



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

# ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΚΑΡΑΓΩΓΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2015**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **Δρ. Στάγκος Δημήτριος**

Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

### **Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική**

Λέκτορας Βιοχημείας- Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή, υπεύθυνο εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και αναπληρωτή καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Δρ. Δημήτρη Λεωνίδα που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο, στο οποίο είναι υπεύθυνος, καθώς και για τις συμβουλές και την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Γεώργιο Στραβοδήμο και Αναστασία Καντσάδη για την άψογη συνεργασία που είχαμε, όπως επίσης για την πολύτιμη βοήθεια τους και την υπομονή τους. Χωρίς την καθοδήγησή τους, η παρούσα εργασία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Λειτουργικής και Δομικής Βιοχημείας: υποψήφιους διδάκτορες, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές για το άριστο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν, όπως επίσης την οικογένεια και τους φίλους μου για τη βοήθεια, τη στήριξη και την κατανόηση όλα αυτά τα χρόνια.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	6
1.Εισαγωγή.....	7
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	7
1.2 Τύποι σακχαρώδη διαβήτη.....	8
1.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1.....	8
1.2.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.....	10
1.2.3 Πιθανή Εξήγηση Μειωμένης Έκκρισης Ινσουλίνης.....	11
1.3 Γλυκόζη.....	12
1.3.1 Ομοιόσταση της Γλυκόζης.....	14
1.3.2 Ινσουλίνη.....	16
1.3.3 Γλυκαγόνη.....	17
2. Θεωρητικό Μέρος.....	18
2.1 Το γλυκογόνο.....	18
2.1.1 Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	19
2.1.2 Σύνθεση του γλυκογόνου.....	19
2.1.3 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου.....	20
2.1.4 Ρύθμιση μεταβολισμού του γλυκογόνου.....	22
2.2 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	22
2.2.1 Γενικά.....	22
2.2.2 Γενετικός τόπος GP.....	27
2.2.3 Δομή GP.....	23
2.2.4 Βιολογικός ρόλος GP.....	27
2.2.5 Φωσφορική Πυριδοξάλη.....	28
2.2.6 Ρύθμιση GP.....	30

2.2.7 Καταλυτικό Κέντρο-Αλλοστερικό Κέντρο.....	33
2.3 Κινητική Ενζύμων.....	36
2.4 Υπογλυκαιμικά φάρμακα και GP.....	39
2.5 Φυτικά εκχυλίσματα με υπογλυκαιμική δράση.....	41
2.6 Φυτικά εκχυλίσματα Rosaceae.....	45
2.6.1 Rosa Canina.....	45
2.6.2 Crataegus Orientalis.....	46
2.6.3 Rubus Sanctus.....	47
<b>3. Πειραματικό Μέρος.....</b>	<b>49</b>
3.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b.....	49
3.2 Κινητική μελέτη GP.....	52
3.2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας.....	52
3.2.2 Προσδιορισμός της Km.....	53
3.2.3 Προσδιορισμός IC50 αναστολέα.....	54
3.3 Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b.....	55
3.4 Παρασκευή δ/μάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-P γλυκόζης.....	56
3.5 Παρασκευή τυφλών.....	58
3.6 Προσδιορισμός P.....	58
3.7 Επεξεργασία δεδομένων-πρόγραμμα Grafit.....	59
3.8 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb.....	62
<b>4. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....</b>	<b>64</b>
4.1 Απομόνωση Grb από σκελετικούς μυς κουνελιού.....	64
4.2 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων.....	64
4.2.1 Αποτελέσματα Κινητικής μελέτης GP.....	64
4.2.2 Αποτελέσματα κινητικών των εκχυλισμάτων Rosaceae.....	66
<b>Συμπεράσματα.....</b>	<b>69</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>70</b>

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια χρόνια μεταβολική ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία, και πλήττει 383 εκατομμύρια ασθενείς παγκοσμίως, ενώ το ποσό αυτό ολοένα και αυξάνεται. Επομένως, μια πρόκληση της επιστημονικής κοινότητας είναι ο σχεδιασμός νέων φαρμάκων με υπογλυκαιμική δράση, τα οποία να μην έχουν παρενέργειες και να έχουν μειωμένη τοξικότητα και χαμηλό κόστος. Τη λύση στην πρόκληση αυτή δίνουν τα φυτικά εκχυλίσματα με αντιδιαβητικές ιδιότητες. Η Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι το κύριο ένζυμο που συμμετέχει στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και αποτελεί το μοριακό στόχο για το σχεδιασμό υπογλυκαιμικών φαρμάκων (φυσικών και μη). Κρυσταλλογραφικές αναλύσεις κρυστάλλων GP έδειξαν πιθανές θέσεις πρόσδεσης υποψήφιων αναστολέων. Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η ανασταλτική δραστηριότητα τριών πολυφαινολικών φυτικών εκχυλισμάτων Rosaceae (*Rosa Canina*, *Crataegus Orientalis*, *Rubus Sanctus*) με κινητικά πειράματα. Οι μελέτες έδειξαν ότι τα δύο από τα τρία εκχυλίσματα παρουσιάζουν ανασταλτική δραστηριότητα στην GP, ενώ το τρίτο (*Rubus*) όχι. Τα αποτελέσματα αυτά βρέθηκαν, μελετώντας τις τιμές  $IC_{50}$  *in vitro*. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η GPb, που απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού.

## **ABSTRACT**

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease, characterized by hyperglycemia, and affects 383 million patients worldwide, with the amount increasing. Therefore, a challenge to the scientific community is to design new drugs with hypoglycemic activity, which will have no side effects and toxicity and low cost. The solution to this challenge is given by plant extracts with anti-diabetic properties. Glycogen phosphorylase (GP) is an enzyme that has a central role in glycogen metabolism, and hence constitutes an important molecular target for the design of hypoglycemic drugs (natural and non-natural). Crystallographic analysis of GP crystals revealed all potential inhibitor binding sites. In this work we evaluated the inhibitory potency of three polyphenolic plant extracts Rosaceae (*Rosa Canina*, *Crataegus Orientalis*, and *Rubus Sanctus*) with kinetic experiments. The studies showed that two of the three extracts exhibit significant inhibitory potency against GP, while the third (*Rubus*) did not. These results were found by studying the  $IC_{50}$  values *in vitro*. The enzyme that was used was GPb isolated from rabbit skeletal muscle.

