1):166–171.
 29. Oikonomakos, N. G.; Kosmopoulou, M.; Zographos, S. E.; Leonidas, D. D.; Chrysina, E. D.; Somsák, L.; Nagy, V.; Praly, J.-P.; Docsa, T.; Tóth, B.; Gergely, P., (2002) Binding of N-acetyl-N'-β-d-glucopyranosyl urea

- and N-benzoylN'- β -d-glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase b.
Eur. J. Biochem., 269 (6), 1684-1696.
30. Pojer, E.; Mattivi, F.; Johnson, D.; Stockley, C.S. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2013, 12, 483–508.
 31. Trichopoulou, A.; Naska, A. What consumers eat. In *The Nutrition Handbook for Food Processors*; Henry, C.J.K., Chapman, C., Eds.; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2002; pp. 7–33. ISBN 978-1-85573-464-7.
 32. Wankhade, U.D.; Zhong, Y.; Lazarenko, O.P.; Chintapalli, S.V.; Piccolo, B.D.; Chen, J.R.; Shankar, K. Sex-Specific Changes in Gut Microbiome Composition following Blueberry Consumption in C57BL/6J Mice. *Nutrients* 2019, 11.
 33. Zois CE, Harris AL. Glucogen metabolism has a key role the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *Journal of Molecular Medicine – Imm.* 2016;94(2):137-54.