

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ**

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:**

**ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ**

**ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ**

**ΦΥΤΟΥ**

*Lotus japonicus*



**Ιάσων-Σπυρίδων Νικολάου Πατεργιαννάκης**

**ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ  
ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ  
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ**

*Lotus japonicus*

*Study of the bioactivity of secondary  
metabolites from the plant*

*Lotus japonicus*

**ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ  
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ**  
*Lotus japonicus*

**ΟΝΟΜΑ:** Ιάσων-Σπυρίδων Νικολάου Πατεργιαννάκης

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:** Βασιλική Τ. Σκαμνάκη

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ:** Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

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

## Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες .....	5
Περίληψη .....	6
Abstract .....	8
1 Εισαγωγή .....	9
1.1. Σακχαρώδης Διαβήτης .....	9
1.1.1. Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1 .....	9
1.1.2. Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 .....	10
1.1.2.1. Τι ισχύει στον T2DM .....	14
1.1.3. Θεραπείες για το Σακχαρώδη Διαβήτη .....	15
1.2. Γλυκογόνο .....	16
1.2.1. Έλεγχος γλυκόζης στο αίμα .....	18
1.2.2. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου .....	19
1.2.2.1. Ισομορφές φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .....	20
1.2.2.2. Αναγνωρισμένα κέντρα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .....	21
1.3. Χρήση Βοτάνων στη θεραπεία ασθενειών .....	22
1.4. Δευτερογενείς μεταβολίτες .....	23
1.5. <i>Lotus japonicus</i> .....	24
1.6. Σκοπός .....	25
2 Υλικά και Μέθοδοι .....	26
2.1 Αντιδραστήρια , υλικά και όργανα .....	26
2.1.1 Αντιδραστήρια .....	26
2.1.2 Υλικά .....	26
2.1.3 Όργανα .....	27
2.2 Παρασκευαστική μέθοδος .....	27
2.3 Αναλυτικές Μέθοδοι .....	27
2.3.1 Κινητική μελέτη του Ενζύμου gmGPb .....	27
2.3.2 Προσδιορισμός ορθοφωσφορικών .....	28
2.3.3 Διαλύματα .....	29
2.3.3.1 Ρυθμιστικά διαλύματα .....	29
2.3.3.2 Ενζυμικό διάλυμα .....	30

2.3.3.3	Διαλύματα εκχυλίσματος .....	30
2.3.3.4	Διαλύματα αντίδρασης .....	30
2.3.4	Προσδιορισμός Κινητικών παραμέτρων .....	30
2.3.5	Διαχείριση εκχυλισμάτων .....	31
2.3.6	Προσδιορισμός $IC_{50}$ .....	32
2.4	Δοκιμασία γλυκόζης .....	33
2.5	Κρυσταλλογραφία συγγένειας .....	33
2.5.1	Ανάπτυξη κρυστάλλων .....	34
2.5.2	Σχηματισμός συμπλόκων κρυστάλλων .....	34
2.5.3	Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	35
3.	Αποτελέσματα .....	36
3.1.	Κινητική Μελέτη .....	36
3.1.1.	Προσδιορισμός Κινητικών Παραμέτρων .....	36
3.1.2.	Προσδιορισμός $IC_{50}$ .....	37
3.1.3.	Δοκιμασία γλυκόζης.....	39
3.1.4.	Κρυσταλλογραφία συγγένειας .....	39
	Συζήτηση.....	41
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α.....	42
1.	Εισαγωγή στην Κρυσταλλογραφία .....	42
2.	Κρύσταλλοι.....	42
3.	Αρχές πρωτεϊνικής κρυστάλλωσης.....	43
4.	Περίθλαση ακτινών Χ.....	44
5.	Νόμος του Bragg.....	45
6.	Προσδιορισμός Δομής .....	45
7.	Βελτιστοποίηση δομής και παράγοντας R.....	46
	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	47
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	49

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το Φεβρουάριο του 2020 έως το Σεπτέμβριο του 2020, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Σκαμνάκη Βασιλική.

Ευχαριστώ θερμά την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη της. Την επίτευξη της εργασίας καθόρισε η καθοδήγηση και η ενθάρρυνση της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, τον Καθηγητή Λεωνίδα Δημήτριο και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παπαδοπούλου Καλλιόπη, για τη συνεργασία και για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια και τη δημιουργία ενός ευχάριστου εργασιακού κλίματος. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την μεταδιδακτορικό ερευνήτρια Δράκου Χριστίνα για την απεριόριστη συμπαράσταση, στήριξη και βοήθεια που παρείχε, αλλά και για την υπομονή και τη διάθεση της, καθώς ήταν πάντοτε πρόθυμη να με καθοδηγήσει. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στον υποψήφιο διδάκτορα Κούλα Συμεών για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για ηθική στήριξη, την απεριόριστη υποστήριξη και βοήθειά τους τόσο στον ψυχολογικό όσο και στον οικονομικό τομέα και για την συμβολή τους όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

## Περίληψη

Μία από τις σοβαρότερες μεταβολικές διαταραχές είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία). Χωρίζεται σε διαφορετικούς υποτύπους που όμως όλοι χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και σχετίζονται με αδυναμία απόκρισης στην ινσουλίνη ή και μειωμένα επίπεδα έκκρισης ινσουλίνης. Ο σακχαρώδης διαβήτης οφείλεται ή στην έλλειψη ινσουλίνης στο αίμα ή στην ανεπάρκεια των β κυττάρων του παγκρέατος.

Για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στην ανακάλυψη μορίων που στοχεύουν ένζυμα που ελέγχουν το βιοχημικό μονοπάτι της γλυκογονόλυσης που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase, GP) συμμετέχει στη γλυκογονόλυση καταλύοντας το πρώτο βήμα καταβολισμού του γλυκογόνου.

Η GP οδηγεί στην παραγωγή της 1-φωσφορικής γλυκόζης και στα ηπατικά κύτταρα συμμετέχει στο μονοπάτι παραγωγής της ελεύθερης γλυκόζης που θα απελευθερωθεί στο κυκλοφορικό σύστημα. Εντοπίζεται σε δύο διαμορφώσεις. Η φωσφορυλιωμένη GP<sub>a</sub> βρίσκεται στην ενεργή R διαμόρφωση και εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ. Η αποφωσφορυλιωμένη GP<sub>b</sub> η οποία βρίσκεται στη λιγότερο δραστική T διαμόρφωση εντοπίζεται κυρίως στους μύες. Η GP είναι ένας φαρμακευτικός στόχος για την καταπολέμηση της υπεργλυκαιμίας και μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της παθολογίας του σακχαρώδους διαβήτη. Μία προσέγγιση της θεραπείας με στόχο την GP αποτελεί η χρήση φυσικών προϊόντων που αναστέλλουν το ένζυμο, τα οποία έχουν πλεονεκτήματα έναντι των χημικών φαρμακευτικών προϊόντων.

Το *Lotus japonicus* είναι ένα φυτό-οργανισμός-μοντέλο που ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών και στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε ως προς την ικανότητα μέσω δευτερογενών μεταβολιτών του να αναστέλλει την GP.

Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκε η βιοδραστικότητα των δευτερογενών μεταβολιτών του *Lotus japonicus* που υπάρχουν σε 6 διαφορετικά εκχυλίσματα. Πραγματοποιήθηκε in vitro κινητική μελέτη για τον προσδιορισμό της IC<sub>50</sub>. Τα δείγματα που εμφάνιζαν αναστολή ελέγχθηκαν εφαρμόζοντας κρυσταλλογραφία συγγένειας. Από

τα 6 εκχυλίσματα, μόνο τα δύο εκχυλίσματα από ρίζες εμφάνισαν σημαντική αναστολή, αυτό με οξικό αιθυλεστέρα και αυτό με μεθανόλη. Όμως δεν παρατηρήθηκε in crystallo σύνδεση κάποιου μεταβολίτη.



## Abstract

Diabetes mellitus is one of the most serious metabolic disorders. DM is characterized by high blood glucose levels (hyperglycemia). DM is divided into various subtypes but all of them are characterized by elevated glucose levels and are associated with inability to respond to insulin or decreased levels of insulin secretion. Diabetes mellitus is caused by either a lack of insulin in the blood or a deficiency of  $\beta$  cells in the pancreas.

The basis of diabetes' treatment lies on molecules that target enzymes that control the biochemical pathway of glycogenolysis involved in regulating blood glucose levels. Glycogen phosphorylase (Glycogen Phosphorylase, GP) is involved in glycogenolysis by catalyzing the first step of glycogen catabolism.

GP leads to the production of glucose 1-phosphate. Its reaction in the liver cells participates in the pathway of production of glucose that will be released into the circulatory system. It is met in two configurations. Phosphorylated GP<sub>a</sub> is in the active R configuration and it is found mainly in the liver. Dephosphorylated GP<sub>b</sub> which is in the less active T formulation and it is found mainly in muscle. GP is a molecular target of drugs for the control of glucose levels in the bloodstream and thus the reduction of the pathology of diabetes mellitus. One approach to GP therapy is the usage of natural products that inhibit the enzyme, which have advantages over chemical drugs.

*Lotus japonicus* is a model plant organism that belongs to the legume family and in the present study it was examined for its ability to inhibit GP through secondary metabolites.

In this experiment, the bioactivity of the secondary metabolites of *Lotus japonicus* present in 6 different extracts was examined. In vitro kinetic study was performed to determine  $IC_{50}$ . The samples that inhibited the enzyme rmGP<sub>b</sub> were applied in affinity crystallography. Of the 6 extracts, only two root extracts showed significant inhibition, one with ethyl acetate and one with methanol. However, in crystallo there was no metabolite bound on the enzyme.

## ***1 Εισαγωγή***

### ***1.1. Σακχαρώδης Διαβήτης***

Ο σακχαρώδης διαβήτης (Diabetes Mellitus - DM) είναι μία μεταβολική νόσος που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα για μεγάλα χρονικά διαστήματα (1). Ο αριθμός των πασχόντων παρουσιάζει αυξητική πορεία στο πέρασμα του χρόνου (2). Ένας στους πέντε ενήλικες με ηλικία άνω των 65 ετών ζει με DM. Το 2019 μετρήθηκαν περισσότεροι από 460 εκατομμύρια πάσχοντες (2). Η νόσος αυτή υπολογίζεται ότι θα παρουσιάζεται σε 700 εκατομμύρια άτομα μέχρι το 2045 (2). Ο DM επηρεάζει σημαντικά και μικρότερες ηλικίες καθώς περισσότερες από μία στις έξι γεννήσεις ζωντανών μωρών επηρεάζονται από διαβήτη κατά την εγκυμοσύνη (2).

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι απαραίτητο να ρυθμίζεται στις απαρχές του. Ο μη ρυθμιζόμενος σακχαρώδης διαβήτης έχει σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία του ατόμου. Οι συνέπειες μπορεί να είναι στηθάγχη, αγγειοεγκεφαλική νόσος, διαβητική καρδιομυοπάθεια, περιφερική αρτηριακή νόσος, υπέρταση, δυσλιπιδαιμία, χρόνια νεφρική νόσος, διαβητική νευροπάθεια, δημιουργία ελκών των κάτω άκρων, στυτική δυσλειτουργία και ψυχολογικές διαταραχές (3).

Ο σακχαρώδης διαβήτης κατηγοριοποιείται σε τρεις κυρίως ομάδες, τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (Type 1 Diabetes Mellitus - T1DM), τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Type 2 Diabetes Mellitus - T2DM) και τον διαβήτη της κύησης (Gestational Diabetes Mellitus - GDM) (1).

#### ***1.1.1. Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1***

Ο T1DM είναι μία αυτοάνοση ασθένεια κατά την οποία τα β-κύτταρα του παγκρέατος που εκκρίνουν ινσουλίνη, αναγνωρίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα και καταστρέφονται, με αποτέλεσμα να υπάρχει ανεπάρκεια ινσουλίνης στον οργανισμό (4). Για το λόγο αυτό, ο T1DM αποκαλείται και ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης. Ο τύπος αυτός του διαβήτη οφείλεται για το 5% των υποθέσεων σακχαρώδους διαβήτη παγκοσμίως. Ονομάζεται και παιδικός διαβήτης καθώς συχνά εμφανίζεται σε νεαρή ηλικία(4). Οι ασθενείς του T1DM, οι οποίοι έχουν χειρότερο μεταβολισμό γλυκόζης, είναι

ιδιαίτερα επιρρεπείς σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας (5) και μία πιθανή σοβαρή επιπλοκή είναι η διαβητική κετοξέωση (4). Η κύρια θεραπεία που ακολουθείται κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου είναι η καθημερινή χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης (4).

Ο κίνδυνος πρόκλησης T1DM αρχίζει με την παραγωγή φλεγμονικών παραγόντων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Η φλεγμονή θα προκαλέσει την παραγωγή χυμοκινών από τα β-κύτταρα και την περαιτέρω πρόκληση φλεγμονής (6). Οι χυμοκίνες οδηγούν στην αύξηση της αντίδρασης από το ανοσοποιητικό και έτσι αναπτύσσεται ένας κύκλος θανάτωσης κυττάρων του παγκρέατος από το ανοσοποιητικό (6). Ο κύκλος αυτός αν δεν σταματήσει ενδέχεται να καταλήξει σε ανάπτυξη του διαβήτη τύπου 1 (6). Το πρόβλημα γίνεται εμφανές όταν τα β-κύτταρα έχουν φτάσει στο 20-30% της αρχικής τους μάζας οπότε αναπτύσσεται η υπεργλυκαιμία και η γλυκοζουρία (συμπτώματα του διαβήτη) (6). Η διάγνωση στηρίζεται στην αύξηση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (Hemoglobin A1c - HbA1c) (6). Τα αίτια ανάπτυξης σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 είναι πολύπλοκα και πολυπαραγοντικά, η ασθένεια αυτή οφείλεται σε συνδυασμό περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων (4).

#### 1.1.2. Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2

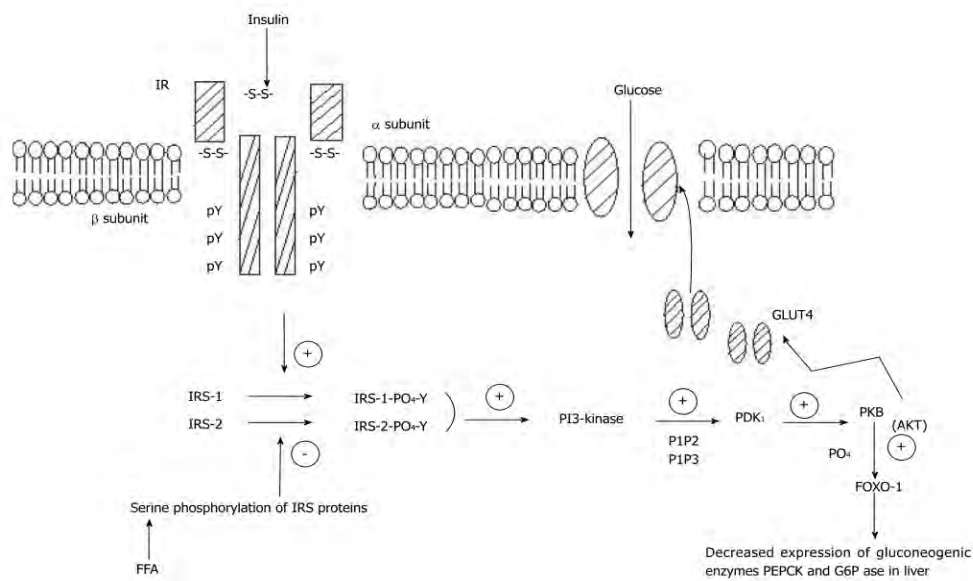
Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (T2DM) κυριαρχεί στις μεταβολικές διαταραχές σε παγκόσμιο επίπεδο ως συνέπεια του σύγχρονου τρόπου ζωής (7). Ο T2DM είναι πιθανότερο να προσβάλλει άτομα μεγάλης ηλικίας, ωστόσο δεν αποκλείεται να νοσήσουν και άτομα νεαρής ηλικίας (8). Ο T2DM είναι μία νόσος που χαρακτηρίζεται από την υπεργλυκαιμία, καταστάσεις που οφείλονται κυρίως στην αντίσταση στην ινσουλίνη (9). Η εμφάνιση του T2DM γίνεται σε μία διαδικασία δύο βημάτων (9). Σε πρώτο βήμα το άτομο με αντίσταση στην ινσουλίνη έχει αρχικά κανονική ανοχή στη γλυκόζη (Normal Glucose Tolerance - NGT), στη συνέχεια επιδεινώνονται η ανοχή στη γλυκόζη (Impaired Glucose Tolerance - IGT) και τα επίπεδα γλυκόζης σε κατάσταση νηστείας (Impaired Fasting Glucose - IFG), γίνεται δηλαδή προδιαβητικός, και σε δεύτερο βήμα καταλήγει σε διαβήτη τύπου 2 (9). Κατά τη μετάβαση από το στάδιο NGT σε προδιαβήτη, τα β-κύτταρα του παγκρέατος αδυνατούν να αντισταθμίσουν την αντίσταση στην ινσουλίνη με έκκριση επιπλέον ποσότητας ινσουλίνης. Επομένως τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα αυξάνονται,

καθώς δεν ρυθμίζεται σωστά η ομοιόσταση της γλυκόζης (9). Αυτό συμβαίνει διότι κύτταρα όπως μυϊκά, ηπατικά και λιποκύτταρα εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη (9).