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

## 1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια πολύπλοκη μεταβολική ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία). Υπεύθυνη για το γεγονός αυτό είναι, είτε η μηδενική/μειωμένη ικανότητα του παγκρέατος για την παραγωγή ινσουλίνης, είτε η ελαττωμένη ευαισθησία των σωματικών κυττάρων στην ινσουλίνη που οδηγεί στην μειωμένη πρόσληψη της (αντίσταση στην ινσουλίνη). Πρόκειται άρα για μια νόσο που χαρακτηρίζεται από αφύσικη χρησιμοποίηση καυσίμων, όπου η γλυκόζη υπερπαράγεται από το ήπαρ και χρησιμοποιείται σε μικρότερη έκταση από τα άλλα όργανα. Η χρόνια αυτή υπεργλυκαιμία συνδυάζεται με μακροχρόνιες ανεπάρκειες και δυσλειτουργίες στη φυσιολογική λειτουργία διάφορων ιστών και οργάνων.<sup>(9,12)</sup>

Η συμπτωματολογία του σακχαρώδους διαβήτη περιλαμβάνει πολυφαγία, πολυδιψία, πολυφαγία, κούραση, θολή όραση, απώλεια σωματικού βάρους, γλυκοζουρία και σεξουαλικές διαταραχές. Επιπλέον, μπορεί να προκαλέσει βλάβες του αμφιβληστροειδούς, νεφρική ανεπάρκεια, καρδιαγγειακή νόσο και νευροπάθεια. (Εικόνα 1.1)<sup>(8)</sup>



**Εικόνα 1.1:** Κύρια συμπτώματα Σακχαρώδους Διαβήτη

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι η πιο κοινή σοβαρή μεταβολική ασθένεια στον κόσμο και προσβάλλει εκατοντάδες εκατομμυρίων ανθρώπων. Οι επιπτώσεις της ασθένειας αφορούν περίπου το 5% του συνολικού πληθυσμού και σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες της IDF (International Diabetes Federation) το 8.3% των ενηλίκων δηλαδή 382 εκατομμύρια άνθρωπο (Εικόνα 1.2), έχουν διαβήτη, ενώ ο αριθμός αυτός πρόκειται να αυξηθεί σε 592 εκατομμύρια σε λιγότερο από 25 χρόνια. Η πλειοψηφία του πληθυσμού των 382 ασθενών

είναι ηλικίας 40-59 και το 80% από αυτούς κατοικούν σε χαμηλού/μεσαίου εισοδήματος χώρες (Εικόνα 1.3)<sup>(11)</sup>



**Εικόνα 1.2:** Αριθμός ασθενών ανά περιοχή. (IDF 2013)<sup>(5)</sup>

IDF REGION	2013 MILLIONS	2035 MILLIONS	INCREASE %
Africa	19.8	41.4	109%
Middle East and North Africa	34.6	67.9	96%
South-East Asia	72.1	123	71%
South and Central America	24.1	38.5	60%
Western Pacific	138.2	201.8	46%
North America and Caribbean	36.7	50.4	37%
Europe	56.3	68.9	22%
World	381.8	591.9	55%

**Εικόνα 1.3:** Διάγραμμα ασθενών με διαβήτη ανα περιοχή, ηλικίας 20-79 το 2013 και το 2035 (IDF)<sup>(11)</sup>

## 1.2 Τύποι Σακχαρώδους Διαβήτη

Ο σακχαρώδης διαβήτης διακρίνεται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τον διαβήτη τύπου 1, τον διαβήτη τύπου 2 και τον διαβήτη κύησης.

### 1.2.1 Διαβήτης Τύπου 1

Ο διαβήτης τύπου 1, ή ινσουλινοεξαρτώμενος/νεανικός διαβήτης, προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των κυττάρων β του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη και συνήθως εμφανίζεται πριν την ηλικία των 20. Ο όρος ινσουλινοεξαρτώμενος σημαίνει ότι το πάσχον άτομο χρειάζεται ινσουλίνη για να ζήσει. Η καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος, έχει ως



αποτέλεσμα την ολική έλλειψη ή την ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης και έτσι παρατηρούνται υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα και στα ούρα (υπεργλυκαιμία και γλυκοζουρία αντίστοιχα). Εφόσον απουσιάζει η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη βρίσκεται σε επίπεδα υψηλότερα του κανονικού. Στην ουσία ο διαβητικός βρίσκεται σε κατάσταση βιοχημικής ασιτίας παρά το υψηλό επίπεδο γλυκόζης στο αίμα. Επειδή υπάρχει ανεπάρκεια ινσουλίνης, η γλυκόζη δεν μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα και έτσι πρέπει να χορηγηθεί εξωγενής ινσουλίνη, ούτως ώστε να διατηρηθούν τα επίπεδα γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα.<sup>(2,10)</sup>

Η πολυφαγία και η πολυδιψία που χαρακτηρίζουν ασθενείς με διαβήτη τύπου 1, προκαλείται από τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, λόγω αυξημένης παραγωγής από το ήπαρ. Η γλυκόζη απεκκρίνεται με τα ούρα όταν η συγκέντρωσή της στο αίμα είναι μεγαλύτερη από αυτή που μπορούν να επαναπορροφήσουν τα νεφρικά σωληνάκια. Η γλυκόζη συνοδεύεται με νερό, επομένως ο ασθενής που δεν λαμβάνει κάποια αγωγή, έχει πολυφαγία και πολυδιψία.<sup>(5)</sup> Η έλλειψη ινσουλίνης από την άλλη οδηγεί στην αποικοδόμηση λιπιδίων και πρωτεϊνών επειδή η χρησιμοποίηση των υδατανθράκων παρεμποδίζεται. Γι' αυτό το λόγο παράγονται μεγάλες ποσότητες ακετυλο-CoA μέσω οξείδωσης των λιπαρών οξέων, ενώ στη συνέχεια παράγονται κετονοσώματα. Τα κετονοσώματα δεν επιτρέπουν στους νεφρούς να διατηρούν την οξεοβασική ισορροπία, συνεπώς λόγω της αφυδάτωσης και της μείωσης του pH, ο ασθενής μπορεί να πέσει σε κώμα.<sup>(2)</sup>



**Εικόνα 1.4:** Διαφορές μεταξύ διαβήτη τύπου 1 και 2

### **1.2.2 Διαβήτης Τύπου 2**

Ο διαβήτης τύπου 2 ή μη ινσουλινοεξαρτώμενος, είναι ο πιο συχνός τύπος διαβήτη, καθώς αφορά περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων και συνήθως εμφανίζεται σε παχύσαρκους μεσήλικους. Αυτή η μορφή της ασθένειας, περιλαμβάνει άτομα που έχουν αντοχή στην ινσουλίνη και συνήθως έχουν σχετική (όχι ολική), έλλειψη ινσουλίνης. Αρχικά και συχνά καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους, τα άτομα αυτά δεν χρειάζονται θεραπεία με ινσουλίνη για να επιβιώσουν. Σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου 1 όπου υπάρχει ολική ή μερική έλλειψη ινσουλίνης, το πάγκρεας παράγει ινσουλίνη η οποία όμως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα σωματικά κύτταρα (*Εικόνα 1.4*).<sup>(7)</sup>