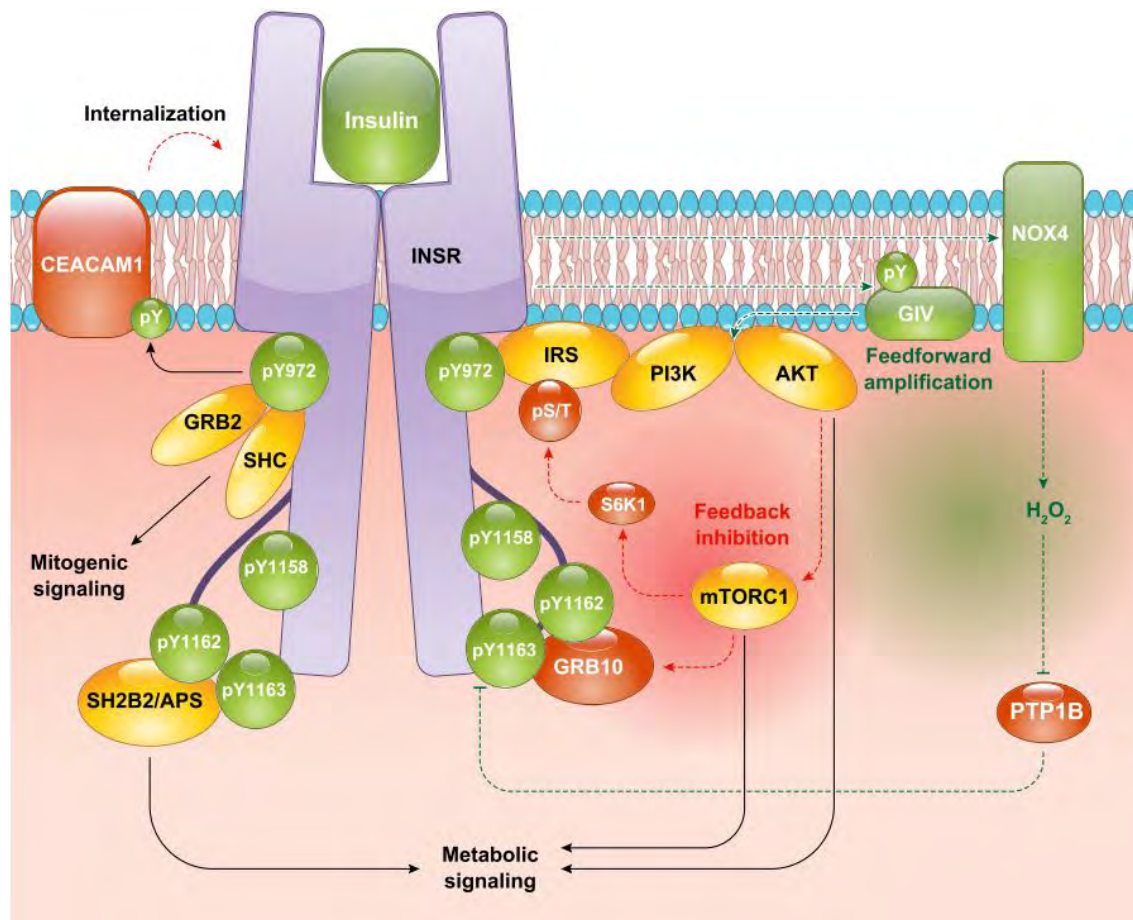
Η αντίσταση στην ινσουλίνη ορίζεται ως η ανάγκη υψηλότερων συγκεντρώσεων ινσουλίνης για την επαγωγή της απόκρισης του κυττάρου στην ινσουλίνη (10). Η αντίσταση της ινσουλίνης οφείλεται σε μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης (Εικόνα 2) που βρίσκονται καθοδικά της πρόσδεσης της ορμόνης στον υποδοχέα της (Insulin Receptor – INSR - IR) (Εικόνα 1) (10). Μετάλλαξη στην Akt2 (κινάση που συνεισφέρει στη μεταφορά μεταφορέων γλυκόζης 4 (Glucose transporter 4 – GLUT4)) μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση στην ινσουλίνη (10). Μειωμένη ενεργότητα της Akt2 οδηγεί στη μειωμένη φωσφορυλίωση FOXO1 (Forkhead family of transcription factors) με αποτέλεσμα να εισέρχεται στον πυρήνα και να ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων γλυκονεογένεσης (10). Αύξηση της φωσφορυλίωσης σερινών (Serine – Ser) του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης (Insulin Receptor Substrate – IRS) οδηγεί σε αποσύνδεση του από την κινάση-3 φωσφοϊνοσιτιδίων (Phosphoinositide 3-kinase – PI3K) και με αυτόν τον τρόπο εμποδίζεται η ενεργοποίηση της PI3K (10). Η PI3K φυσιολογικά συμβάλλει στην παραγωγή τριφωφορικής-3,4,5-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (Phosphatidylinositol-3,4,5- triphosphate – PIP3), η οποία ενεργοποιεί την Akt. Η PI3K αποτελείται από δύο υπομονάδες (p85 και p110). Η p85 είναι η ρυθμιστική και η p110 είναι η καταλυτική (10). Το σύμπλοκο p85-p110 έχει τη δυνατότητα κατάλυσης και προσδέεται με το IRS. Στο κύτταρο υπάρχουν και ελεύθερες υπομονάδες p85 σε ισορροπία με το p85-p110 που ανταγωνίζονται το σύμπλοκο στη σύνδεση με το IRS (10). Αν υπάρξει ανισορροπία p85 και συμπλόκου (π.χ. με αύξηση έκφρασης p85) τότε μειώνεται η ικανότητα ενεργοποίησης της PI3K, κατάσταση που οδηγεί σε φαινότυπο αντίστασης στην ινσουλίνη. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα προκαλούν την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (Protein Kinase C – PKC) μέσω της υψηλής παραγωγής διακυλογλυκερόλης (Diacylglycerol – DAG) (10). Η PKC φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα ινσουλίνης σε Ser, συμβάλλει στην αναστολή της μεταγραφής IR και οδηγεί σε ελαττωματική σηματοδότηση (10). Η μεταγραφή του γονιδίου IR επάγεται από το μεταγραφικό παράγοντα HMGA1 (High Mobility Group AT-Hook 1) (10). Η μείωση της μεταγραφής του IR οφείλεται είτε σε μειωμένη έκφραση του HMGA1 είτε σε φωσφορυλίωση του από την PKC<sub>ε</sub> (10). Η φωσφορυλίωση του HMGA1 έχει ως

αποτέλεσμα την μειωμένη ικανότητα πρόσδεσής του στο DNA και τη μείωση της μεταγραφής του IR (10). Ο PGC-1 (PPAR $\gamma$  co-activator-1) επάγει την έκφραση GLUT4 και πρωτεϊνών οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και ρυθμίζεται από Akt και FOXO (10). Η απορρύθμιση του PGC-1 παράγοντα μπορεί να οδηγήσει σε φαινότυπο αντίστασης ινσουλίνης (10). Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη (Εικόνα 3) (10). Μειωμένη οξειδωτική φωσφορυλίωση συσχετίζεται σε αυξημένη εναπόθεση λιπιδίων στα κύτταρα και αυξημένη φωσφορυλίωση σερινών στο IRS (10). Οι ορμόνες που εκκρίνονται από τον λιπώδη ιστό έχουν ρόλο στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη (Εικόνα 3) (10). Ο TNF $\alpha$  οδηγεί σε αύξηση της φωσφορυλίωσης του IRS και σε μείωση της έκφρασης GLUT4 (10). Η λεπτίνη έχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση σωματικού βάρους και πρόσληψης τροφής και έχει άμεση επίδραση στην ευαισθησία στην ινσουλίνη (10), μέσω ενεργοποίησης μορίων που συμμετέχουν στη σηματοδότηση ινσουλίνης (π.χ. PI3K) (11). Η αδιπονεκτίνη αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη αυξάνοντας την παραλαβή γλυκόζης από μύες και λιποκύτταρα (10). Η λεπτίνη και η αδιπονεκτίνη έχουν μειωμένη έκφραση σε άτομα με παχυσαρκία. Η ρεζιστίνη μειώνει την επαγόμενη από ινσουλίνη μεταφορά γλυκόζης(10).

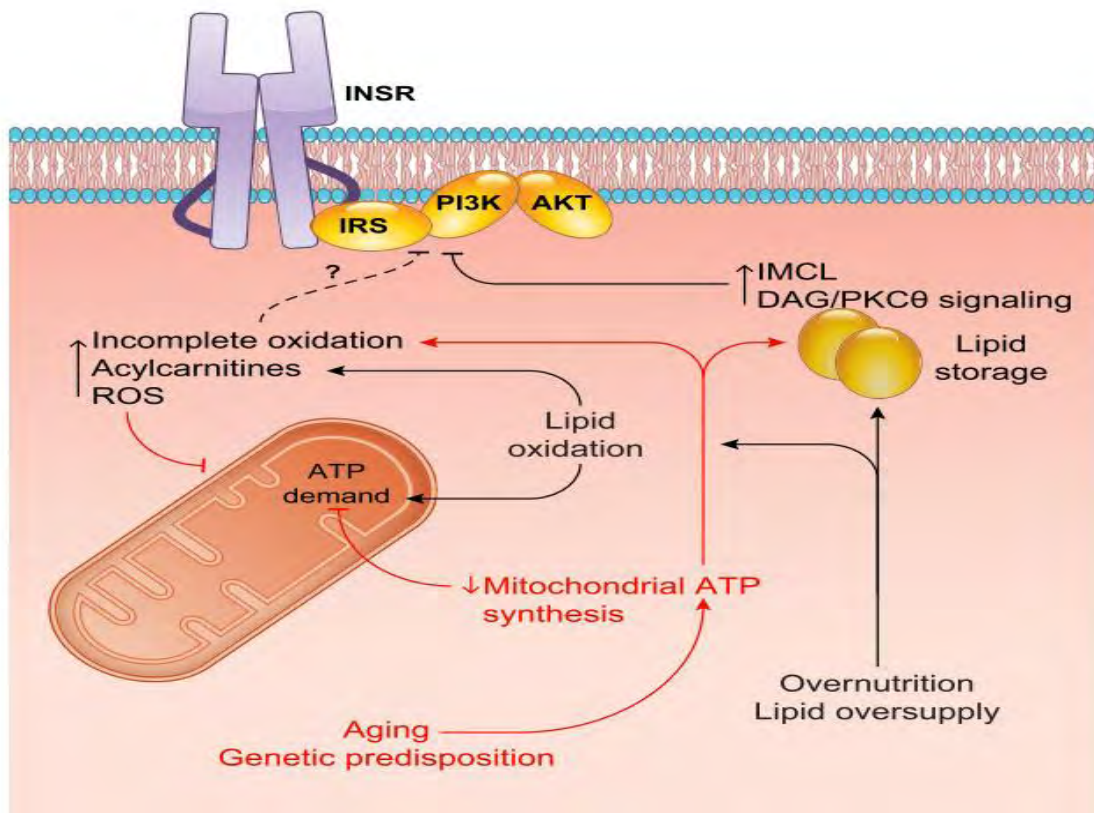
Ο T2DM συνοδεύεται από υπεργλυκαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη, ωστόσο υπάρχουν και εξαιρέσεις(9).



**Εικόνα 1:** Επαγόμενη από ινσουλίνη μεταφορά GLUT4 στη μεμβράνη και η επίδραση ελεύθερων λιπαρών οξέων στα IRS (10). FFA - Free Fatty Acids, PEPCK - Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, G6P - Glucose 6-Phosphate, PDK1 - Phosphoinositide-Dependent Kinase-1



**Εικόνα 2:** Τα μονοπάτια σηματοδότησης από την εγγύς δράση της ινσουλίνης. Το πράσινο χρώμα στα βέλη και στους κύκλους δίνει σήμα για την ενεργοποίηση-θετική ρύθμιση ενώ το κόκκινο χρώμα χρησιμοποιείται για την αρνητική ρύθμιση. Η Ινσουλίνη συνδέεται στον υποδοχέα της. Ο INSR αλλάζει διαμόρφωση επιτρέποντας την αυτοφωσφορυλίωση στις Tyr1162, Tyr1158, Tyr1163. Η φωσφορυλίωση των Tyr αυτών επιτρέπει την αυτοφωσφορυλίωση της Tyr972 (13). Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στην στρατολόγηση μορίων που αναγνωρίζουν το μοτίβο φωσφορυλίωσης Tyr του INSR (13). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορούν να οδηγήσουν πρωτογενώς σε σηματοδότηση του μεταβολικού μονοπατιού και δευτερογενώς σε σηματοδότηση μίτωσης (13). Το μονοπάτι μίτωσης ξεκινά με τα μόρια GRB2 και SHC. Το CEACAM1 φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται επάγοντας την εσωτερίκευση του INSR. Ο INSR ενεργοποιεί την NOX4 η οποία μέσω παραγωγής  $H_2O_2$  αναστέλλει PTP1B που όταν είναι ενεργή δρα αποφωσφορυλιώνοντας τον INSR. Το IRS προσδένεται στην φωσφορυλιωμένη Tyr972 και φωσφορυλιώνεται σε κατάλοιπα Tyr (13). Τα φωσφορυλιωμένα μοτίβα Tyr του IRS αναγνωρίζονται από την PI3K. Η ενεργοποίηση της PI3K οδηγεί στην παραγωγή PIP3. Η συσσώρευση PIP3 οδηγεί στην ενεργοποίηση της AKT κινάσης (13). Η GIV φωσφορυλιώνεται από τον INSR και δρα ενισχύοντας της δράση της AKT (13). Η AKT ενεργοποιεί έμμεσα το mTORC1(13). Το mTORC1 ενεργοποιεί την S6K1, η οποία φωσφορυλιώνει το IRS σε S,T και το απενεργοποιεί (13). Το mTORC1 φωσφορυλιώνει το GRB10, το οποίο προσδένεται στο INSR με ανασταλτική επίδραση (13). Τα ενεργά μόρια APS, mTORC1 και AKT δρουν επάγοντας μεταβολικά μονοπάτια (13), τα οποία σχετίζονται με τη σύνθεση λιπιδίων, τη σύνθεση πρωτεϊνών, τη ρύθμιση πρόσληψης γλυκόζης και τη ρύθμιση σύνθεσης γλυκογόνου (14) (13).

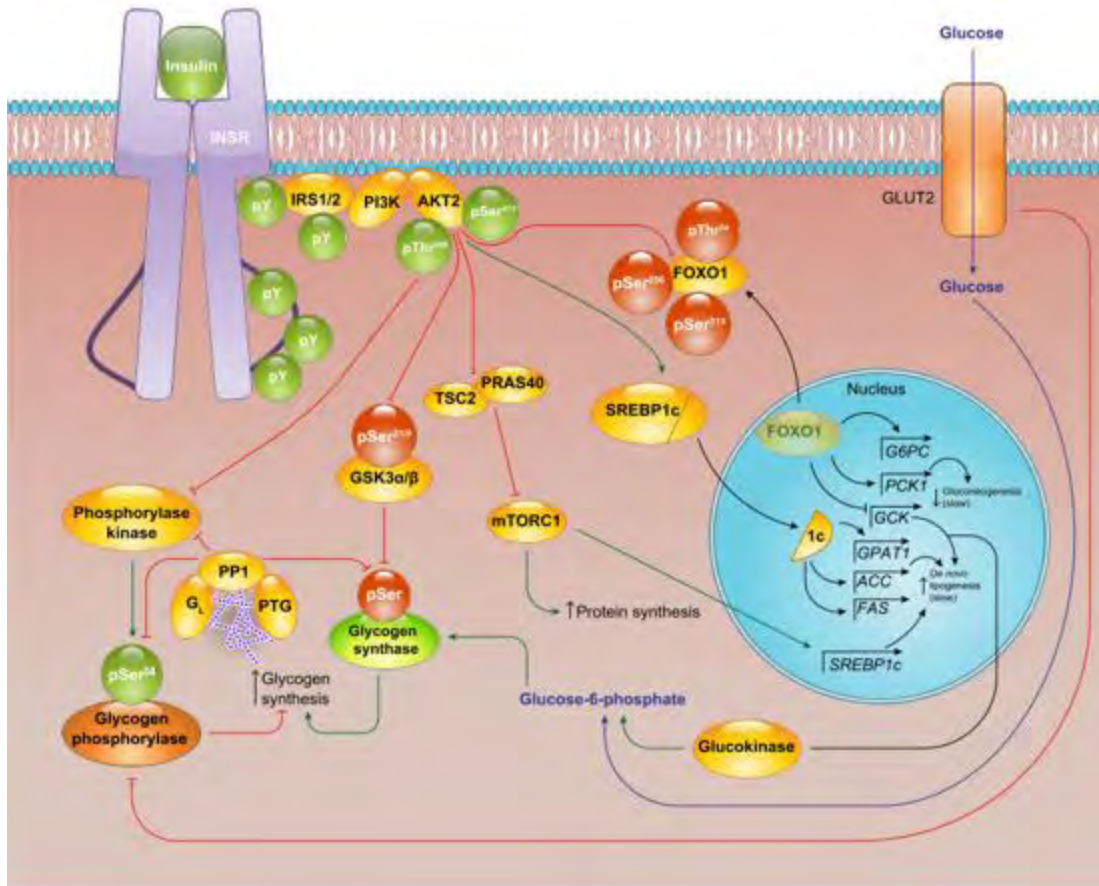


**Εικόνα 3:** Επίδραση των λιπιδίων και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στην αντίσταση στην ινσουλίνη. Οι διακεκομμένες γραμμές με το ερωτηματικό τονίζουν την άγνοια μηχανισμού. IMCL – Intramyocellular Lipid Metabolism, ROS – Reactive Oxygen Species (13).

#### 1.1.2.1. Τι ισχύει στον T2DM

Σε ασθενείς με T2DM υπάρχει μειωμένη σηματοδότηση από την ινσουλίνη, με αποτέλεσμα να απορρυθμίζεται η μεταφορά γλυκόζης εντός του κυττάρου (9). Η ινσουλίνη φυσιολογικά δρα επάγοντας την αναστολή της γλυκονεογένεσης, τη σύνθεση του γλυκογόνου, της λιπογένεσης και της πρωτεϊνικής σύνθεσης (Εικόνα 4) (13). Η διατάραξη του μονοπατιού απόκρισης της ινσουλίνης οδηγεί σε διατάραξη της αποθήκευσης της γλυκόζης, σε μείωση της ανεκτικότητας σε γλυκόζη, σε αντίσταση στην ινσουλίνη και σε υπεργλυκαιμία (9).





**Εικόνα 4:** Τα γεγονότα της ηπατοκυτταρικής σηματοδότησης της ινσουλίνης και η ρύθμιση της γλυκογονογένεσης. Το πράσινο χρώμα στα βέλη και στους κύκλους δίνει σήμα για την ενεργοποίηση-θετική ρύθμιση, ενώ το κόκκινο χρώμα χρησιμοποιείται για την αρνητική ρύθμιση. Η ενεργοποίηση του INSR οδηγεί σε αναστολή της GP και ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου μέσω ενεργοποίησης της Akt κινάσης. Η Akt έμμεσα οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνοσύνθεσης, της λιπογένεσης και στην αναστολή της γλυκονογένεσης. Η είσοδος της γλυκόζης στο κύτταρο οδηγεί σε αναστολή της GP και ενεργοποίηση της συνθάσης γλυκογόνου GSK3 - glycogen synthase kinase 3, PP1 - protein phosphatase 1, GPAT - glycerol-3-phosphate acyltransferase, G6PC - glucose-6-phosphatase, PCK1 - phosphoenol - pyruvate carboxykinase; SREBP1c - sterol regulatory element binding protein 1c, FAS - fatty acid synthase, TSC - Tuberosus Sclerosis Complex, PRAS40 - Proline-Rich Akt Substrate of 40kDa, PTG - Protein Targeting to Glycogen (13).

### 1.1.3. Θεραπείες για το Σακχαρώδη Διαβήτη

Για τον T1DM δεν έχει βρεθεί αποτελεσματική λύση για την θεραπεία και την παρεμπόδιση εμφάνισης της νόσου (2). Η πιο υποσχόμενη λύση είναι η προσπάθεια αποφυγής της εμφάνισης και της εξέλιξης του T1DM, με έλεγχο των περιβαλλοντικών παραγόντων όπως είναι η διατροφή, η άσκηση και ο έλεγχος του σωματικού βάρους (2). Έπειτα από την εμφάνιση του, χρησιμοποιείται η αγωγή ινσουλίνης σε διάφορες μορφές



(rapid-acting, short-acting, intermediate-acting, long-acting), ώστε να αποφευχθούν οι συνέπειες του T1DM (2).

Ο T2DM καθώς εξαρτάται σε μεγαλύτερο βαθμό από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες από ότι από γενετικούς, καθιστά πιο εύκολο τον έλεγχο της εμφάνισης της νόσου, ο οποίος επιτυγχάνεται με τη ρύθμιση της διατροφής και τη σωματική άσκηση (2). Οι πιο συνήθεις φαρμακευτικές αγωγές κατάποσης φαρμάκων είναι η μετφορμίνη (metformin) και η σουλφονουλουρία (sulfonylurea) (2). Η μετφορμίνη δρα μέσω της μείωσης παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ (15) και χρησιμοποιείται για την αύξηση της ευαισθησίας των κυττάρων στην ινσουλίνη (2). Η σουλφονουλουρία δρα ρυθμίζοντας τα κανάλια ιόντων αλλάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη συγκέντρωση ιόντων στα κύτταρα του παγκρέατος, με αποτέλεσμα την αύξηση απελευθέρωσης ινσουλίνης από το πάγκρεας (16). Κάποια από τα φάρμακα σουλφονουλουρίας έχουν και προστατευτική δράση στα κύτταρα του παγκρέατος, προστατεύοντάς τα από οξειδωτικό στρες και απόπτωση (16).

Αν και τα συνθετικά φάρμακα αποτελούν την ευρέως διαδεδομένη κλινική λύση, δεν μπορεί να αμφισβητηθεί η ύπαρξη παρενεργειών όπως υπογλυκαιμία και καρδιακή ανεπάρκεια (17). Υπάρχουν ενδείξεις ότι αρκετά φυσικά προϊόντα παρουσιάζουν αντιδιαβητική δράση χωρίς όμως να προκαλούν τις παρενέργειες αυτές και χωρίς να έχουν την ίδια τοξικότητα με τα συνθετικά φάρμακα (17).

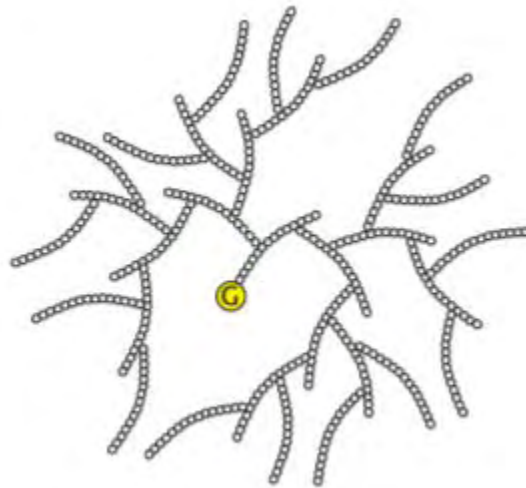
## **1.2. Γλυκογόνο**

Ο οργανισμός μπορεί να αποθηκεύει την περίσσεια γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων του (18). Η γλυκόζη δεν αποθηκεύεται ως μονομερές, αλλά ως ένα πολυμερές, το γλυκογόνο, αυτό συμβαίνει για λόγους ωσμωμοριακότητας (18). Με τη μορφή γλυκογόνου μειώνεται η ωσμωμοριακότητα του κυτοσολίου κατά εκατομμύρια φορές για την ίδια ποσότητα γλυκόζης (18). Αποτέλεσμα αυτού είναι η επιβίωση του κυττάρου, καθώς διαφορετικά θα υπήρχε εισροή νερού ως προσπάθεια εξίσωσης της συγκέντρωσης των μορίων εκατέρωθεν της μεμβράνης. Η υπερβολική εισροή νερού θα οδηγούσε στη λύση των μεμβρανών και στην καταστροφή των κυττάρων (18). Διαφορετικοί ιστοί

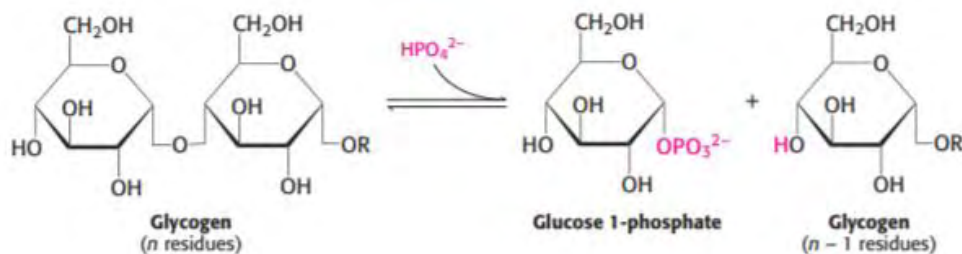
αποθηκεύουν διαφορετικές ποσότητες γλυκογόνου. Οι κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου του οργανισμού είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες (19).

Το γλυκογόνο αποτελείται από περίπου 12 στιβάδες μορίων γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς (19). Η σύνθεση του γλυκογόνου ξεκινά με μία πρωτεΐνη υπόστρωμα, τη γλυκογενίνη (glycogenin), η οποία αυτογλυκοσυλιώνεται αφομοιώνοντας μόρια γλυκόζης που προέρχονται από UDP-γλυκόζη, σχηματίζοντας έναν ολιγοσακχαρίτη μήκους 10 έως 20 κατάλοιπων. Στη συνέχεια τα κατάλοιπα γλυκόζης, με τη βοήθεια της συνθάσης του γλυκογόνου, μεταφέρονται από τη UDP-γλυκόζη στο μη-αναγωγικό άκρο του ολιγοσακχαρίτη (18). Κάθε περίπου 10 κατάλοιπα δημιουργείται διακλάδωση από το ένζυμο διακλάδωσης, με το σχηματισμό  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικού δεσμού (Εικόνα 5) (19).

Το γλυκογόνο αποικοδομείται σε καταστάσεις έλλειψης γλυκόζης (19). Η αποικοδόμηση αυτή λαμβάνει χώρα σε 3 στάδια (19). Στο πρώτο στάδιο απελευθερώνεται γλυκόζη με τη μορφή 1-φωσφορικής γλυκόζης (Glucose 1-Phosphate -G1P) από το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Εικόνα 6) (19). Στο δεύτερο στάδιο γίνεται αναδόμηση του υποστρώματος από το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου για περαιτέρω αποικοδόμηση (19). Στο τρίτο στάδιο, για τη διαθεσιμότητα της γλυκόζης στο κύτταρο, η φωσφογλυκομουτάση μετατρέπει την 1-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη (Glucose 6-Phosphate – G6P) (19).



**Εικόνα 5:** Η δομή του γλυκογόνου με την παρουσία  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικών δεσμών,  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών και της γλυκογενίνης (G) (19).



**Εικόνα 6:** Η αντίδραση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Κατά τη διάσπαση του α-1,4 γλυκοζιτικού δεσμού ενός μορίου γλυκόζης από το γλυκογόνο απελευθερώνεται ένα μόριο G1P (19).

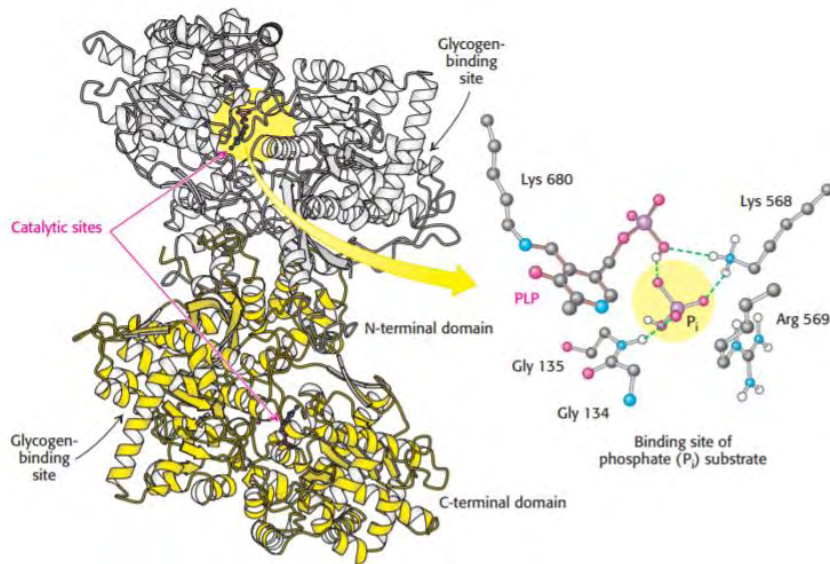
### 1.2.1. Έλεγχος γλυκόζης στο αίμα

Οι επιπτώσεις του T2DM είναι αποτέλεσμα των αυξημένων επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Η αποφυγή των επιπτώσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης και την καταπολέμηση της υπεργλυκαιμίας (20). Η γλυκογονόλυση και η γλυκονεογένεση είναι δύο μεταβολικοί οδοί των οποίων η ρύθμιση μπορεί να οδηγήσει στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης του αίματος. Τα συνθετικά φάρμακα που στοχεύουν στην ρύθμιση της γλυκόζης ενέχουν τον κίνδυνο της πρόκλησης υπογλυκαιμίας (21). Τα φυσικά προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χωρίς αυτόν τον κίνδυνο (22). Η ρύθμιση των μεταβολικών οδών μπορεί να πραγματοποιηθεί με ρύθμιση των ενζύμων σε διαφορετικά σημεία των μεταβολικών μονοπατιών. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ένζυμο της οδού γλυκογονόλυσης, η οποία αναστέλλεται από ποικίλους δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών – φυσικά προϊόντα (21).

Η αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί μέθοδο μείωσης γλυκόζης στο αίμα, το οποίο μπορεί να είναι στόχος σε καταστάσεις διαβήτη τύπου 2 (23). Στις σημαντικές φυσικές ενώσεις με αναστολή της GP ανήκουν διάφορα τριτερπένια και флаβονοειδή (δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών) (22). Το μασλιτικό οξύ (maslinic acid - MA) είναι ένα παράδειγμα πεντακυκλικού τριτερπενοειδούς-αναστολέα της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

### 1.2.2. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Glycogen Phosphorylase - GP) είναι ένα διμερές ένζυμο με μοριακό βάρος 97,5 kDa και 842 κατάλοιπα, που αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες (24). Το ένζυμο αυτό καταλύει την απελευθέρωση ενός μορίου γλυκόζης υπό μορφή 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο. Το γλυκογόνο προσδένεται στην αμινοτελική περιοχή και απέχει 30 Å από το καταλυτικό κέντρο (19). Ωστόσο, επικοινωνεί με αυτό μέσω μιας σχισμής με δυνατότητα εισόδου 4-5 μονάδων γλυκόζης (19). Η GP για να είναι βιολογικά ενεργή απαιτεί την παρουσία μιας φωσφορικής πυριδοξάλης (Pyridoxal Phosphate - PLP) (19). Η βάση Schiff δρα ως οξοβασικός καταλύτης σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό και συνεισφέρει στο σχηματισμό 1-φωσφορικής γλυκόζης κατά τη διάσπαση του γλυκογόνου (Εικόνα 7) (19).



Εικόνα 7: Η δομή της GP και το σημείο αντίδρασης της PLP με το P<sub>i</sub> (19).

Η GP ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση και υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες καταστάσεις GP<sub>a</sub> και GP<sub>b</sub> (25). Η GP<sub>a</sub> είναι η φωσφορυλιωμένη στη Ser 14 μορφή, είναι ενεργή και έχει υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα, βρίσκεται δηλαδή κυρίως στην R κατάσταση (24). Η GP<sub>b</sub> είναι η αποφωσφορυλιωμένη μορφή και βρίσκεται κυρίως στην T κατάσταση που είναι η κυρίως ανενεργή μορφή (24). Η ρύθμιση της φωσφορυλίωσης γίνεται εν μέρει από την αλληλεπίδραση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (Protein

Phosphatase - PP1) με τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (19). Η PP1 προσδένεται στην Tyr264 στην κατάσταση R της GPα και παραμένει ανενεργή έως ότου δεσμευτεί γλυκόζη στο ένζυμο και μετατοπίσει την ισορροπία από R σε T (19). Στην κατάσταση T, η PP1 αποδεσμεύεται από τη GP, ενεργοποιείται και καθίσταται ελεύθερη να αποφωσφορυλιώσει την GP (19). Οι Oikonomakos et al (26) αναφέρουν πως κατά τη μεταβολή της κατάστασης από R σε T μεταβάλλεται η τεταρτοταγής δομή που οδηγεί σε κλείσιμο του καταλυτικού κέντρου. Το κλείσιμο αυτό πραγματοποιείται εν μέρει μέσω της θηλιάς των καταλοίπων 282-286, θηλιά 280s (280s loop) (26).

#### *1.2.2.1. Ισομορφές φωσφορυλάσης του γλυκογόνου*

Το γλυκογόνο συναντάται σε πολλούς ιστούς όπως οι νεφροί, η καρδιά, ο εγκέφαλος κ.α. (30). Υπάρχουν 3 ισόενζυμα GP που κωδικοποιούνται από τα γονίδια PYGL, PYGM, PYGB και συναντώνται κυρίως σε ήπαρ, μύες και εγκέφαλο, αντίστοιχα (27). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν μονομερή που θα σχηματίζουν το ένζυμο. Τα μονομερή αυτά έχουν μήκη αμινοξέων 846 (PYGL), 841 (PYGM) , 862 (PYGB) (27). Η ηπατική ισομορφή έχει περίπου 80% ομοιότητα με την μυϊκή και την εγκεφαλική ισομορφή (27). Αν και υπάρχει υψηλή ομολογία αμινοξέων ανάμεσα στην ηπατική και τη μυϊκή ισομορφή, η δραστηρότητά τους διαφέρει (27). Η μυϊκή GP μπορεί να ενεργοποιηθεί και να λειτουργήσει τόσο στη φωσφορυλιωμένη όσο και στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή (GPα και GPβ) (27). Η κύρια ισομορφή μυϊκής φωσφορυλάσης είναι η GPβ και μπορεί να ρυθμιστεί από τις αναλογίες AMP/ATP και την παρουσία G6P, φαινόμενο που δεν ισχύει για την κύρια ηπατική ισομορφή, GPα (27). Η ηπατική GPβ δεν έχει τη δυνατότητα ενεργοποίησης και κατάλυσης της γλυκογονόλυσης, αλλά η διαμόρφωση R και T σε αυτή την περίπτωση ρυθμίζει και την αλληλομετατροπή GPα και GPβ(27).

Η GPα μορφή είναι η ενεργή μορφή στο ήπαρ (27). Οι ισομορφές GP σε τρωκτικά (κουνέλι) έχουν 97% ομολογία με τις αντίστοιχες ανθρώπινες ισομορφές (27). Η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου στο κουνέλι (Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase b - rmGPb) έχει λειτουργικά ουδέτερες διαφορές και υπάρχουν συντηρημένες περιοχές και ομολογία περίπου 80% συγκριτικά με την ανθρώπινη φωσφορυλάση του γλυκογόνου στο ήπαρ (Human – Liver Glycogen Phosphorylase b - HLGpB) (27). Το ένζυμο rmGPb είναι

εύκολα διαθέσιμο και παράγει ποιοτικούς κρυστάλλους. Επομένως η gmGPb μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη πιθανών αναστολέων της HLGpB (26).