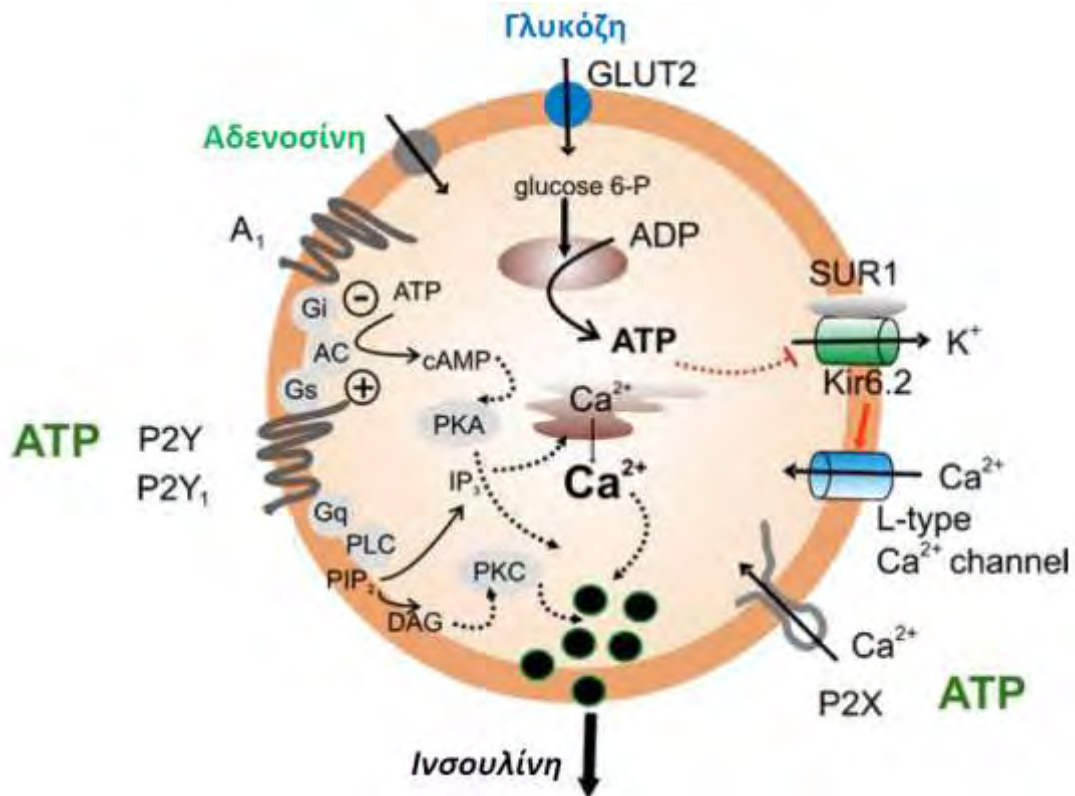
Οι περισσότεροι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 είναι παχύσαρκοι και η παχυσαρκία η ίδια προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη σε κάποιο βαθμό. Πιθανός λόγος που συμβαίνει αυτό, είναι ο λιπώδης ιστός που μειώνει την ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη. Ασθενείς που δεν είναι παχύσαρκοι μπορεί να έχουν αυξημένα ποσότητα σωματικού λίπους που διανέμονται στην κοιλιακή περιοχή. Υπάρχουν πιθανώς πολλές διαφορετικές αιτίες για αυτή τη μορφή διαβήτη αν και οι αιτιολογίες δεν είναι γνωστές. Καταστροφή των β κυττάρων του παγκρέατος δεν συμβαίνει, ενώ η αυθόρμητη κετοξέωση σπάνια συμβαίνει. Όταν έχουμε κετοξέωση, συμβαίνει μόνον ίσως λόγω άγχους ή λόγω μιας άλλης ασθένειας. Αυτή η μορφή διαβήτη παραμένει χωρίς διάγνωση, επειδή οι περισσότεροι ασθενείς που παρουσιάζουν υπεργλυκαιμία μπορούν να επαναφέρουν τα επίπεδα γλυκόζης στο φυσιολογικό χωρίς να απαιτείται συνεχής θεραπεία.<sup>(2,10)</sup>

Τα συμπτώματα του ΣΔ τύπου 2 δεν είναι τόσο σοβαρά σε πρώιμα στάδια της ασθένειας όσο τα κλασικά συμπτώματα του διαβήτη. Παρ'όλα αυτά, οι ασθενείς αυτοί διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο να εμφανίσουν μικροαγγειακές και μακροαγγειακές επιπλοκές, ενώ εμφανίζονται και τα συμπτώματα της ναυτίας, εξάντλησης, διαταραχές του δέρματος και της όρασης, πολυδιψία, πολυουρία. Οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 μπορεί να έχουν φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης και σε καταστάσεις που η υπεργλυκαιμία θα οδηγούσε σε αύξηση της ινσουλίνης εφόσον τα β κύτταρα λειτουργούν κανονικά. Η απέκκριση της ινσουλίνης, όμως, είναι ελαττωματική και ανεπαρκής για να αντισταθμίσει την αντίσταση της ινσουλίνης. Η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να βελτιωθεί με ελάττωση του σωματικού βάρους, και φαρμακευτική θεραπεία της υπεργλυκαιμίας, αλλά σπάνια επαναφέρεται στο φυσιολογικό. Η πιθανότητα για εμφάνιση της νόσου αυξάνεται με την ηλικία, το σωματικό βάρος και την έλλειψη άσκησης, ενώ εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα με υπέρταση και δυσλιπιδαιμία. Συχνά συνδέεται με μια έντονη γενετική προδιάθεση, περισσότερο από το διαβήτη τύπου 1.<sup>(2)</sup>