#### 1.2.2.2. Αναγνωρισμένα κέντρα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Εκτός από το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, το οποίο περιεγράφηκε παραπάνω, έχουν αναγνωριστεί και άλλες θέσεις όπως είναι η θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου (glycogen storage site), το κέντρο αναστολέα (inhibitor site), η αλλοστερική θέση (allosteric site), το νέο αλλοστερικό κέντρο (new allosteric site), το κέντρο πρόσδεσης βενζιμιδαζολίου και το κέντρο πρόσδεσης κουερσετίνης (quercetin binding site) (Εικόνα 8) (24).

Το κέντρο πρόσδεσης γλυκογόνου εντοπίζεται στην επιφάνεια του μορίου, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο (κατάλοιπα 397-437) (24). Η πρόσδεση του γλυκογόνου σε αυτή τη θέση ευνοεί την R διαμόρφωση (27).

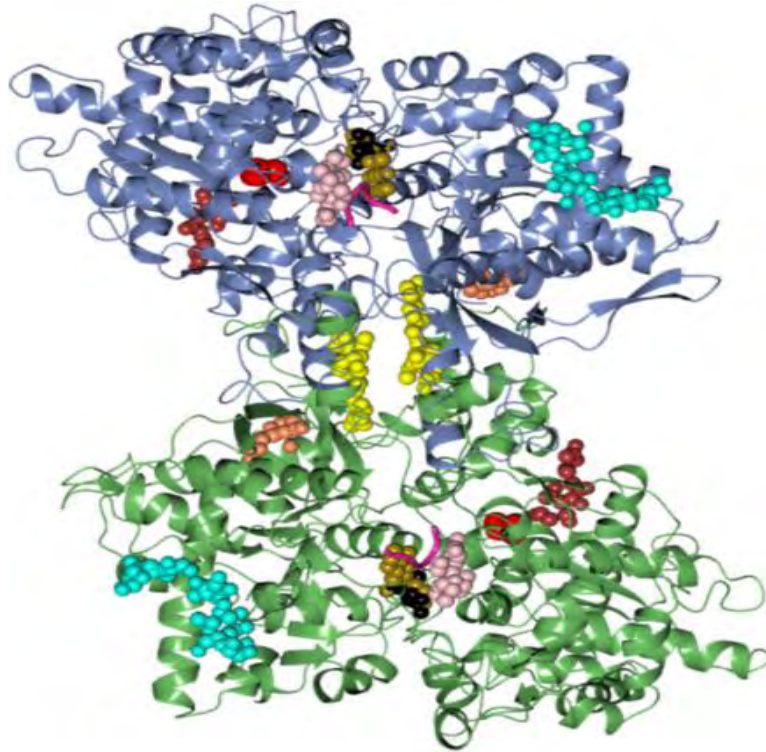
Το κέντρο αναστολής βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου και σχηματίζεται από τη δημιουργία αλληλεπιδράσεων των αρωματικών δακτυλίων των αμινοξέων φαινυλαλανίνη 285 (Phenylalanine 285 – Phe285/F285) και Tyr613 (24).

Το αλλοστερικό κέντρο αποτελείται από 2 α-έλικες και 4 β-φύλλα. Το σύνολο των δομών αυτών δημιουργούν μία εσοχή (26). Στην εσοχή αυτή προσδένονται φωσφορυλιωμένα μόρια (AMP, G6P κ.α.) τα οποία μπορούν να δράσουν είτε ανταγωνιστικά με το AMP, εμποδίζοντας την πρόσδεσή του, είτε σταθεροποιώντας την T διαμόρφωση του ενζύμου (24).

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην κεντρική εσοχή που δημιουργείται μεταξύ των δύο υπομονάδων και απέχει 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 37 Å από το κέντρο αναστολής και 33 Å από το καταλυτικό κέντρο (20,24). Μόρια που προσδένονται σε αυτό το κέντρο μπορούν να αναστέλλουν την ενεργότητα του ενζύμου, σταθεροποιώντας την διαμόρφωση T και μπορούν να ενισχύσουν το ανασταλτικό αποτέλεσμα διαφορετικών αναστολέων (20,24).

Το κέντρο πρόσδεσης βενζιμιδαζολίου βρίσκεται σε απόσταση 32 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το νέο αλλοστερικό κέντρο. Η πρόσδεση του βενζιμιδαζολίου προωθεί την αλλαγή διαμόρφωσης του ενζύμου με μετατόπιση της θηλιάς 280s και σταθεροποίηση της T κατάστασης (28).

Η κουερσετίνη έχει μεγάλη ανασταλτική επίδραση στη GP (21,29). Η κουερσετίνη αλληλεπιδρά με τα κατάλοιπα γλυκίνης177 (Glycine177 - Gly177/G177), τρυπτοφάνης173 (Tryptophan173 - Trp173/W173), Thr85, και Thr219 της GP (29), σε μία θέση διαφορετική από τις υπόλοιπες που ονομάζεται θέση πρόσδεσης κουερσετίνης (24). Η θέση αυτή εντοπίζεται 15 Å μακριά από το ενεργό κέντρο, 43 Å από την αλλοστερική θέση και 32 Å από το κέντρο αναστολής (21).



**Εικόνα 8:** Τα αναγνωρισμένα κέντρα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το νέο αλλοστερικό κέντρο, με σομόν το αλλοστερικό κέντρο, με τριχουάζ το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου, με μαύρο το καταλυτικό κέντρο, με μουσταρδί το κέντρο πρόσδεσης βενζιμιδαζολίου, με ροζ το κέντρο αναστολέα, με φούξια η θηλιά 280s, με κόκκινο η Ser14 και με κεραμίδι το κέντρο πρόσδεσης κουερσετίνης.

### **1.3. Χρήση Βοτάνων στη Θεραπεία Ασθενειών**

Η χρήση της βοτανικής ιατρικής είναι μία πρακτική που είναι αποδεκτή και χρησιμοποιείται από τα αρχαία χρόνια έως σήμερα σε όλο τον κόσμο (31). Κείμενα που περιγράφουν θεραπείες, βασισμένες σε φυσικά προϊόντα, έχουν βρεθεί στην αρχαία Αίγυπτο, σε κείμενα της Μεσοποταμίας που χρονολογούνται το 3100 π.Χ. (32).



Στις μέρες μας παρά την αύξηση και τη χρήση συνθετικών φαρμάκων, τα φυτικά σκευάσματα έχουν παραμείνει ως προτιμώμενες θεραπείες σε διάφορες κοινωνίες στον κόσμο (32). Αν και τα φυσικά προϊόντα είναι αυτά που δίνουν το έναυσμα και την αρχική πληροφορία για την τελική παραγωγή συνθετικών φαρμάκων, η γρήγορη διαθεσιμότητα, οι μικρές και συνήθως αναστρέψιμες παρενέργειες και το μικρό κόστος παραγωγής είναι παράγοντες που καθιστούν τα βότανα ως πρωταγωνιστές σε θεραπείες, ιδιαίτερα σε αγροτικές περιοχές (33).

Τα κύρια φάρμακα κατά του διαβήτη μπορεί να είναι συνθετικά υπογλυκαιμικά και ινσουλίνη, ωστόσο συχνά εμφανίζουν ανεπιθύμητες παρενέργειες με αποτέλεσμα οι έρευνες να στρέφονται στην εύρεση εναλλακτικών φυτικών φαρμάκων (33). Στην παρούσα έρευνα μελετάται η ιδιότητα εκχυλισμάτων του φυτού *Lotus japonicus* να αναστέλλουν τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

#### **1.4. Δευτερογενείς μεταβολίτες**

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες προέρχονται από αντιδράσεις του μεταβολισμού (34). Ο όρος δευτερογενής υποδηλώνει πως η απομάκρυνση των ουσιών αυτών δεν θα προκαλέσει τον άμεσο θάνατο του οργανισμού, αν και θα περιορίσει την ικανότητα επιβίωσης του (34). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι φυτοχημικές ενώσεις οι οποίες προσδίδουν σημαντικές προσαρμοστικές ιδιότητες (π.χ. άμυνα) στον οργανισμό που τις παράγει. Υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία δευτερογενών μεταβολιτών, ωστόσο όλοι προέρχονται από έναν περιορισμένο αριθμό βασικών δομών. Πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες όπως τα τερπενοειδή χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της υγείας των ανθρώπων καθώς μπορούν να δράσουν στη ρύθμιση ενζύμων και ορμονών (35–37).

Τα κυαμώδη φυτά είναι πλούσιες πηγές δευτερογενών μεταβολιτών, ιδιαίτερα ταννινών, κουμαρινών, φλαβονοειδών (38) και τερπενοειδών (36). Οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες είναι ένα είδος μεταβολίτη που μελετάται εκτενώς στην οικογένεια των κυαμωδών για τις ιδιότητές του ως προς την υγεία αλλά και ως προς την ποιότητα της τροφής (36). Τα κυαμώδη χρησιμοποιούνται είτε ολόκληρα είτε τμηματικά (μόνο κάποιες ενώσεις) σε μελέτες για την καταπολέμηση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων (38). Το *Lotus corniculatus* έχει χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση μυϊκών και κοιλιακών



πόνων, ως θεραπεία σε δάγκωμα από φίδι και σεξουαλικά μεταδιδόμενες νόσους (38). Πολλά φλαβονοειδή και τριτερπένια έχουν την ικανότητα αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (22).

Στο *L. japonicus* έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί δευτερογενείς μεταβολίτες σε πειράματα ανάλυσης μεταβολικού προφίλ (39). Μερικοί δευτερογενείς μεταβολίτες του φυτού αυτού είναι η κουερσετίνη, το p-κουμαρικό οξύ, το p-φερουλικό οξύ, το κινναμικό οξύ καθώς και ταννίνες και φλαβόνες (39). Στο φυτό αυτό έχουν χαρακτηριστεί τριτερπένια όπως ουρσολικό, βετουλινικό και ολεανολικό οξύ, σογιασαπογενόλες (B,A και E) (40) και λουπεόλη(37). Σε εκχυλίσματα ρίζας και φύλλων του *L. japonicus* έχουν ταυτοποιηθεί με φασματογραφία μάζας και με αέρια χρωματογραφία δευτερογενείς μεταβολίτες όπως 4-O-D-γαλακτοπυρανοσίδιο, τετρακοσαμεθυλ-κυκλοδωδεκασιλοξάνιο κ.α. (41).

### 1.5. *Lotus japonicus*

Το *Lotus japonicus* (*L. japonicus*) είναι ένα αγγειόσπερμο φυτό – εργαστηριακό μοντέλο που ανήκει στην οικογένεια των κυαμοειδών (Leguminosae ή Fabaceae) (42). Προέρχεται από την Ανατολική Ασία και κατανέμεται στους Ιαπωνικούς νήσους, στην Κορέα, στην Κίνα, στην Ινδία και στο Αφγανιστάν (43). Ως πειραματικό μοντέλο έχει διάφορα πλεονεκτήματα, τα κύρια εκ των οποίων είναι ο μικρός χρόνος γενεάς, το μικρό μέγεθος γονιδιώματος (44), περίπου 472Mb (45) που κατανέμονται σε 6 χρωμοσώματα. Είναι διπλοειδής οργανισμός με ικανότητα αυτογονιμοποίησης, χωρίς όμως να στερεί την δυνατότητα τεχνητής γονιμοποίησης-διασταύρωσης (44). Προσφέρει τη δυνατότητα σύγκρισης μεταξύ των φυτών οργανισμών-μοντέλων, μέσω της ανάλυσης των γονιδιωμάτων και της συνταίνιας που παρουσιάζεται ακόμα και με πιο απομακρυσμένα γονιδιώματα όπως της *Arabidopsis thaliana* (46).

Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά, σε συνδυασμό με το πλούσιο μεταβολικό προφίλ του φυτού και την παρατηρηθείσα ως τώρα βιοδραστικότητα δευτερογενών μεταβολιτών που επηρεάζουν τη ρύθμιση ανθρώπινων ενζύμων, καθιστούν το *L. japonicus* έναν ιδιαίτερο οργανισμό που αξίζει να μελετηθεί σε όλες τις πιθανές του ιδιότητες.

Αν και το *L. japonicus* ανήκει στην οικογένεια κυαμοειδών, αποτελεί εργαστηριακό μοντέλο (40) και είναι εύκολα χειραγωγήσιμο, δεν έχει μελετηθεί ως προς την δυνατότητα των ενώσεών του να αναστέλλουν τη GP, παρά των ήδη ταυτοποιημένων δευτερογενών μεταβολιτών που περιγράφονται παραπάνω και αυξάνουν την πιθανότητα εύρεσης ανασταλτικής δράσης του φυτού στην GP.

## **1.6. Σκοπός**

Η εργασία αυτή θεωρείται πρωτότυπη γιατί ως στόχο έχει τη μελέτη του *Lotus japonicus* ως παράγοντα ρύθμισης του μεταβολικού ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Ο προσδιορισμός της αναστολής αυτής καθώς και των ενώσεων που προσδίδουν στο φυτό τη βιοδραστικότητα μπορεί να οδηγήσει στην ενσωμάτωση του φυτού στη βοτανική ιατρική και κατ' επέκταση τη χρήση του ως πιθανό παράγοντα ελέγχου των επιπέδων γλυκόζης του αίματος. Η συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιείται με τη χρήση φυτικών εκχυλισμάτων όπως περιγράφονται στην ενότητα 2 και βασίζεται στην ικανότητα των δευτερογενών μεταβολιτών να αναστέλλουν τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

Η διεξαγωγή του πειράματος βασίστηκε σε *in vitro* κινητική μελέτη και στην κρυσταλλογραφία συγγένειας. Σκοπός είναι ο προσδιορισμός βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων του *L. japonicus* και η εύρεση των ενώσεων με την ανασταλτική δράση, προκειμένου να διαλευκανθεί εάν δευτερογενείς μεταβολίτες (γνωστοί ή άγνωστοι ως τώρα) του φυτού έχουν τη δυνατότητα ανάπτυξης ενός νέου βοτανικού – φαρμακευτικού προϊόντος.

## 2 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Αντιδραστήρια, υλικά και όργανα

#### 2.1.1 Αντιδραστήρια

$\alpha$ -D-Glucose 1-phosphate dipotassium salt hydrate (G1P)	SIGMA
Adenosine 5' monophosphate monohydrate (AMP)	SIGMA
Ammonium Molybdate	SIGMA
$\beta$ -Mercaptoethanol	SIGMA
BES	SIGMA
Dithiothreitol (DTT)	SERVA
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Ethanol Absolute	SIGMA
GLUCOSE Liquid Fast (kit)	Zafiroopoulos DIAGNOSTICA
Glycerol	Panreac
Glycogen from oyster type II	SIGMA
Hydrochloric Acid (HCl)	Merck
Imidazole Bio Ultra	SIGMA
L-Ascorbic Acid	SIGMA
Potassium Chloride (KCl)	Merck
Sodium dodecyl Sulfate (SDS)	SERVA
Zinc Acetate	SIGMA

**Πίνακας 1:** Αντιδραστήρια και εταιρίες παραγωγής

#### 2.1.2 Υλικά

Falcons (15ml, 50ml)	CORNING
Micro tubes (1,5ml)	AHN Biotechnologie GMBH
Quartz Cell	Hellmo Analytics

Tips	Gilson
24 well crystallization plates	Hampton Research
96-well crystallization plates	Douglas instruments

Πίνακας 2: Υλικά και εταιρίες παραγωγής

### 2.1.3 Όργανα

Analytical Balance	Kern & Sohn GmbH
Automated Pipettes	Gilson
pH Meter	Metrohm
Robot OryxNano	Douglas instruments Ltd
Stereoscope	Olympus TL2
SpeedVach	Thermoscientific
UV 1600 PCSpectrophotometer	VWR
Vortex	Kisker
Water Bath	Wisebath

Πίνακας 3: Όργανα και εταιρίες παραγωγής.

## 2.2 Παρασκευαστική μέθοδος

Η απομόνωση του ενζύμου rmGPb πραγματοποιήθηκε από κιμά κουνελιού όπως περιγράφεται από τους Drakou et al (51).

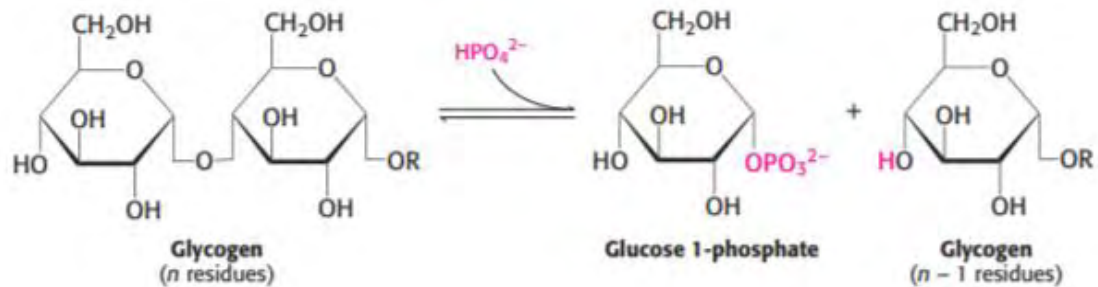
Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 22 °C, για 3 εβδομάδες, με φωτοπερίοδο 16 ώρες μέρα, 8 ώρες νύχτα, σε μέσο ανάπτυξης half strength MS

## 2.3 Αναλυτικές Μέθοδοι

### 2.3.1 Κινητική μελέτη του Ενζύμου rmGPb

Η αντίδραση που καταλύει η GPb είναι αμφίδρομη. Ο προσδιορισμός της  $K_M$  έγινε με πείραμα κινητικής μελέτης προς την σύνθεση γλυκογόνου από τη GPb παρουσία

περίσσειας G1P (21). Με την περίσσεια G1P μετατοπίζεται η ισορροπία της αντίδρασης που καταλύει η GPb ( $G1P \leftrightarrow$  Γλυκογόνο) προς τη σύνθεση του γλυκογόνου (21), (Εικόνα 9) (19). Με την ενσωμάτωση μιας G1P στο γλυκογόνο απελευθερώνεται ένα ορθοφωσφορικό. Τα ορθοφωσφορικά στο διάλυμα μπορούν να προσδιοριστούν φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 850nm (21).