Η διαχείριση του διαβήτη χωρίς καμιά παρενέργεια είναι μια πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα. Για τη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη διάφορα φάρμακα έχουν ανακαλυφθεί για την καταπολέμηση της υπεργλυκαιμίας όπως διγουανίδια, σουλφονουριές και τριαζολιδενοδιόνες. Η χρήση αυτών των φαρμάκων περιορίζεται από τις φαρμακοκινητικές ιδιότητές τους, ποσοστά αποτυχίας και πιθανές παρενέργειες τους. Έτσι ψάχνουμε για μια νέα κατηγορία ενώσεων, ούτως ώστε να ξεπεραστούν τα προβλήματα των διαβητικών και τα φυτικά εκχυλίσματα αποτελούν μια χρήσιμη πηγή ενώσεων με υπογλυκαιμική δράση για κατασκευή νέων φαρμακευτικών φορέων και συμπληρωμάτων για τη θεραπεία του διαβήτη. Πιθανοί στόχοι των φαρμάκων περιλαμβάνουν την φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) μέσω αναστολέων, τον υποδοχέα γλυκαγόνης (μέσω ανταγωνιστών) και άλλα ρυθμιστικά ένζυμα όπως η φωσφατάση της 6-P γλυκόζης και της αναστολής της φωσφατάσης της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης.<sup>(2,5)</sup>

### **1.2.3 Πιθανή Εξήγηση της Μειωμένης Έκκρισης Ινσουλίνης**

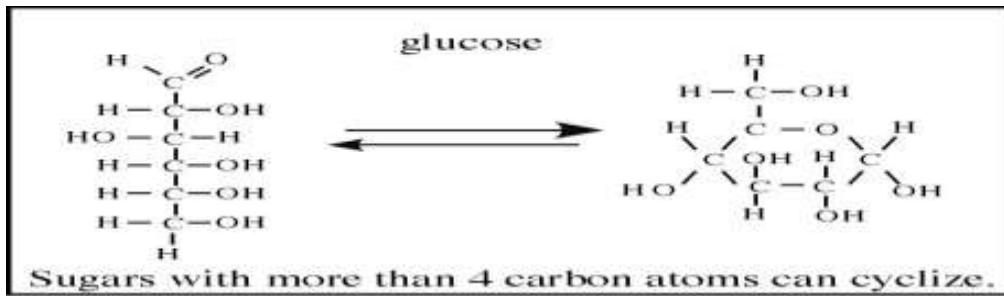
Τα κανάλια  $K^+$  που ελέγχονται από το ATP ( $K_{ATP}$ ), συνδεδεμένα με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη SUR (Sulfonylurea Receptor) συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκκρισης της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος. Σε αυτήν την περίπτωση, ο SUR δρα ως ένας αισθητήρας ενέργειας, ρυθμίζοντας την αγωγιμότητα του καναλιού σε συνάρτηση με το κλάσμα ATP/ADP, το οποίο εξαρτάται άμεσα από τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα. Τα κύτταρα αποκρίνονται στην αύξηση της γλυκόζης στο αίμα αυξάνοντας την πρόσληψη γλυκόζης μέσω μεμβρανικών μεταφορέων. Αυτό οδηγεί σε αύξηση του κυτταροπλασματικού ATP, το οποίο συνδέεται στις υπομονάδες Kir6 και SUR του καναλιού  $K_{ATP}$ . Σαν αποτέλεσμα, το κανάλι κλείνει, η έξοδος των ιόντων  $K^+$  σταματά και το δυναμικό ηρεμίας γίνεται λιγότερο αρνητικό, διευκολύνοντας την εκπόλωση της μεμβράνης και την απελευθέρωση της ινσουλίνης. Καθώς η τελευταία είναι μια διαδικασία εξωκύτωσης, επάγεται από την είσοδο ιόντων  $Ca^{2+}$  στο κύτταρο, μέσω τασεο-εξαρτώμενων καναλιών  $Ca^{2+}$  που απαντούν σε οποιαδήποτε μεταβολή του δυναμικού. Αντίθετα, η μείωση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα προκαλεί πτώση του ενδοκυτταρικού ATP, και το ATP που είναι συνδεδεμένο στην NBD2 της SUR υδρολύεται σε ADP. Κάτω από αυτές τις συνθήκες τα κανάλια  $K_{ATP}$  ανοίγουν, το κύτταρο υπερπολώνεται και η έκκριση της ινσουλίνης μειώνεται. Μεταλλάξεις του SUR οδηγούν σε διαβήτη, και αποτελεί εξειδικευμένο στόχο αντιδιαβητικών φαρμάκων. Τα φάρμακα σουλφονουρίας σταθεροποιούν το συνδεδεμένο ATP στη SUR και προωθούν την απελευθέρωση της ινσουλίνης από το πάγκρεας.<sup>(6)</sup>



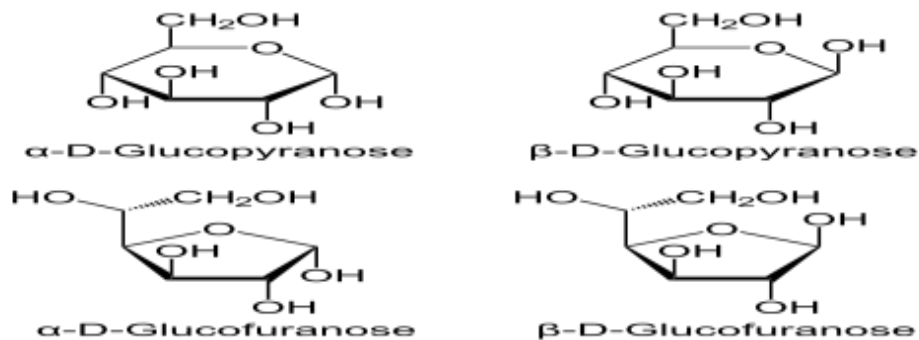
**Εικόνα 1.5:** Τα κανάλια KATP στα β-κύτταρα του παγκρέατος ελέγχουν την απελευθέρωση της ινσουλίνης.<sup>(6)</sup>

### 1.3 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης που αποτελεί το πιο σημαντικό σάκχαρο του μεταβολισμού, καθώς χρησιμοποιείται ως πρωταρχική πηγή ενέργειας. Αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) που συνδέεται με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου με γενικό τύπο  $C_6H_{12}O_6$ . Η γλυκόζη απαντάται στη φύση στη δεξιόμορφη μορφή της και ονομάζεται D-γλυκόζη και γι'αυτό το λόγο πολλές φορές ονομάζεται δεξτρόζη (δεξιότροφη γλυκόζη). Η δομή της κυκλοποιείται και προκύπτει ένας εξαμελής δακτύλιος που μοιάζει με το πυράνιο και γι αυτό ονομάζεται πυρανόζη (*Εικόνα 1.6*). Η σπανιότερη αντίδραση μεταξύ του C-1 και του C-4 δημιουργεί ένα μόριο με πενταμελή δακτύλιο τη φουρανόζη. Συνεπώς το ανοιχτό ισομερές D-γλυκόζης οδηγεί σε 4 διακριτά ισομερή: α-D-γλυκοπυρανόζη, β-D-γλυκοπυρανόζη, α-D-γλυκοφουρανόζη, και β-D-γλυκοφουρανόζη (*Εικόνα 1.7*)<sup>(3)</sup>