**Εικόνα 9:** Η αντίδραση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Κατά τη διάσπαση του  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικού δεσμού ενός μορίου γλυκόζης από το γλυκογόνο απελευθερώνεται ένα μόριο G1P (19).

### 2.3.2 Προσδιορισμός ορθοφωσφορικών

Η μέθοδος στηρίζεται στην αντίδραση των ελεύθερων ορθοφωσφορικών με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου σε pH=5. Ο φώσφορος προσδένεται στο μολυβδαινικό αμμώνιο σχηματίζοντας σύμπλοκο το οποίο παρουσία του ασκορβικού οξέος (αναγωγικός παράγοντας) ανάγεται. Η αναγωγή αυτή οδηγεί στην παραγωγή χρωμοφόρου συμπλόκου που έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850nm. Επομένως, αυξημένα ορθοφωσφορικά στο διάλυμα, τα οποία παράγονται κατά την αντίδραση της GPb, οδηγούν σε αυξημένη απορρόφηση του διαλύματος σε μήκος κύματος 850nm (37).

Για την αντίδραση αυτή ετοιμάστηκαν διαλύματα μολυβδαινικού αμμωνίου-οξικού ψευδαργύρου και ασκορβικού οξέος ως εξής:

Διάλυμα Μολυβδαινικού αμμωνίου-οξικού ψευδαργύρου: 15mM Μολυβδαινικό αμμώνιο, 100mM οξικός ψευδάργυρος, ρύθμιση του pH στους 5 βαθμούς με πυκνό HCl και τοποθέτηση του διαλύματος σε αδιαφανές μπουκάλι (52). Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο (52).

Διάλυμα ασκορβικού οξέος: 10% w/v ασκορβικό οξύ και ρύθμιση του pH στους 5 βαθμούς με πυκνό NaOH. Το διάλυμα φυλάσσεται σε αδιαφανές μπουκάλι στο ψυγείο. Παραγωγή φρέσκου διαλύματος κάθε φορά (52).

Τα δύο διαλύματα αυτά αναμειγνύονται και ακολουθεί επώαση 15min στο σκοτάδι. Η ανάμειξη γίνεται σε αναλογία 4 Μολυβδαινικό αμμώνιο-οξικός ψευδάργυρος: 1 Ασκορβικό οξύ (52). Έπειτα από την επώαση στο σκοτάδι πραγματοποιείται προσθήκη 0,7mL από το διάλυμα στα δείγματα. Έτσι, τα ορθοφωσφορικά που περιέχονται στα δείγματα μπορούν να προσδεθούν και να σχηματίσουν το χρωμοφόρο σύμπλοκο. Για τον προσδιορισμό είναι απαραίτητη η χρήση μάρτυρα (control), που δεν περιέχει δείγμα, καθώς ο προσδιορισμός των φωσφορικών γίνεται σε σύγκριση με τον μάρτυρα (52). Οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν είναι: μάρτυρας νερού, μάρτυρας ενζυμικού διαλύματος, μάρτυρας G1P, μάρτυρας φωσφορικών και μάρτυρας αναστολέα.

### 2.3.3 Διαλύματα

#### 2.3.3.1 Ρυθμιστικά διαλύματα

Το ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την αραίωση του ενζύμου ενώ τα Assay Buffer χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαλυμάτων G1P.

	Ιμιδαζόλιο	KCl	DTT	EDTA	β-μερκαπτοαιθανόλη	β-GP	pH
Assay Buffer 1 (AB1)	200mM	400mM	4mM	4mM	-	-	6.8
Assay Buffer 2 (AB2)	135mM	270mM	2.7mM	2.7mM	-	-	6.8
Ρυθμιστικό Διάλυμα 50:50:1 (PΔ)	-	-	-	1mM	50mM	50mM	6.8

**Πίνακας 4:** Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις αραιώσεις του ενζύμου και της G1P.

### 2.3.3.2 Ενζυμικό διάλυμα

Η συγκέντρωση του ενζύμου καθορίστηκε σύμφωνα με τον τύπο  $A=εlc$ , βάσει της απορρόφησης του διαλύματος σε μήκος κύματος 280nm με μήκος κυψελίδας  $l=1\text{ cm}$  και σταθερά  $\epsilon$  του ενζύμου  $\epsilon=1.32\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (53). Το ενζυμικό διάλυμα περιείχε το ένζυμο σε συγκέντρωση 15μg/ml το οποίο ήταν διαλυμένο σε 1% w/v γλυκογόνο, 5% v/v ΡΔ 50:50:1 και απιονισμένο νερό (dH<sub>2</sub>O) (53).

### 2.3.3.3 Διαλύματα εκχυλίσματος

Τα διαλύματα εκχυλίσματος περιείχαν εκχύλισμα του φυτού *L. japonicus* το οποίο ήταν διαλυμένο σε 100% διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide – DMSO).

### 2.3.3.4 Διαλύματα αντίδρασης

	AMP	G1P	Ενζυμικό διάλυμα	DMSO	Διάλυμα Εκχυλίσματος
Διάλυμα αντίδρασης με εκχύλισμα	1mM	2mM	20% v/v	2% v/v	2% v/v
Διάλυμα αντίδρασης ελέγχου	1mM	2mM	20% v/v	2% v/v	-
Διάλυμα αντίδρασης υπολογισμού $K_M$	1mM	2mM	20% v/v	-	-

**Πίνακας 5:** Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση του ενζύμου.

### 2.3.4 Προσδιορισμός Κινητικών παραμέτρων

Για τον προσδιορισμό της  $K_M$  χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές συγκεντρώσεις G1P στα διαλύματα αντίδρασης. Για την επίτευξη των τελικών συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκαν αρχικά διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων G1P από τα οποία απομονώθηκε ορισμένη ποσότητα - 40μL για κάθε αντίδραση. Έτσι παρήχθησαν τα διαλύματα G1P ώστε να έχουμε τις συγκεντρώσεις όπως αναγράφονται στον Πίνακα 6. Οι αραιώσεις των G1P έγιναν με τη χρήση των ρυθμιστικών AB1 και AB2 (Πίνακας 1).

Αραιώσεις G1P (% v/v)	Τελικές συγκεντρώσεις G1P	Συγκεντρώσεις G1P στην αντίδραση
45% 200mM G1P + 55% AB1	90mM	20mM
50% 90mM G1P + 50% AB2	45mM	10mM
80% 45mM G1P + 20% AB2	36mM	8mM
75% 36mM G1P + 25% AB2	27mM	6mM
66% 27mM G1P + 34% AB2	18mM	4mM
50% 18mM G1P + 50% AB2	9mM	2mM

**Πίνακας 6:** Συγκεντρώσεις της G1P στα διαλύματα κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Πειραματική διαδικασία (52): Ετοιμάζεται το ενζυμικό διάλυμα και επωάζεται στους 30°C για 15min. Στα τελευταία 4 min τοποθετείται το διάλυμα υποστρώματος στο υδατόλουτρο μαζί με το ενζυμικό διάλυμα, ώστε να εξισορροπηθεί η θερμοκρασία. Μετά το πέρας των 15 min προστίθενται 36μL από το ενζυμικό στο διάλυμα υποστρώματος των 144μL, ώστε να έχει τελικό όγκο αντίδρασης 180μL. Η στιγμή εκείνη είναι ο χρόνος  $t=0$ . Ανά ένα λεπτό αντίδρασης μεταφέρεται ποσότητα 40μL διαλύματος αντίδρασης σε σωληνάκι με 10μL 1% SDS, ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 4 χρόνους – 4 min από το χρόνο  $t=0$ .

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις G1P που υπάρχουν στα διαλύματα αντιδράσεις.

### 2.3.5 Διαχείριση εκχυλισμάτων

Τα αρχικά εκχυλίσματα του φυτού *Lotus japonicus* ήταν 6, τρία ρίζας και τρία φύλλων, σε διαλύματα εξανίου (hexane), οξικού αιθυλεστέρα (Ethyl Acetate - EtOAc) και μεθανόλης (Methanol - MeOH), ώστε κάθε εκχύλισμα να έχει συγκεντρώσει ενώσεις με διαφορετική πολικότητα. Τα εκχυλίσματα αναγράφονται με σειρά αυξανόμενης πολικότητας (hexane, EtOAc, MeOH). Τα διαλύματα αυτά αποξηράθηκαν σε κενό, ώστε να πραγματοποιηθεί μέτρηση της ξηρής μάζας με ακρίβεια.



Ακολούθησε διάλυση των ξηρών μαζών σε 100% DMSO έως τελική συγκέντρωση 10mg/ml. Ο προσδιορισμός των δειγμάτων που παρουσιάζουν αναστολή στην gmGPb επιτεύχθηκε με τη χρήση δειγμάτων και τον έλεγχο της αναστολής τους σε τελική συγκέντρωση δείγματος 20μg/ml (στο διάλυμα αντίδρασης). Στο δείγμα με την μέγιστη ανασταλτική δράση (εκχύλισμα EtOAc από ρίζα – R<sub>EtOAc</sub>) προσδιορίστηκε η IC<sub>50</sub>.

Ακολούθησε δοκιμή αναστολής στα 200μg/ml στα δείγματα που έδειξαν μερική αναστολή του ενζύμου κατά την προηγούμενη δοκιμασία. Παρατηρήθηκε η ανασταλτική δράση του εκχυλίσματος ρίζας με MeOH (R<sub>MeOH</sub>) και προσδιορίστηκε η IC<sub>50</sub> και σε αυτό το εκχύλισμα. Η πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκε για τις δοκιμασίες αναστολής είναι η ίδια που περιγράφεται στην υποενότητα 2.3.4. Η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε δείγμα εκχυλίσματος.

### 2.3.6 Προσδιορισμός IC<sub>50</sub>

Για τον προσδιορισμό της τιμής IC<sub>50</sub> χρησιμοποιήθηκε μία συγκέντρωση G1P από το διάλυμα 9mM, ώστε να είναι η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα αντίδρασης 2mM. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα.

Για το εκχύλισμα των ριζών με EtOAc, οι συγκεντρώσεις στα διαλύματα αντίδρασης που μελετήθηκαν ήταν: 5μg/ml, 10 μg/ml, 20 μg/ml, 35 μg/ml, 50 μg/ml και ένας μάρτυρας με συγκέντρωση αναστολέα 0μg/ml και με 2% DMSO. Οι αραιώσεις έγιναν διαδοχικά από συγκέντρωση αναστολέα 10mg/ml σε 100% DMSO.

Για το εκχύλισμα των ριζών με MeOH, οι συγκεντρώσεις του αναστολέα στο διάλυμα αντίδρασης που μελετήθηκαν είναι: 25μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 150 μg/ml, 200 μg/ml και ένας μάρτυρας με συγκέντρωση αναστολέα 0μg/ml και με 2% DMSO. Οι αραιώσεις έγιναν διαδοχικά από αρχική συγκέντρωση αναστολέα 10mg/ml σε 100% DMSO.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με την διαδικασία για τον προσδιορισμό της K<sub>M</sub>, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.3.4 και επαναλήφθηκε για τις διάφορες συγκεντρώσεις αναστολέα.

#### 2.4 Δοκιμασία γλυκόζης

Στα εκχυλίσματα ριζών πραγματοποιήθηκε δοκιμασία γλυκόζης με τη χρήση kit (GLUCOSE Liquid Fast). Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες όπως περιγράφονται στο εγχειρίδιο χρήσης του kit: σε 1 σωληνάκι προστέθηκαν 5μl δείγματος 2mg/ml + 500μl αντιδραστηρίου. Ο θετικός μάρτυρας αντί για το δείγμα περιείχε πρότυπο διάλυμα γλυκόζης. Ο αρνητικός μάρτυρας περιείχε 5μl dH<sub>2</sub>O + 500μl αντιδραστηρίου. Έπειτα, έγινε ανάδευση με vortex και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 5 min. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε η φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 510nm και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης γλυκόζης του δείγματος έγινε από τον τύπο:  $C = 5.55 \times A_{\text{δείγματος}} / A_{\text{θετικού-μάρτυρα}}$ , όπου A είναι η απορρόφηση του διαλύματος στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.

#### 2.5 Κρυσταλλογραφία συγγένειας

Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν μέσα σε ένα πλήθος μορίων τον ειδικό προσδέτη και να συνδέονται μαζί του (47). Η πρόσδεση του μορίου ακολουθείται από τη διαμόρφωση της δομής του συμπλόκου στο χώρο με έναν συγκεκριμένο και απόλυτο τρόπο που εξαρτάται από την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τον προσδέτη (47). Η ικανότητα αυτή των ενζύμων, σε συνδυασμό με την ικανότητα παρατήρησης της δομής των προσδετών και των ενζύμων με ακρίβεια, μέσα στο χειρόμορφο περιβάλλον των πρωτεϊνών, οδήγησε τους Aguda et al στην ανάπτυξη της κρυσταλλογραφίας συγγένειας (47).

Η ανάπτυξη της κρυσταλλογραφίας συγγένειας βοήθησε να ξεπεραστούν τα εμπόδια απομόνωσης και αναγνώρισης ενώσεων από μη χαρακτηρισμένα δείγματα (47). Με τη μέθοδο αυτή μέσα από ένα μείγμα αγνώστων ενώσεων απομονώνονται και ταυτοποιούνται κρυσταλλογραφικά οι ενώσεις που εμφανίζουν συγγένεια με τα διάφορα κέντρα του ενζύμου (47). Οι παραδοσιακές τεχνικές απομόνωσης είναι χρονοβόρες και έχουν υψηλότερη πιθανότητα παράληψης ενώσεων, οι οποίες βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση στο δείγμα και έχουν υψηλή συγγένεια με το ένζυμο (47).

Οι Aguda et al, με τη χρήση κρυσταλλογραφίας συγγένειας, κατόρθωσαν να απομονώσουν lichostatinal από εκχύλισμα ακτινομυκήτων (47). Η ένωση lichostatinal βρισκόταν σε ελάχιστη ποσότητα στο εκχύλισμα, συγκριτικά με τους υπόλοιπους αναστολείς, ωστόσο λόγω της υψηλής συγγένειας με την Cathepsin K(το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε), επετεύχθη η απομόνωση της με τη κρυσταλλογραφία συγγένειας (47). Η ίδια ένωση δεν απομονώθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο χρωματογραφίας για την ταυτοποίηση των ενώσεων (47). (Για την κρυσταλλογραφία γενικές πληροφορίες στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α)

### 2.5.1 Ανάπτυξη κρυστάλλων

Η ανάπτυξη των κρυστάλλων πραγματοποιείται στις εξής συνθήκες: 20-30 mg/ml καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 10 mM BES (N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid) (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub> (Sodium Azide). Η ανάπτυξη των κρυστάλλων πραγματοποιείται παρουσία πυρήνων σε θερμοκρασία 16°C (53).

### 2.5.2 Σχηματισμός συμπλόκων κρυστάλλων

Η πειραματική διαδικασία ήταν προσαρμογή της διαδικασίας που περιγράφεται από τους Oikonomakos et al (53). Ο σχηματισμός του συμπλόκου κρυστάλλου – αναστολέα πραγματοποιήθηκε με επώαση προσχηματισμένων κρυστάλλων στο διάλυμα ανάπτυξης των κρυστάλλων που περιείχε και τον αναστολέα στους 16 °C. Ο αναστολέας κατά την επώαση αυτή διαχέεται στον κρύσταλλο και προσδένεται στο κέντρο για το οποίο εμφανίζει συγγένεια.

Μετά το πέρας συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος συλλέχθηκε ένας κρύσταλλος και τοποθετήθηκε σε τριχοειδές σωλήνα (capillary). Η συλλογή του κρυστάλλου έγινε προσεκτικά με μελέτη σε στερεοσκόπιο ώστε να αποφευχθούν κρύσταλλοι με προσμίξεις ή αλλοιώσεις. Η μεταφορά στο τριχοειδές πραγματοποιήθηκε με πιπέτα Pasteur και από το τριχοειδές απομακρύνθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα με τη χρήση απορροφητικού χαρτιού. Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος ο τριχοειδής σωλήνας σφραγίστηκε στα δυο του άκρα με τη χρήση παραφίνης. Ο σωλήνας

τοποθετήθηκε στην πηγή ακτίνων X (X-ray source Microstar Bruker Rotating Anode equipped with a MAR345 Image Plate detector). Οι συγκεντρώσεις αναστολέα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι χρόνοι επώασης αναγράφονται στον πίνακα 7.

Dataset	Compound	Concentration (mM)	Soaking time(hrs)	Resolution (Å)
1.	R <sub>EtOAc</sub>	5mg/ml in 10% DMSO	24h	2.8
2.	R <sub>EtOAc</sub>	1mg/ml in 10% DMSO 2mg/ml in 20% DMSO	18 days 20h	2.2
3.	R <sub>EtOAc</sub>	3.5 mg in 10mM BES, 25% DMSO (150 µl)	20h	2.25

**Πίνακας 7:** Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση των κρυστάλλων με τα δείγματα και χρόνοι επώασης.

### 2.5.3 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η πειραματική διαδικασία ήταν προσαρμογή αυτής που περιγράφεται από τους Οικονομακος et al (53). Όπως αναφέρεται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α, η ακτινοβόληση του κρυστάλλου με ακτίνες X προκαλεί τη δημιουργία δευτερογενούς ακτινοβολίας. Για να συμβεί αυτό, ο τριχοειδής σωλήνας τοποθετήθηκε στο γωνιόμετρο και έγινε ευθυγράμμιση του κρυστάλλου με τη διεύθυνση της ακτινοβολίας. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα mar345 (54).

Η συλλογή των δεδομένων έγινε με την τεχνική της περιστροφής, κατά την οποία περιστρέφεται ο κρύσταλλος σε μικρή γωνία γύρω από ένα σταθερό άξονα κατά τη διάρκεια της ακτινοβολίας του. Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων υλοποιήθηκε με τα προγράμματα iMOSFLM (55) και AIMLESS (56) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση του μοντέλου με τη χρήση REFMAC (57) του πακέτου CCP4. Μέσω του προγράμματος WinCoot (58) πραγματοποιήθηκε έλεγχος,

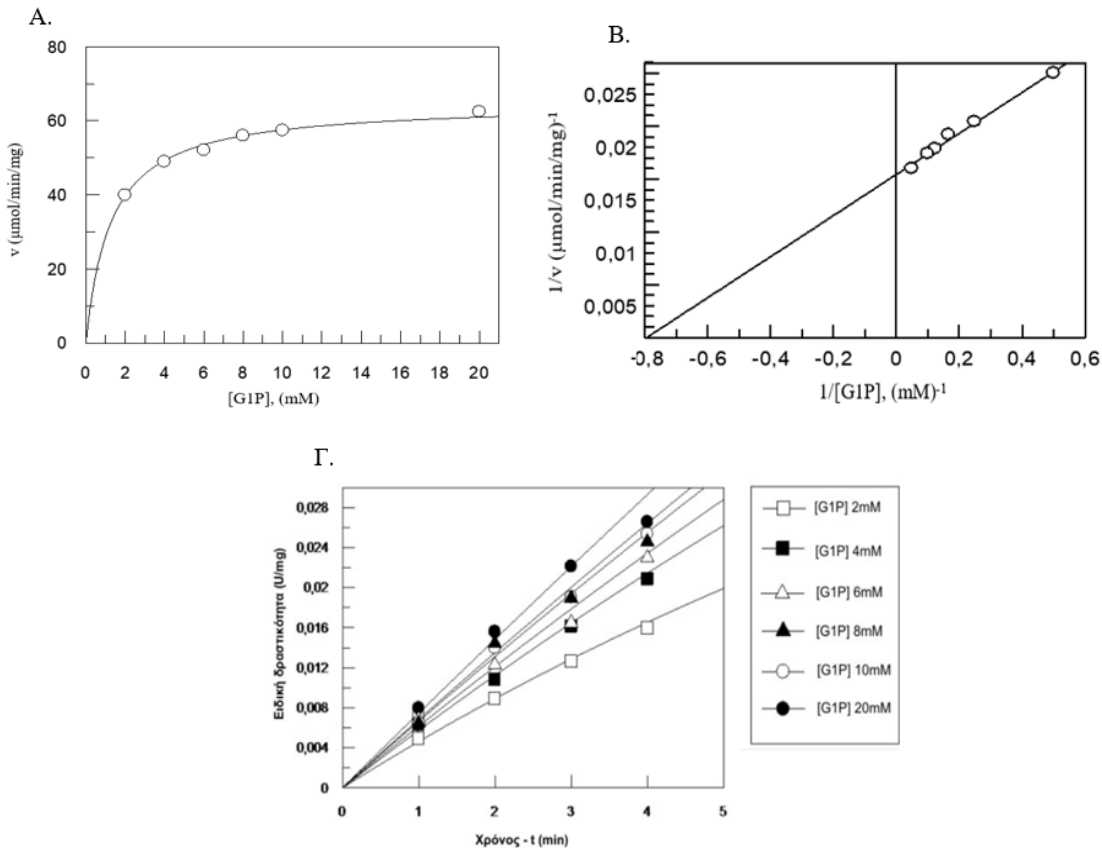
προσδιορισμός, ανάλυση και βελτιστοποίηση των μορίων που εμφανίζονται στο μοντέλο, ώστε να ταιριάζουν στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα του χάρτη.

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1. Κινητική Μελέτη

##### 3.1.1. Προσδιορισμός Κινητικών Παραμέτρων

Προσδιορίστηκε η  $K_M$  του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, η  $V_{max}$  και η ειδική δραστικότητα του (specific activity, Sp.Activity), η οποία εκφράζει τις μονάδες ενζύμου που υπάρχουν ανά μονάδα μάζας του ενζύμου και μετριέται σε units/mg . Οι μετρήσεις ήταν οι εξής  $K_M = 1.26 \pm 0.07$  ,  $V_{max} = 64.81 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10:** Α. Προσδιορισμός της  $V_{max}$  του ενζύμου. Στον άξονα y απεικονίζονται οι τιμές της ταχύτητας αντίδρασης  $V$  του ενζύμου και στον άξονα x απεικονίζονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις G1P που δρα το ένζυμο. Β. Προσδιορισμός της τιμής  $1/v$ . Στον άξονα y απεικονίζονται οι τιμές της ταχύτητας αντίδρασης του ενζύμου ανεστραμμένες  $1/V$  και στον

άξονα x παριστάνονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις G1P που δρα το ένζυμο. Γ. Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου. Στον άξονα y απεικονίζονται οι τιμές της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου και στον άξονα x απεικονίζονται τα λεπτά (min) που περνούν κατά την αντίδραση. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος σε κάθε αντίδραση απεικονίζονται με διαφορετικό σύμβολο.

### 3.1.2. Προσδιορισμός $IC_{50}$

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις του ενζύμου παρουσία των εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 20μg/ml και με [G1P]=2mM προκειμένου να οριστούν τα πιο δραστικά δείγματα, όσον αφορά την ικανότητά τους να αναστέλλουν το ένζυμο gmGPb και προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός της  $IC_{50}$  σε αυτά τα δείγματα. Κατά την δοκιμασία αυτήν, το δείγμα R<sub>EtOAc</sub> παρουσίασε τη μέγιστη ανασταλτική δράση και το αμέσως επόμενο ισχυρό ανασταλτικό δείγμα είναι το εκχύλισμα R<sub>MeOH</sub>. Τα εκχυλίσματα φύλλων δεν παρουσίασαν ισχυρή ανασταλτική δράση στο ένζυμο, συγκριτικά με τα εκχυλίσματα ρίζας (Πίνακας 8).

	Ενεργότητα gmGPb	Αναστολή gmGPb
Μάρτυρας	100%	0%
R <sub>Hexane</sub>	100%	0%
R <sub>EtOAc</sub>	<b>37%</b>	<b>63%</b>
R <sub>MeOH</sub>	<b>88%</b>	<b>12%</b>
S <sub>Hexane</sub>	92%	8%
S <sub>EtOAc</sub>	88%	12%
S <sub>MeOH</sub>	99%	1%

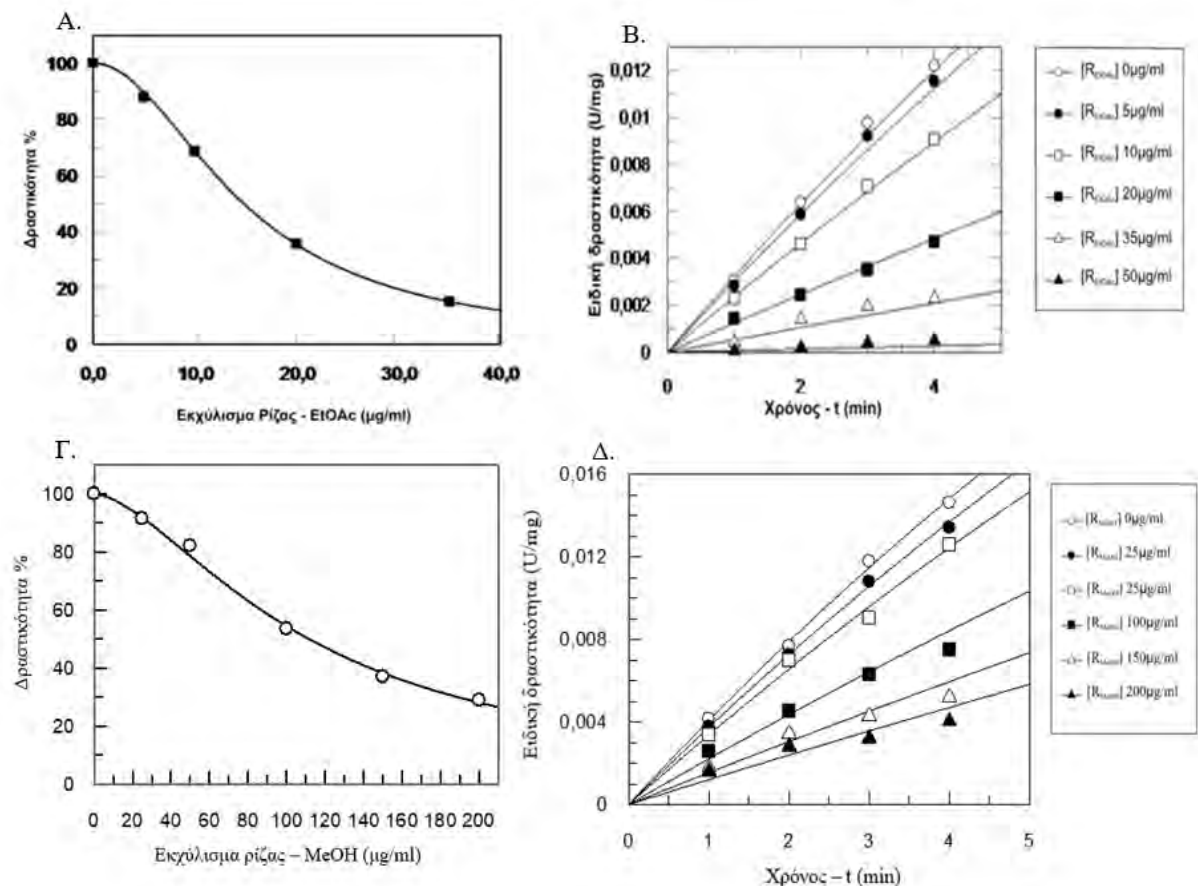
**Πίνακας 8:** Ικανότητα των εκχυλισμάτων να αναστέλλουν την gmGPb, C<sub>εκχυλισμάτων</sub> = 20μg/ml, [G1P] = 2mM

Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η  $IC_{50}$  για τους δύο πιο ισχυρούς αναστολείς από το εκχύλισμα ρίζας (με EtOAc και με MeOH), ώστε να περιοριστούν οι πιθανές ενώσεις – μεταβολίτες που μπορεί να ευθύνονται για την ανασταλτική δράση.

Η  $IC_{50}$  του εκχυλίσματος R<sub>EtOAc</sub> υπολογίστηκε με συγκεντρώσεις R<sub>EtOAc</sub> (0μg/ml, 5μg/ml, 10μg/ml, 20μg/ml, 35μg/ml και 50μg/ml) σε σταθερή συγκέντρωση ενζύμου και υποστρώματος (G1P=2mM). Στη συγκέντρωση δείγματος R<sub>EtOAc</sub> 50μg/ml υπήρξε πλήρης

αναστολή ενζύμου. Η τιμή  $IC_{50}$  για το  $R_{EtOAc}$  υπολογίστηκε  $IC_{50} = 14.80 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$  με συντελεστή κλίσης (slope factor) =  $1.99 \pm 0.03$  (Εικόνα 11).

Ο προσδιορισμός της  $IC_{50}$  του  $R_{MeOH}$  έγινε με τη χρήση των εξής συγκεντρώσεων:  $0\mu\text{g/ml}$ ,  $25\mu\text{g/ml}$ ,  $50\mu\text{g/ml}$ ,  $100\mu\text{g/ml}$ ,  $150\mu\text{g/ml}$  και  $200\mu\text{g/ml}$ . Η τιμή  $IC_{50}$  για το εκχύλισμα ρίζας MeOH υπολογίστηκε  $IC_{50} = 111.53 \pm 2.71$ , ενώ ο αντίστοιχος συντελεστής κλίσης είναι Slope factor =  $1.614 \pm 0.085$  (Εικόνα 11).



**Εικόνα 11:** Α. Προσδιορισμός  $IC_{50}$  του εκχυλίσματος  $R_{EtOAc}$  για το ένζυμο mGPb με συγκέντρωση υποστρώματος στο διάλυμα αντίδρασης  $[G1P] = 2\text{mM}$ .  $IC_{50} = 14.80 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ . Slope factor  $1.99 \pm 0.03$ . Β. Προσδιορισμός της ειδικής δραστηκότητας του ενζύμου παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος  $R_{EtOAc}$ . Γ. Προσδιορισμός  $IC_{50}$  του εκχυλίσματος  $R_{MeOH}$  για το ένζυμο mGPb σε συγκέντρωση υποστρώματος στην αντίδραση  $[G1P] = 2\text{mM}$ .  $IC_{50} = 111.53 \pm 2.71$ . Slope factor  $1.614 \pm 0.085$ . Δ. Προσδιορισμός της ειδικής δραστηκότητας του ενζύμου παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλίσματος  $R_{MeOH}$ .

### 3.1.3. Δοκιμασία γλυκόζης

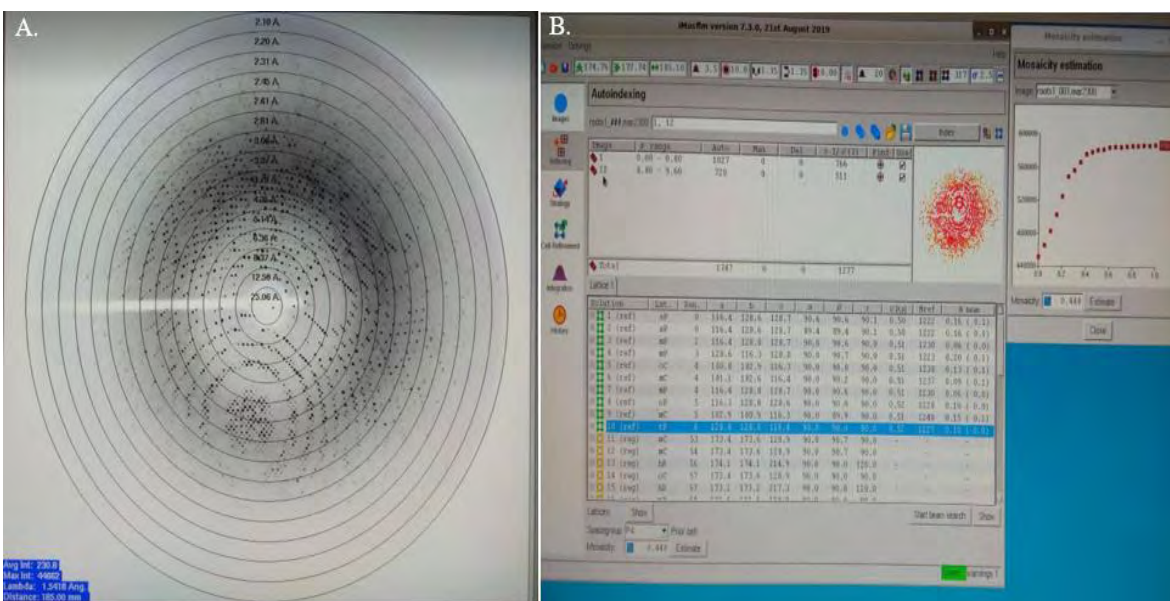
Η δοκιμασία γλυκόζης στο δείγμα φανέρωσε την ύπαρξη γλυκόζης σε υψηλή συγκέντρωση και στα δύο εκχυλίσματα. Οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων ήταν 2mg/ml. Στο εκχύλισμα EtOAc η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι 2.84mM ενώ στο εκχύλισμα MeOH είναι 1.7mM.

$R_{EtOAc}$	$R_{MeOH}$
2.84mM	1.7mM

**Πίνακας 9:** Οι συγκεντρώσεις γλυκόζης στα εκχυλίσματα ρίζας EtOAc και MeOH. [EtOAc]= 2mg/ml, [MeOH]=2mg/ml

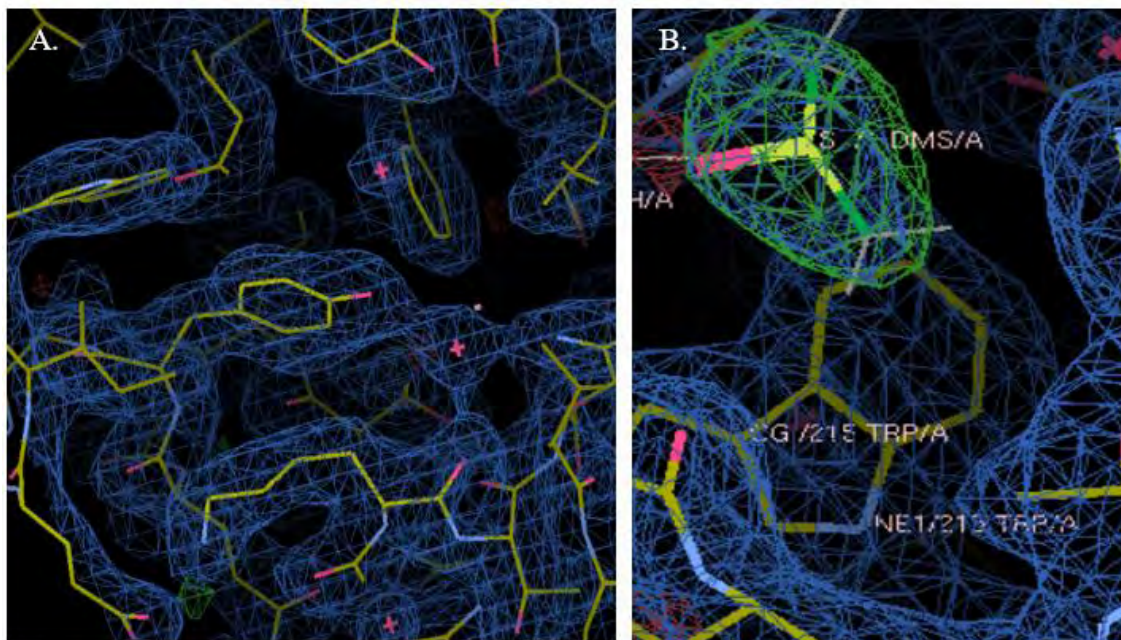
### 3.1.4. Κρυσταλλογραφία συγγένειας

Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που συλλέχθηκαν (Εικόνα 12), υπέστησαν επεξεργασία και το αποτέλεσμα που παρουσιάστηκε ήταν η δομή του ενζύμου χωρίς την παρουσία κάποιου προσδέτη που να διαθέτει την ικανότητα αναστολής. Συγκεκριμένα, τα μόρια που φάνηκαν να αλληλεπιδρούν με το ένζυμο ήταν μόνο μόρια νερού ( $H_2O$ ) και DMSO (Εικόνα 13). Η στατιστική ανάλυση για τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που συλλέχθηκαν παρουσιάζεται στην Εικόνα 14.