**Εικόνα 1.6:** Γλυκόζη σε μορφή ανοιχτής αλυσίδας και κυκλική μορφή.

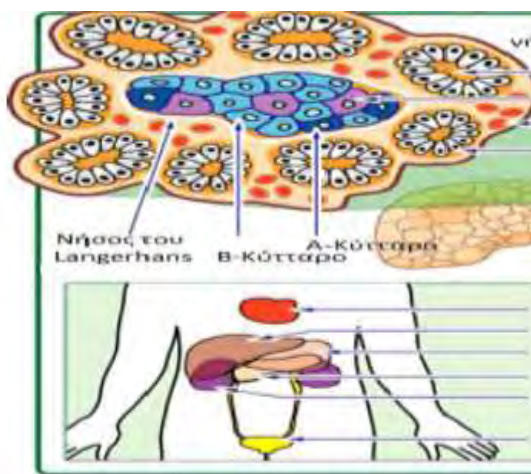


**Εικόνα 1.7:** Στερεοϊσομερή D-γλυκόζης

Η γλυκόζη χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας από τους περισσότερους οργανισμούς, από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο. Η κατανάλωση της γλυκόζης μπορεί να γίνεται είτε με αερόβια αναπνοή, αναερόβια αναπνοή ή ζύμωση. Η γλυκόζη είναι η βασική πηγή ενέργειας του ανθρώπινου σώματος, μέσω της αερόβιας αναπνοής. Το πρώτο βήμα της είναι η φωσφορυλίωση της γλυκόζης από εξοκινάση για να προετοιμαστεί για μεταγενέστερη κατανομή ώστε να παρέχει ενέργεια. Ο κύριος λόγος για την άμεση φωσφορυλίωση της γλυκόζης από εξοκινάση είναι να αποτραπεί η διάχυση έξω από το κύτταρο. Η φωσφορυλίωση προσθέτει μια φορτισμένη φωσφορική ομάδα έτσι ώστε η 6-φωσφορική γλυκόζη να μην μπορεί εύκολα να διασχίσει την κυτταρική μεμβράνη. Τα πρώτα βήματα της μεταβολικής οδού είναι κοινά και μη αναστρέψιμα. Στην αναερόβια αναπνοή ένα μόριο γλυκόζης παράγει ως καθαρό κέρδος δύο μόρια ATP. Στην αερόβια αναπνοή ένα μόριο της γλυκόζης είναι πολύ πιο επικερδής επειδή το καθαρό κέρδος από 32 μόρια ATP που παράγονται κατά την διάρκεια της γλυκόλυσης, αλλά δύο απαιτούνται από τα ένζυμα στη διαδικασία.<sup>(5)</sup>

Η γλυκόζη είναι ένα σημαντικό καύσιμο για τους περισσότερους οργανισμούς, εφόσον είναι το μοναδικό καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος κάτω από συνθήκες επάρκειας τροφής και το μοναδικό καύσιμο που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε οποιαδήποτε περίπτωση. Η

γλυκόζη υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές κυρίως στα φρούτα και ειδικότερα στα ώριμα σταφύλια, όπου παράγεται μέσω του κύκλου του Calvin κατά τις φωτοσυνθέσεις, ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων (γλυκογόνο) αλλά και από μη υδατανθρακικές ενώσεις (γαλακτικό οξύ). Συνηθέστερα η γλυκόζη μετατρέπεται σε έναν πολυσακχαρίτη, προκειμένου να αποθηκευτεί και να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, που στα φυτά είναι το άμυλο και στα θηλαστικά το γλυκογόνο. Το ήπαρ είναι η πρωταρχική πηγή γλυκόζης στο αίμα. Η ηπατική γλυκόζη παράγεται μέσω δύο οδών: τη γλυκογονόλυση και γλυκονεογένεση.<sup>(2,3)</sup>



**Εικόνα 1.8:** Το πάγκρεας και οι τύποι κυττάρων που περιέχονται στα νησίδια Langerhans.

### **1.3.1 Ομοιόσταση της γλυκόζης**

Όλοι οι οργανισμοί χρειάζονται ενέργεια προκειμένου να επιβιώσουν και να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους. Οι ζωικοί οργανισμοί εξασφαλίζουν την ενέργεια που χρειάζονται από το περιβάλλον με την τροφή τους. Τα συστατικά των τροφών, σάκχαρα, λιπαρά οξέα και πρωτεΐνες δεν μπορούν να αξιοποιηθούν άμεσα και για το λόγο αυτό μετατρέπονται, με τη διαδικασία του μεταβολισμού, σε άλλες χημικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν με δύο τρόπους:

1. Να οξειδωθούν και να παράγουν ενέργεια (καταβολισμός)
2. Να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση δομικών ή λειτουργικών μορίων που είναι απαραίτητα για τον οργανισμό (αναβολισμός).<sup>(5)</sup>

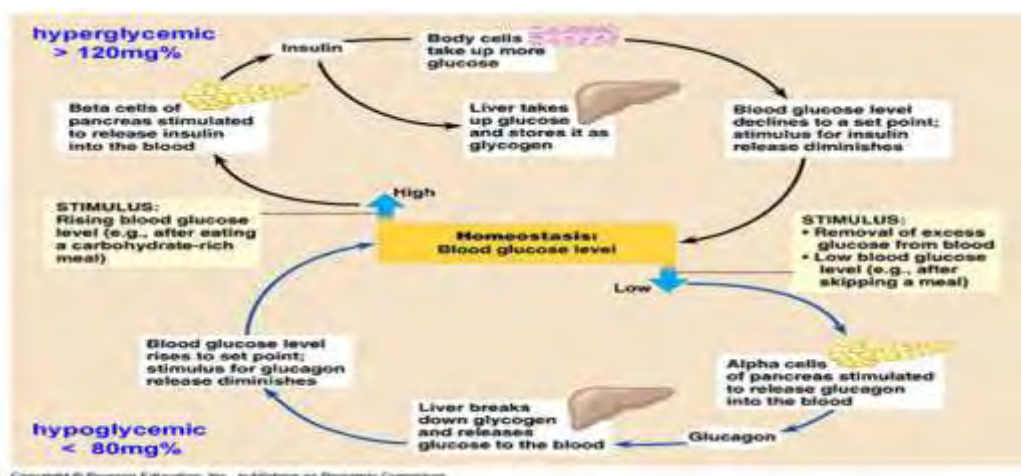
Για την ρύθμιση αυτών των δύο διαδικασιών απαιτείται η συντονισμένη δράση της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης. Ο μοριακός λόγος των συγκεντρώσεων αυτών των ορμονών ελέγχει τον μεταβολισμό και συντελεί στη σταθεροποίηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα (ομοιόσταση της γλυκόζης). Σημαντική προϋπόθεση για τη διατήρηση της ομοιόστασης είναι η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ (γλυκονεογένεση) και της χρησιμοποίησής της (γλυκόλυση), τόσο από ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο λιπώδης και ο μυϊκός ιστός, όσο και από μη ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος και ο νεφρικός ιστός. Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα



ελέγχεται από το πάγκρεας μέσω της παραγωγής ινσουλίνης ( β κύτταρα) και γλυκαγόνης ( α κύτταρα).

Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη είναι ενδοκρινείς ορμόνες δηλαδή εκκρίνονται απ' ευθείας στην κυκλοφορία του αίματος. Οι δύο ορμόνες έχουν ακριβώς αντίστροφο μηχανισμό δράσης, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ρυθμιστική τους ικανότητα. Συγκεκριμένα με τις δύο αυτές ορμόνες ρυθμίζεται η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, που κατά μέσον όρο πρέπει να κυμαίνεται από 70 mg/dL έως 110 mg/dL. Είναι απαραίτητη η ισορροπία ανάμεσα στις 2 ορμόνες γιατί έτσι εξασφαλίζεται η καλή λειτουργία του οργανισμού.<sup>(5)</sup>

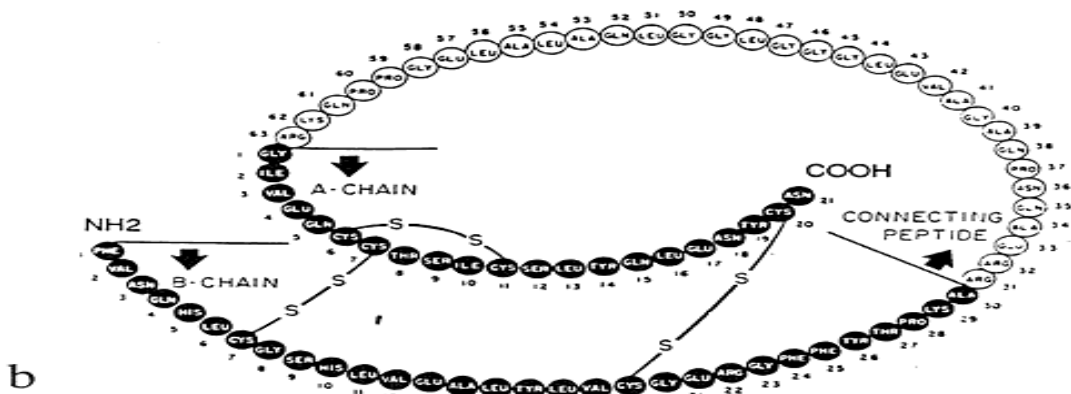
Όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα αυξηθούν, τα β κύτταρα των νησιδίων Langerhans (Εικόνα 1.8) διεγείρονται και εκκρίνουν ινσουλίνη σε αυξανόμενα ποσοστά, ανάλογα με τη συγκέντρωση της γλυκόζης. Στη συνέχεια, η ινσουλίνη συμβάλλει στην ευκολότερη πρόσληψη της γλυκόζης από το λιπώδη ιστό και τα μυϊκά κύτταρα. Έπειτα, το ήπαρ αποθηκεύει τη γλυκόζη με μορφή γλυκογόνου και όταν επέλθει κορεσμός αυτού, η γλυκόζη μεταφέρεται στο λιπώδη ιστό για την σύνθεση λιπαρών οξέων. Τα κύτταρα αυτά, όταν χρειαστούν ενέργεια, χρησιμοποιούν γλυκόζη αντί για λιπαρά οξέα, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση λίπους στον οργανισμό. Εφόσον τα επίπεδα γλυκόζης ελαττωθούν, τα β κύτταρα μειώνουν σημαντικά την έκκριση ινσουλίνης, ενώ την ίδια στιγμή τα α κύτταρα εκκρίνουν γλυκαγόνη στο αίμα. Η γλυκαγόνη με τη σειρά της αυξάνει τα επίπεδα γλυκόζης κυρίως μέσω των διαδικασιών της γλυκογονόλυσης και γλυκονεογένεσης, όπου στο ήπαρ το γλυκογόνο μετατρέπεται σε γλυκόζη, η οποία απελευθερώνεται στο αίμα.(Εικόνα 1.9)<sup>(1)</sup>



Εικόνα 1.9: Ομοίωση της γλυκόζης του αίματος.

### 1.3.2 Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι πρωτεΐνη που αποτελείται από 51 αμινοξέα (Εικόνα 1.10). Εκκρίνεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος (το 60-85% των κυττάρων των νησιδίων Langerhans) τα οποία διεγείρονται από τα μόρια γλυκόζης. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, τόσο αυξάνει ο ρυθμός έκκρισης ινσουλίνης (Εικόνα 1.11). Αυτό συμβαίνει μετά από τη λήψη γευμάτων. Η δράση της είναι αναβολική προς την κατεύθυνση της σύνθεσης πρωτεϊνών και λίπους καθώς και της αποθήκευσης ενέργειας. <sup>(1)</sup>

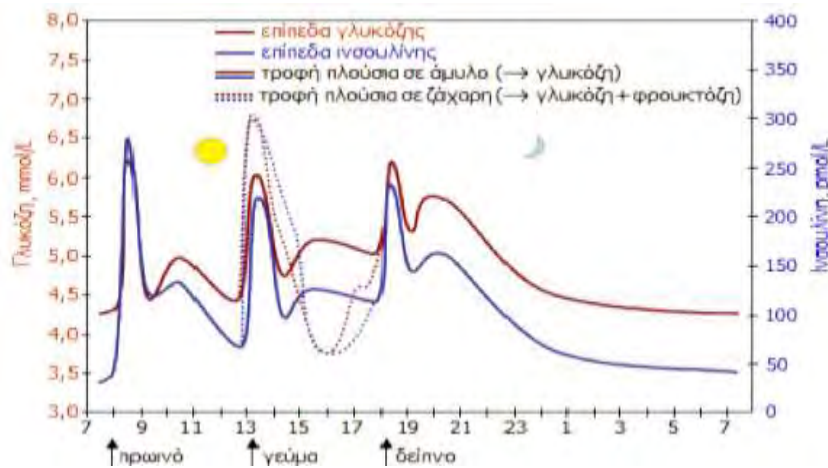


Εικόνα 1.10: Αμινοξική σύσταση ινσουλίνης

Συγκεκριμένα η ινσουλίνη:

- Συντελεί στην πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα είδη κυττάρων του οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα απομακρύνοντας έτσι τη γλυκόζη από το κυκλοφορικό σύστημα. Αυτό επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση ινσουλινοευαίσθητων μεταφορέων που βρίσκονται στην επιφάνειά των κυττάρων. Χωρίς την ινσουλίνη τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη η οποία, μέσω της διαδικασίας οξειδωσής της (γλυκόλυση), αποτελεί την κύρια πηγή χημικής ενέργειας.
- Προκαλεί την "αποταμίευση" γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ υπό τη μορφή γλυκογόνου (γλυκογένεση) και εμποδίζει την αντίστροφη διαδικασία δηλαδή τη διάσπαση του γλυκογόνου και την απελευθέρωση γλυκόζης (γλυκογονόλυση).
- Ενισχύει την εναποθήκευση λίπους και την παραγωγή τριγλυκεριδίων (λιπογένεση) και εμποδίζει τη διάσπαση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (λιπόλυση).
- Ενισχύει το μεταβολισμό των πρωτεϊνών και περιορίζει τη διάσπασή τους και η έλλειψή της (περίοδος νηστείας) οδηγεί σε κατανάλωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών. <sup>(1)</sup>

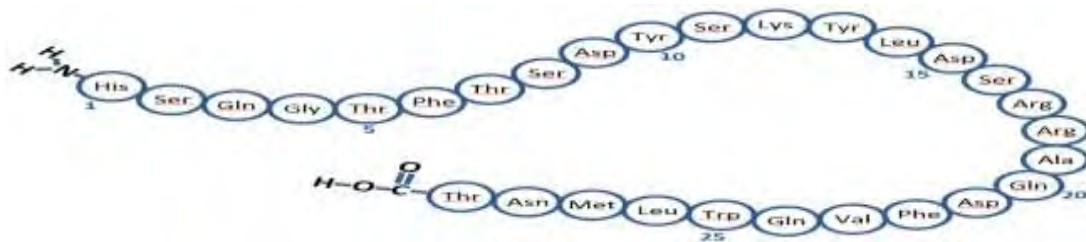




**Εικόνα 1.11:** Τυπικές διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων της γλυκόζης και της ινσουλίνης στο αίμα υγιούς ατόμου κατά τη διάρκεια της μέρας.

### 1.3.3 Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη είναι ορμόνη η οποία αποτελείται από 29 αμινοξέα (Εικόνα 1.12). Συντίθεται και εκκρίνεται από τα α-κύτταρα του παγκρέατος. Τα ερεθίσματα για την έκκρισή της, αλλά και τα αποτελέσματα της δράσης της είναι εκ διαμέτρου αντίθετα εκείνων της ινσουλίνης. Η έκκρισή της διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης γλυκόζης του αίματος (υπογλυκαιμία) και ενισχύεται από ορισμένα αμινοξέα των τροφών. Ενισχύεται επίσης από τη μυϊκή δραστηριότητα γιατί κατά τη διάρκεια της αυξάνεται η κατανάλωση της γλυκόζης του αίματος. Αντίθετα, η έκκριση γλυκαγόνης αναστέλλεται, όταν το σάκχαρο του αίματος είναι αυξημένο.<sup>(1,3)</sup>



**Εικόνα 1.12:** Αμινοξική σύσταση γλυκαγόνης

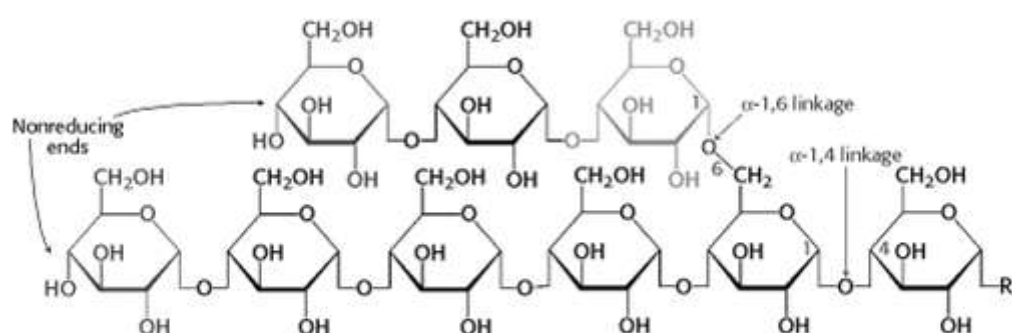
Συγκεκριμένα η γλυκαγόνη:

- Διασπά το αποταμιευμένο στους ήπαρ και στους μύες γλυκογόνο και το μετατρέπει σε γλυκόζη (γλυκονόλυση) με αποτέλεσμα να αυξάνει τη στάθμη της γλυκόζης στο αίμα.
- Προωθεί τη διαδικασία της γλυκονεογένεσης, της μετατροπής δηλαδή στο ήπαρ των αμινοξέων σε γλυκόζη, αυξάνοντας έτσι περαιτέρω τη στάθμη της γλυκόζης του αίματος.
- Επιπλέον, ενεργοποιεί τη λιπόλυση στους λιπώδεις ιστούς με αποτέλεσμα την αποδέσμευση λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία και την παραγωγή ενέργειας.<sup>(1,3)</sup>

## 2.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

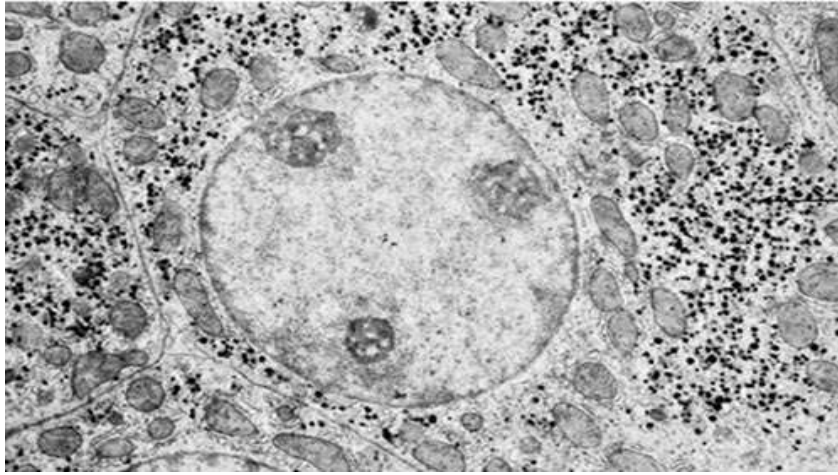
### 2.1 Το γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι μια άμεσα κινητοποιημένη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Είναι ένα μεγάλο, διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει γλυκόζη όταν χρειάζεται ενέργεια. Τα κατάλοιπα γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς  $\alpha$ -1,4. Σε κάθε δέκατο κατάλοιπο γλυκόζης σχηματίζονται διακλαδώσεις με γλυκοζιτικό δεσμό  $\alpha$ -1,6 (Εικόνα 2.1). Οι γλυκοζιτικοί δεσμοί  $\alpha$  σχηματίζουν ελικοειδή πολυμερή, ενώ από τους δεσμούς  $\beta$  προκύπτουν σχεδόν ευθείες αλυσίδες οι οποίες σχηματίζουν δομικά ινίδια, όπως στην κυτταρίνη.<sup>(3)</sup>