**Εικόνα 12:** Α. Απεικόνιση σημείων πρόπτωσης των ακτίνων X (περιθλασίγραμμα) από το πρόγραμμα mar345(54), Β. Γραφιστικό περιβάλλον του προγράμματος Mosflm (iMosflm) κατά την παραλαβή των αποτελεσμάτων. Δεξιά αναγράφεται η μωσαϊκότητα του κρυστάλλου η οποία είναι ίση με 0.448.





**Εικόνα 13:** Α. Μόρια H<sub>2</sub>O έχουν εισέλθει στη δομή του ενζύμου και δημιουργούν δεσμούς με αμινοξέα του. Β. Ένα μόριο DMSO εντοπίζεται εντός της δομής του ενζύμου κοντά στο αμινοξύ τρυπτοφάνη (tryptophan – TRP).

	Roots1	Roots2	Roots3
Microstar Bruker Rotating Anode; λ (Å)	1.5418	1.5418	1.5418
Space group	<i>P4<sub>2</sub>2<sub>1</sub>2</i>	<i>P4<sub>2</sub>2<sub>1</sub>2</i>	<i>P4<sub>2</sub>2<sub>1</sub>2</i>
Cell dimensions (Å), a,b,c α,β,γ	128.55, 128.55, 116.36, 90.00, 90.00, 90.00	128.70, 128.70, 116.4, 90.00, 90.00, 90.00	128.64, 128.64, 116.39, 90.00, 90.00, 90.00
Resolution (Å)	71.63-2.80	56.32-2.25	56.30-2.30
Outermost shell (Å)	2.95-2.80	2.32-2.25	2.49-2.30
Reflections measured	74674	138284	104675
Unique reflections (σ>0)	24194	42695	40758
Rsymm <sup>a</sup>	0.190 (0.617)	0.107 (0.438)	0.107 (0.550)
Completeness %	98.8 (98.4)	91.7 (93.4)	93.4 (95.3)
<I/σI>	5.0 (2.0)	6.5 (2.2)	6.5 (2.7)
Redundancy	3.1 (3.1)	3.2 (2.7)	2.6 (2.3)
Wilson Plot B-value (Å <sup>2</sup> )	26.1	22.52	27.41
Final Rcryst <sup>b</sup> (Rfree <sup>c</sup> ) %	14.63 (21.14)	17.07 (21.47)	15.99 (20.05)
r.m.s. deviation from ideality			
in bond lengths (Å)	0.009	0.008	0.008
in bond angles (°)	1.587	1.507	1.4812
Ramachandran (u-w) plot			
Residues in most favored regions	93.8%	95.6%	94.9%
Residues in allowed regions	6.2%	5.4%	5.1%
Values in parentheses are for the outermost shell.			
<sup>a</sup> Rsymm = $\sum_i  I_i(h) - \bar{I}(h)  / \sum_i I_i(h)$ where $I_i(h)$ and $\bar{I}(h)$ are the $i$ th and the mean measurements of the intensity of reflection $h$ . <sup>b</sup> Rcryst = $\sum_o  F_o - F_c  / \sum_o F_o$ , where $F_o$ and $F_c$ are the observed and calculated structure factors amplitudes of reflection $h$ , respectively. <sup>c</sup> Rfree is equal to Rcryst for a randomly selected 5% subset of reflections not used in the refinement.			

**Εικόνα 14:** Στατιστική ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

## Συζήτηση

Αναλύοντας τα αποτελέσματα του πειράματος φανερώνεται η ικανότητα του *L. japonicus* να αναστέλλει τη rmGPb in vitro. Από προηγούμενη ανάλυση μεταβολιτών των εκχυλισμάτων R<sub>MeOH</sub> και S<sub>MeOH</sub> από τους Desbrosses et al (41) σημειώθηκαν οι ενώσεις όπου υπήρχαν σε περίσσεια στα εκχυλίσματα ριζών συγκριτικά με τα εκχυλίσματα φύλλων, δηλαδή υπήρχε αναλογία  $\frac{\text{Root}}{\text{Stems}} > 1$  (ο λόγος του μεταβολίτη στο εκχύλισμα ριζών προς το μεταβολίτη στο εκχύλισμα φύλλων είναι μεγαλύτερος της μονάδας). Οι ενώσεις που απέμειναν μετά το διαχωρισμό ήταν διάφορα αμινοξέα, οργανικά οξέα (γαλακτικό οξύ, γλυκονικό οξύ, κιτραμαλικό οξύ), αρωματικές ενώσεις (βενζοϊκό οξύ), ενώσεις με άζωτο (πουτρεσκίνη και ουρία), σάκχαρα (Ριβόζη, Φρουκτόζη, Γλυκόζη, Φουκόζη, Μαλτόζη), πολυόλες (Σορβιτόλη, Μαννιτόλη, θρεϊτόλη), φωσφορικό οξύ, Φαινυλπυροσταφυλικό οξύ, μεθοξαμίνη, 2-O-γλυκερόλ-β-D-γαλακτοπυρανοζίτης, Μελεζιτόση, Μεθυλκιτρικό οξύ, DL-2-μεθυλκιτρικό οξύ και τετρακοσαμεθυλκυκλοδωδεκασιλοξάνιο (41). Η ανάλυση αυτή σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του πειράματος οδήγησε στον προσδιορισμό της γλυκόζης στο δείγμα, η οποία αν και υψηλότερη από την  $K_i = 1.7\text{mM}$  της γλυκόζης για την rmGPb (59) δεν εμφανίστηκε συνδεδεμένη κατά την κρυσταλλογραφία συγγένειας.

Ενδέχεται η αναστολή του ενζύμου να οφείλεται εν μέρει στη γλυκόζη του εκχυλίσματος. Ωστόσο από τα εκχυλίσματα του *L. japonicus* δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα η ένωση η οποία αλληλοεπιδρά με το ένζυμο, όπως επίσης και με ποιο κέντρο του ενζύμου αλληλοεπιδρά. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις οι οποίες μπορεί να βρίσκεται το μόριο-προσδέτης μέσα στο εκχύλισμα δεν επιτρέπουν την αναγνώρισή του με κρυσταλλογραφία συγγένειας. Είναι απαραίτητο να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες με αναλυτικές μεθόδους όπως είναι η φασματογραφία μάζας για τον προσδιορισμό της ένωσης ή των ενώσεων που μπορεί να συμβάλλουν στην in vitro αναστολή της rmGPb.

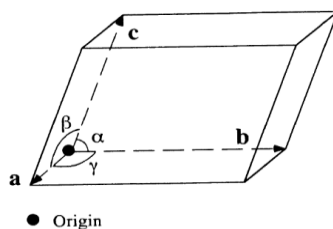
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

### 1. Εισαγωγή στην Κρυσταλλογραφία

Οι ακτίνες X ανακαλύφθηκαν το 1895 από τον Wilhelm Roentgen και από τότε έχει αποκτήσει πρωτεύοντα ρόλο στην επιστήμη της Βιοχημείας (60). Το 1912 ο Max von Laue πρότεινε το πείραμα που για πρώτη φορά θα έφερνε στο φως, την εγγενή ικανότητα των κρυστάλλων να περιθλούν ακτίνες X, εξαιτίας της τρισδιάστατης δομής των ατόμων (61). Στο ίδιο άρθρο (61) αναφέρεται ότι μέχρι τότε, υπήρξε η πεποίθηση πως οι κρύσταλλοι εκπέμπουν φθορίζουσα ακτινοβολία και όχι ότι δρουν ως τρισδιάστατοι ανακλαστήρες. Το 1915 οι Bragg βασίστηκαν στην παρατήρηση του Laue και την επιβεβαίωσαν, ενώ ανέπτυξαν και το νόμο του Bragg, δίνοντας γέννηση στην επιστήμη της X-ray φασματομετρίας και X-ray κρυσταλλογραφίας (61,62). Το 1926 έγινε η πρώτη κρυστάλλωση πρωτεΐνης - ουρεάσης και το 1953 αναπτύχθηκε το μοντέλο της διπλής έλικας του DNA στην ανάκλαση των ακτινών X πάνω στο DNA (60). Ορόσημο της επιστήμης της Βιολογίας αποτέλεσε η στιγμή της οπτικοποίησης της πρώτης κρυσταλλικής δομής μακρομορίου το 1957 (60). Επίσης, σημαντική χρονολογία αποτελεί το 1970, κατά την οποία ιδρύθηκε η πρώτη τράπεζα πρωτεϊνικών δεδομένων Protein Data Bank (PDB) (60). Η ανάπτυξη της επιστήμης της κρυσταλλογραφίας συνεχίζεται μέχρι και σήμερα.

### 2. Κρύσταλλοι

Οι κρύσταλλοι σε οργανικά μόρια σχηματίζονται κατά την διάταξη των ατόμων στην δομή με τη μικρότερη ελεύθερη ενέργεια (63). Ένας κρύσταλλος αποτελείται από επαναλαμβανόμενες κυψελίδες με ίδιο προσανατολισμό (63). Σε κάθε κυψελίδα μπορεί να αναγνωριστούν τρία διανύσματα (a,b,c) τα οποία σχηματίζουν τις γωνίες  $\alpha, \beta, \gamma$ , όπως φαίνεται στην Εικόνα Π1 (63).



**Εικόνα Π1:** Παρουσιάζονται τα διανύσματα που αναγνωρίζονται σε μία κυψελίδα κρυσταλλικού πλέγματος, καθώς και οι γωνίες που σχηματίζουν μεταξύ τους. Το σύνολο των διανυσμάτων καθορίζει τη μορφή της κυψελίδας (63).

Τα διανύσματα  $a, b, c$  αντιστοιχούν στους άξονες  $x, y, z$  (63). Το πακετάρισμα αυτό των μορίων οδηγεί συχνά σε συμμετρικούς κρυστάλλους, στην τρισδιάστατη δομή υπάρχουν 230 ομάδες χώρου (space group) (63). Ωστόσο, ο αριθμός αυτός δεν είναι ίδιος και για τους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους. Αυτό οφείλεται στην ασυμμετρία των αμινοξέων, καθώς μόνο L-αμινοξέα εντοπίζονται στις πρωτεΐνες (63). Οι κρύσταλλοι βιολογικών μακρομορίων είναι ευαίσθητοι στην ακτινοβολία X (63). Τα φωτόνια του μήκους κύματος αυτού μπορούν να προκαλέσουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών τα οποία με τη βοήθεια του διαλύτη μεταφέρονται σε διάφορα σημεία του κρυστάλλου αλληλοεπιδρώντας με άτομα του κρυστάλλου και αλλοιώνοντας την κρυσταλλική δομή (63).

Η ζημιά που προκαλούν οι ακτίνες X στο κρυσταλλικό πλέγμα μπορεί να μειωθεί με τη επώαση του κρυστάλλου σε κρυογονικές θερμοκρασίες κατά την ακτινοβολήση, αφού σε αυτές τις θερμοκρασίες δεν επιτρέπεται η μεταφορά των ελεύθερων ριζών (63).

### 3. Αρχές πρωτεϊνικής κρυστάλλωσης

Για το σχηματισμό κρυστάλλου πρωτεΐνης είναι απαραίτητο η πρωτεΐνη να είναι καθαρή από άλλες προσμίξεις και όλα τα μόριά της να έχουν ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες όπως όμοια κατανομή φορτίου (63). Παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό πρωτεϊνικών κρυστάλλων είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η θερμοκρασία, το pH, και οι παράγοντες κατακρήμνισης (όπως άλατα, οργανικοί διαλύτες) (63).

Κατά την κρυστάλλωση πρωτεϊνών υπάρχουν δύο διακριτά στάδια (Εικόνα Π2) (64). Το πρώτο είναι το στάδιο της πυρήνωσης, κατά το οποίο δημιουργούνται οι πυρήνες

κρυστάλλωσης, τα πρώτα συσσωματωμένα, διατεταγμένα μόρια (64). Το δεύτερο είναι η ανάπτυξη του κρυστάλλου (64).



**Εικόνα Π2:** Διακριτά στάδια της κρυστάλλωσης πρωτεϊνών. Πρώτα η πρωτεΐνη υπάρχει στο διάλυμα σε διαλυμένη μορφή όποτε δεν σχηματίζει κρυστάλλους. Σε υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεϊνών και άλατος εμφανίζεται η μετασταθερή φάση της πυρηνοποίησης, όπου δημιουργούνται τα πρώτα συσσωματωμένα-διατεταγμένα μόρια, τα οποία είναι μικρά και δεν είναι σταθερά. Το επόμενο στάδιο είναι το στάδιο πυρήνωσης έχει αυξηθεί κατά πολύ η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, γι αυτό σχηματίζονται μεγαλύτεροι κρύσταλλοι και πιο σταθεροί. Η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης οδηγεί στην φάση κατακρήμνισης, όπου η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται άμορφα (63).

#### 4. Περίθλαση ακτινών X

Τα φωτόνια, όταν προσπίπτουν σε ηλεκτρόνια μπορεί να προκαλέσουν ελαστική ή ανελαστική σκέδαση, ανάλογα την ενέργειά του προσπίπτοντος φωτονίου (65). Οι ακτίνες X που χρησιμοποιούνται στη δομική βιολογία, έχουν ενέργεια περίπου 6-20 keV και προκαλούν κυρίως ελαστική σκέδαση όταν προσπίπτουν σε ηλεκτρόνιο (65). Έτσι διατηρείται η φάση, ενώ αλλάζει μόνο η κατεύθυνση του φωτονίου, το οποίο και εντοπίζεται από ειδικό ανιχνευτή (65). Αν και υπάρχει η αναλογία της περίθλασης ακτινών X με την σκέδαση του ορατού φωτός σε δισδιάστατο πλέγμα, η περίθλαση ακτινών X γίνεται καλύτερα κατανοητή με τη σφαίρα του Ewald, με την οποία ερμηνεύεται ο αντίστροφος χώρος (63). Μέσω αυτής της κατασκευής είναι δυνατός ο προσδιορισμός των διαστάσεων της κυψελίδας βάσει την κατεύθυνση περίθλασης (63). Η δομή και η διάταξη

των μορίων στην κυψελίδα μπορούν να προσδιοριστούν, αφού συσχετίζονται με την περίθλαση των ακτίνων X (63). Συγκεκριμένα, με την ανίχνευση της περίθλασης ακτίνων X μπορεί να προσδιοριστεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στα διάφορα σημεία του κρυστάλλου (63). Η περίθλαση λοιπόν είναι αποτέλεσμα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας των ατόμων (63). Σε μία κυψελίδα υπάρχουν πολλά άτομα και σε ένα κρύσταλλο εντοπίζονται πολλές κυψελίδες (63). Επομένως, γίνεται πρόσθεση όλων αυτών των κυμάτων για κάθε άτομο ώστε να προσδιοριστεί η κατανομή ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην κυψελίδα και στον κρύσταλλο (63).

### **5. Νόμος του Bragg**

Ο Bragg προκειμένου να εξηγήσει την περίθλαση των ακτίνων X, ανέπτυξε τον περίφημο νόμο του Braggo οποίος εξηγεί την συνθήκη με την οποία παρατηρούνται οι περιθλασμένες ακτίνες (66). Με αυτό το νόμο συσχετίζονται οι διάφορες θέσεις του πλέγματος με την περίθλαση των ακτίνων (66). Σύμφωνα με τον νόμο αυτό, όταν η ακτίνα προσπίπτει σε δύο σημεία που βρίσκονται σε παράλληλα επίπεδα του πλέγματος με δείκτες  $h, k, l$ , απόσταση  $d$  και γωνία πρόσπτωσης  $\theta$ , τα κύματα που παράγονται κατά την ανάκλαση συνδυάζονται για να σχηματίσουν την περίθλαση της ακτίνας (66). Ο συνδυασμός αυτός μπορεί να έχει προκαλεί καταστροφική αλληλεπίδραση για την ακτίνα, ή να έχει μέγιστη συμβολή κυμάτων όταν το path difference (PD) είναι  $n\lambda$  όπου  $n$  είναι ακέραιος αριθμός (66).

Η εξίσωση που περιγράφει τον νόμο αυτόν είναι:  $n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta$  (66).

### **6. Προσδιορισμός Δομής**

Ένα μακρομόριο αποτελείται από πολλά άτομα. Προκειμένου να προσδιοριστεί η δομή του μορίου πρέπει να προσδιοριστούν οι ηλεκτρονιακές πυκνότητες των ατόμων, οι οποίες είναι ανάλογες με το πλάτος της σκεδαζόμενης ακτίνας (67). Η διάδοση του κύματος από κάθε άτομο περιγράφεται από τον ατομικό παράγοντα σκέδασης  $f$  (67). Η πρόσθεση όλων των διανυσμάτων  $f$  οδηγεί στον προσδιορισμό του μοριακού διανύσματος σκέδασης  $F$  (67). Ο παράγοντας  $F$  σε συνδυασμό με τη γωνία φάσης κάθε πιθανής ανάκλασης, οδηγεί

στη δυνατότητα του προσδιορισμού της ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε κάθε σημείο της κυψελίδας και κατ' επέκταση του κρυστάλλου (67). Με τη χρήση της πληροφορίας αυτής παράγεται ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ωστόσο, στο άμεσο πείραμα κρυσταλλογραφίας μετριέται η ένταση της ακτίνας που περιθλάται και δεν υπολογίζεται το F (67). Η ένταση σχετίζεται με το μέτρο του διανύσματος S όμως δεν προσφέρει γνώση ως προς τη γωνία φάσης σύμφωνα με τον τύπο  $I(hkl) = I(S) = |F(S)|^2$  (67).

Έτσι δημιουργείται το ονομαζόμενο πρόβλημα φάσης, το οποίο επιλύεται με τους εξής τρόπους:

- **Μοριακή αντικατάσταση**
- Συνάρτηση Patterson
- Πολλαπλή ισόμορφη αντικατάσταση
- Άμεσες μέθοδοι
- Ανώμαλη διασπορά με χρήση ακτινοβολίας σύγχροτρον (67)

## 7. Βελτιστοποίηση δομής και παράγοντας R

Ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας που παράγεται βάσει των αποτελεσμάτων της ακτινοβολίας ακτινών X ή X-ray ακτινοβολίας, εξαρτάται από τα πειραματικά δεδομένα (π.χ. κρύσταλλοι) και από το μοντέλο που χρησιμοποιείται (67). Το μοντέλο μπορεί να βελτιωθεί με την προσαρμογή της δομής ως προς τον χάρτη (67). Η προσαρμογή αυτή στηρίζεται στον παράγοντα R ο οποίος αποτελεί δείκτη αξιοπιστίας και προσδιορίζεται από την εξίσωση :

$R = \frac{\sum |F(S)_{obs}| - |F(S)_{calc}|}{\sum |F(S)_{obs}|}$ , όπου  $F(S)_{obs}$  είναι το F που προσδιορίζεται βάσει το πειράματος και το  $F(S)_{calc}$  είναι το F που υπολογίζεται θεωρητικά.

Από τον τύπο προκύπτει πως όσο το R προσεγγίζει το 0% τόσο προσεγγίζει και ένα τέλειο ταίριασμα (67). Για την αντικειμενική βελτίωση του μοντέλου χρησιμοποιείται κατά την βελτιστοποίηση το 90% των δεδομένων ενώ το 10% απομονώνεται ως δείγμα ελέγχου (67). Έτσι υπολογίζεται κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης το  $R_{free}$  που αντιστοιχεί στο δείγμα ελέγχου και το R που αντιστοιχεί στο υπό μελέτη δείγμα (67). Εάν το μοντέλο πραγματικά βελτιώνεται τότε αναμένεται πτώση του  $R_{free}$  και του R (67).

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Antigen Presenting Cells	APC
Assay Buffer 1	AB1
Assay Buffer 2	AB2
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1	CEACAM1
Diabetes Mellitus	DM
Diabetes Mellitus	GDM
dimethylsulfoxide	DMSO
Dithiothreitol	DTT
Enzyme	E
Ethyl Acetate	EtOAc
Ethylenediaminetetraacetic Acid	EDTA
Forkhead box Protein O1	FOXO1
Ga interacting ,Vesicle-associated protein	GIV
Glucose 1-Phosphate	G1P
Glucose 6-Phosphate	G6P
Glucose transporter	GLUT
Glycine	Gly/G
Glycogen Phosphorylase	GP
Glycogen Phosphorylase	GP
Glycogen Synthase Kinase-3	GSK3
Growth factor Receptor-Bound protein 2	GRB2
Hemoglobin A1c	HbA1c
Human – Liver Glycogen Phosphorylase b	HLGpb
Impaired Fasting Glucose	IFG
Impaired Glucose Tolerance	IGT
Inhibitor	I
Insulin Receptor	INSR
Insulin Receptor Substrate	IRS
Interferon regulatory factor	IRF
Interleukin 2	I-2
mechanistic Target of Rapamycin Complex	mTORC1
Methanol	MeOH
NAD(P)H Oxidase 4	NOX4
N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid	BES
Normal Glucose Tolerance	NGT
Nuclear Factor kappa-B	NF-κB
p70 ribosomal protein S6 kinase 1	S6K1
Phenylalanine	Phe/Y
Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate	PIP3
Phosphofructokinase 1	PFK
Phosphoinositide 3-kinase	PI3K



Phosphorylase kinase	PhK
Product	P
Proline-rich Akt Substrate of 40kDa	PRAS40
Protein Phosphatase	PP1
Protein tyrosine Phosphatase 1B	PTP1B
Pyridoxal Phosphate	PLP
Pyruvate dehydrogenase	PDH
Rab GTPase activating protein	RABGAP
Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase b	RMGPb
Serine	Ser/S
SH2 and PH domain-containing adapter protein	APS
Sodium Azide	NaN3
Sodium Dodecyl Sulfate	SDS
Src Homology 2	SH2
Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1	SREBP1
Substrate	S
TBC1 domain family member 1	TBC1D4
Threonine	Thr/T
Tryptophan	Trp/W
Tuberous sclerosis complex 2	TSC 2
Type 1 Diabetes Mellitus	T1DM
Type 2 Diabetes Mellitus	T2DM
Tyrosine	Tyr/Y
$\beta$ -Glycerol Phosphate	$\beta$ -GP
Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας	Π.Ο.Υ
Ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1	ΡΔ 50:50:1

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

1. Piero MN. Diabetes mellitus – a devastating metabolic disorder. *Asian J Biomed Pharm Sci.* 2015;4(40):1–7.
2. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas.* 9th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2019.
3. Vlad I, Oieru DS, Popa AR, Zaharia M. Long term complications of diabetes – a review. *Rom J Diabetes, Nutr Metab Dis.* 2014;21(4):347–55.
4. Chellappan DK, Sivam NS, Teoh KX, Leong WP, Fui TZ, Chooi K, et al. Gene therapy and type 1 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2018;108(September):1188–200.
5. Turton JL, Raab R, Rooney KB. Low-carbohydrate diets for type 1 diabetes mellitus: A systematic review. *PLoS One.* 2018;13(3):1–16.
6. Crèvecoeur I, Vig S, Mathieu C, Overbergh L. Understanding type 1 diabetes through proteomics. *Expert Rev Proteomics [Internet].* 2017;14(7):571–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14789450.2017.1345633>
7. Dardano A, Penno G, Del Prato S, Miccoli R. Optimal therapy of type 2 diabetes: A controversial challenge. *Aging (Albany NY).* 2014;6(3):187–206.
8. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus - Present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol [Internet].* 2012;8(4):228–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.183>
9. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. In: Bonora E, DeFronzo R, editors. *Diabetes Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, Diagnosis, Prevention, and Treatment.* Springer, Cham; 2018. p. Springer, Cham.
10. Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2010;1(3):68.
11. Paz-Filho G, Wong M-L, Licinio J, Mastronardi C. Leptin therapy, insulin

- sensitivity, and glucose homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012;16(9):549.
12. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol.* 2018;217(7):1–17.
  13. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev.* 2018;98(4):2133–223.
  14. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Metabolic Signalling: Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(1):31–44.
  15. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia.* 2017;60(9):1577–85.
  16. Colagiuri S, Matthews D, Leiter LA, Chan SP, Sesti G, Marre M. The place of gliclazide MR in the evolving type 2 diabetes landscape: A comparison with other sulfonylureas and newer oral antihyperglycemic agents. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2018;143:1–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.05.028>
  17. Xu L, Li Y, Dai Y, Peng J. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. *Pharmacol Res* [Internet]. 2018;130:451–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2018.01.015>
  18. Bezborodkina NN, Chestnova AY, Vorobev ML, Kudryavtsev BN. Spatial Structure of Glycogen Molecules in Cells. *Biochem.* 2018;83(5):467–82.
  19. Jeremy M. B, John L. T, Lubert S. *Biochemistry*, 7th Edition. 2015. 631–651 p.
  20. Oikonomakos NG, Skamnaki VT, Tsitsanou KE, Gavalas NG, Johnson LN. A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure.* 2000;8(6):575–84.
  21. Kantsadi AL, Apostolou A, Theofanous S, Stravodimos GA, Kyriakis E, Gorgogietas VA, et al. Biochemical and biological assessment of the inhibitory

potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2014;67:35–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.01.055>

22. Demetres D L, Joseph M H, Atsushi K, Vassiliki T S, Demetra S M C, Anastassia L K, et al. Phytogetic Polyphenols as Glycogen Phosphorylase Inhibitors: The Potential of Triterpenes and Flavonoids for Glycaemic Control in Type 2 Diabetes. *Curr Med Chem*. 2017;24(4):384–403.
23. Somsak L, Czifrak K, Toth M, Bokor E, Chrysina E, Alexacou K-M, et al. New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents. *Curr Med Chem*. 2008;15(28):2933–83.
24. Hayes JM, Kantsadi AL, Leonidas DD. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: Potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochem Rev*. 2014;13(2):471–98.
25. Stravodimos GA, Kantsadi AL, Apostolou A, Kyriakis E, Kafaski-Kanelli V-N, Solovou T, et al. Affinity Crystallography Reveals the Bioactive Compounds of Industrial Juicing Byproducts of *Punica granatum* for Glycogen Phosphorylase. *Curr Drug Discov Technol*. 2017;15(1):41–53.
26. Oikonomakos N. Glycogen Phosphorylase as a Molecular Target for Type 2 Diabetes Therapy. *Curr Protein Pept Sci*. 2002;3(6):561–86.
27. Agius L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2015;46:34–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2015.09.002>
28. Chrysina ED, Kosmopoulou MN, Tiraidis C, Kardakaris R, Bischler N, Leonidas DD, et al. muscle glycogen phosphorylase b . Evidence for a new binding site. *Protein Sci*. 2005;14:873–88.
29. Srinivasan P, Vijayakumar S, Kothandaraman S, Palani M. Anti-diabetic activity of quercetin extracted from *Phyllanthus emblica* L. fruit: In silico and in vivo

- approaches. *J Pharm Anal* [Internet]. 2018;8(2):109–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2017.10.005>
30. Adeva-Andany MM, González-Lucán M, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C, Ameneiros-Rodríguez E. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin* [Internet]. 2016;5:85–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.02.001>
  31. Buenz EJ, Schnepfle DJ, Bauer BA, Elkin PL, Riddle JM, Motley TJ. Techniques: Bioprospecting historical herbal texts by hunting for new leads in old tomes. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(9):494–8.
  32. Azaizeh H, Saad B, Khalil K, Said O. The state of the art of traditional Arab herbal medicine in the Eastern region of the Mediterranean: A review. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2006;3(2):229–35.
  33. Nasser Singab A, Youssef FS. Medicinal Plants with Potential Antidiabetic Activity and their Assessment. *Med Aromat Plants*. 2014;03(01):1–12.
  34. Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Bansal YK. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Curr Trends Biotechnol Pharm*. 2015;9(3):293–304.
  35. Georgatza D, Gorgogietas VA, Kylindri P, Charalambous MC, Papadopoulou KK, Hayes JM, et al. The triterpene echinocystic acid and its 3-O-glucoside derivative are revealed as potent and selective glucocorticoid receptor agonists. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2016;79:277–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.08.028>
  36. Krokida A, Delis C, Geisler K, Garagounis C, Tsikou D, Peña-Rodríguez LM, et al. A metabolic gene cluster in *Lotus japonicus* discloses novel enzyme functions and products in triterpene biosynthesis. *New Phytol*. 2013;200(3):675–90.
  37. Moses T, Papadopoulou KK, Osbourn A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(6):439–62.

38. Cornara L, Xiao J, Burlando B. Therapeutic Potential of Temperate Forage Legumes: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(November):S149–61.
39. García-Calderón M, Pérez-Delgado CM, Palove-Balang P, Betti M, Márquez AJ. Flavonoids and Isoflavonoids Biosynthesis in the Model Legume *Lotus japonicus*; Connections to Nitrogen Metabolism and Photorespiration. *Plants.* 2020;9(6):774.
40. Suzuki H, Fukushima EO, Shimizu Y, Seki H, Fujisawa Y, Ishimoto M, et al. *Lotus japonicus* Triterpenoid Profile and Characterization of the CYP716A51 and LjCYP93E1 Genes Involved in Their Biosynthesis In Planta. *Plant Cell Physiol.* 2019;60(11):2496–2509.
41. Desbrosses GG, Kopka J, Udvardi MK. *Lotus japonicus* metabolic profiling. Development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant-microbe interactions. *Plant Physiol.* 2005;137(4):1302–18.
42. Skiada V, Avramidou M, Bonfante P, Genre A, Papadopoulou KK. An endophytic *Fusarium*–legume association is partially dependent on the common symbiotic signalling pathway. *New Phytologist.* 2020. 0–3 p.
43. Shah N, Wakabayashi T, Kawamura Y, Skovbjerg CK, Wang MZ, Mustamin Y, et al. Extreme genetic signatures of local adaptation during *Lotus japonicus* colonization of Japan. *Nat Commun [Internet].* 2020;11(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-14213-y>
44. Stougaard J. *Lotus japonicus* : A Model Plant for the Legume Family ☆. *Ref Modul Life Sci.* 2017;(February 2016):1–4.
45. Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Kato T, Nakao M, et al. Genome structure of the legume. *Lotus Jpn DNA Res [Internet].* 2008;15:227–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/dsn008>
46. Sato S, Tabata S. *Lotus japonicus* as a platform for legume research. *Curr Opin Plant Biol.* 2006;9(2):128–32.
47. Aguda AH, Lavallee V, Cheng P, Bott TM, Meimetis LG, Law S, et al. Affinity

- Crystallography: A New Approach to Extracting High-Affinity Enzyme Inhibitors from Natural Extracts. *J Nat Prod.* 2016;79(8):1962–70.
48. Harris TK, Keshwani MM. Chapter 7 Measurement of Enzyme Activity [Internet]. 1st ed. Vol. 463, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc.; 2009. 57–71 p. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63007-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63007-X)
  49. Lorsch JR. Practical steady-state enzyme kinetics [Internet]. 1st ed. Vol. 536, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc.; 2014. 3–15 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00001-5>
  50. Price NC, Stevens L. *Fundamentals of Enzymology*. Third. 1999. 125–145 p.
  51. Drakou CE, Gardeli C, Tsialtas I, Alexopoulos S, Mallouchos A, Koulas SM, et al. Affinity Crystallography Reveals Binding of Pomegranate Juice Anthocyanins at the Inhibitor Site of Glycogen Phosphorylase : The Contribution of a Sugar Moiety to Potency and Its Implications to the Binding Mode. *J Agric Food Chem.* 2020;68(37):10191–9.
  52. Mavrokefalos N, Myriantopoulos V, Chajistamatiou AS, Chrysina ED, Mikros E. Discovery of the glycogen phosphorylase-modulating activity of a resveratrol glucoside by using a virtual screening protocol optimized for solvation effects. *Planta Med.* 2015;81(6):507–16.
  53. Oikonomakos NG, Tsitsanou KE, Zographos SE, Skamnaki VT, Goldmann S, Bischoff H. Allosteric inhibition of glycogen phosphorylase a by the potential antidiabetic drug 3-isopropyl 4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methylpyridine-3,5,6-tricarboxylate . *Protein Sci.* 1999;8(10):1930–45.
  54. Klein C. The mar345 User's Guide [Internet]. 2019. Available from: <https://www.marxperts.com/man/mar345/index.html>
  55. Leslie A. The graphical user interface for Mosflm [Internet]. 2019. Available from: <https://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/harry/imosflm/ver730/introduction.html>
  56. Evans P. AIMLESS (CCP4: Supported Program) [Internet]. 2019. Available from:

<https://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/harry/pre/aimless.html>

57. Vagin AA, Steiner RA, Lebedev AA, Potterton L, McNicholas S, Long F, et al. REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2004;60:2184–95.
58. Emsley, Lohkamp B, Scott W, Cowtan K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallogr Sect D - Biol Crystallogr*. 2010;66:486–501.
59. Watson KA, Mitchell EP, Johnson LN, Cruciani G, Son JC, Bichard CJF, et al. Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: from crystallographic analysis to drug prediction using GRID force-field and GOLPE variable selection. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 1995;51(4):458–72.
60. Shi Y. A glimpse of structural biology through X-ray crystallography. *Cell*. 2014;159(5):995–1014.
61. Eckert M. Max von Laue and the discovery of X-ray diffraction in 1912. *Ann Phys*. 2012;524(5):83–5.
62. Powell HR. X-ray data processing. *Biosci Rep*. 2017;37(5):1–14.
63. Jan D, Jeroen M (contributor). *Crystallography Principles of Protein X-Ray*. Third. Springer New York; 2010. 332 p.
64. Wlodawer A. Chapter 2 - Protein [Internet]. Vol. 1607, *Methods Molecular Biology*. 2007. 68–75 p. Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-7000-1\\_24](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-7000-1_24)
65. Steve P. M, William C. T, Maxwell B. W, Ando N. X-ray scattering studies of protein structural dynamics. *Chem Rev*. 2017;117(12):7615–72.
66. Le Pevelen DD. Small Molecule X-Ray Crystallography, Theory and workflow. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 2010. p. 2559–76.
67. van Holde KE, Johnson C, Ho PS. *Principles of Physical Biochemistry*. Second. 2006. 360–382 p.