**Εικόνα 2.1:** Δομή γλυκογόνου: Δομή δύο αλυσίδων ενός μορίου γλυκογόνου, όπου τα μόρια της  $\alpha$ -D-γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό και  $\alpha$ -1,6 στις διακλαδώσεις. Με RS συμβολίζεται το υπόλοιπο μόριο γλυκογόνου.

Το γλυκογόνο δεν είναι τόσο πλούσιο σε ενέργεια όσο τα λιπαρά οξέα και αυτό γιατί δεν είναι τόσο ανηγμένο. Παρ' όλα αυτά, το γλυκογόνο είναι ένα πολύ σημαντικό απόθεμα καύσιμων μορίων για διάφορους λόγους. Αρχικά, ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων και με αυτόν τον τρόπο, το γλυκογόνο ρυθμίζει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Ο ρόλος αυτός είναι πολύ σημαντικός, διότι η γλυκόζη είναι το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιείται από τον εγκέφαλο, εκτός από την περίπτωση παρατεταμένης ασιτίας. Επίσης, η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Επιπλέον, η απελευθερούμενη γλυκόζη μπορεί να προμηθεύει ενέργεια ακόμα και απουσίας οξυγόνου και έτσι μπορεί να δίνει ενέργεια σε αναερόβιες δραστηριότητες, εν αντιθέσει με τα λιπαρά οξέα.<sup>(3)</sup>



**Εικόνα 2.2:** Ηλεκτρονιομικρογραφία ενός ηπατικού κυττάρου. Διακρίνονται τα κοκκία γλυκογόνου ως πυκνά σωματίδια στο κυτταρόπλασμα

Το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες είναι οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ από τους μύς (10% - 2% κατά βάρος), αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύς σαν σύνολο, λόγω της μεγαλύτερης μάζας τους. Το γλυκογόνο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή κοκκίων με διάμετρο από 10 έως 40 nm (Εικόνα 2.2). Στο ήπαρ, η σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού. Ο ρόλος του γλυκογόνου στους σκελετικούς μύες είναι η γρήγορη παροχή ενέργειας για τη μυική συστολή. Τα κοκκία γλυκογόνου περιέχουν τα ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση και αποικοδόμησή του.

### **2.1.1 Μεταβολισμός του γλυκογόνου**

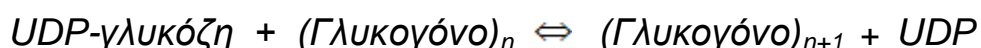
Η σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι σχετικά απλές βιοχημικές διεργασίες. Η αποικοδόμηση αρχικά συνίσταται σε τρία βήματα: απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο, ανακατασκευή του υποστρώματος γλυκογόνου για νέα αποικοδόμηση και μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό. Η 6-φωσφορική γλυκόζη που προέρχεται από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, ακολουθεί τρεις κατευθύνσεις. Είναι το αρχικό υπόστρωμα για τη γλυκόλυση, υφίσταται επεξεργασία με την πορεία των φωσφορικών πεντοζών προς απόδοση NADPH και παράγωγων της ριβόζης και μετατρέπεται σε ελεύθερη γλυκόζη προς απελευθέρωση στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτή η μετατροπή λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερη ένταση στο έντερο και τους νεφρούς.<sup>(3)</sup>

### **2.1.2 Σύνθεση του γλυκογόνου**

Για να ξεκινήσει η σύνθεση του γλυκογόνου είναι απαραίτητο ένα εναρκτήριο μόριο (εκκινήτης), πάνω στο οποίο προσθέτει αλυσίδες ολιγοσακχαριτών η

συνθετάση του γλυκογόνου. Η συνθετάση του γλυκογόνου είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει εναν ολιγοσακχαρίτη αποτελούμενο από κατάλοιπα α-1,4 γλυκόζης, το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένα φαινολικό άτομο οξυγόνου ενός μορίου τυροσίνης.<sup>(3)</sup>

Η σύνθεση του γλυκογόνου χρειάζεται μια ενεργοποιημένη μορφή της γλυκόζης, την ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη), η οποία παράγεται από την αντίδραση της UTP και της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η UDP- γλυκόζη προστίθεται στο μη αναγωγικό άκρο των μορίων γλυκογόνου. Η αντίδραση της σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την συνθετάση του γλυκογόνου είναι η εξής:<sup>(3)</sup>



Η συνθετάση του γλυκογόνου μεταφέρει μόρια γλυκόζης από την UDP-γλυκόζη σε μία αλυσίδα α-1,4 πολυγλυκόζης δημιουργώντας α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς με ελάχιστο αριθμό μορίων ίσο με τέσσερα. Στη συνέχεια, το ένζυμο γλυκανο-1,6-τρανσφεράση (ένζυμο διακλάδωσης) δημιουργεί τους α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το ένζυμο διακλάδωσης μεταφέρει μια αλυσίδα 6-7 καταλοίπων γλυκόζης από τον α-1,4 δεσμό και τη συνδέει στο υδροξύλιο μιας γλυκοζυλικής ομάδας στο εσωτερικό του μορίου. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μια διακλάδωση, ούτως ώστε η συνθετάση του γλυκογόνου να συνεχίσει να επιμηκύνει την αλυσίδα.<sup>(3)</sup>

### 2.1.3 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου για να προμηθεύσει 6-φωσφορική γλυκόζη και περαιτέρω μεταβολισμό χρειάζεται τέσσερις ενζυμικές δραστηριότητες: μια για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, δύο για να ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο, ούτως ώστε να παραμείνει ένα υπόστρωμα για αποικοδόμηση και μια για τη μετατροπή του προϊόντος του καταβολισμού του γλυκογόνου σε μια μορφή κατάλληλη για περαιτέρω μεταβολισμό.<sup>(3)</sup>

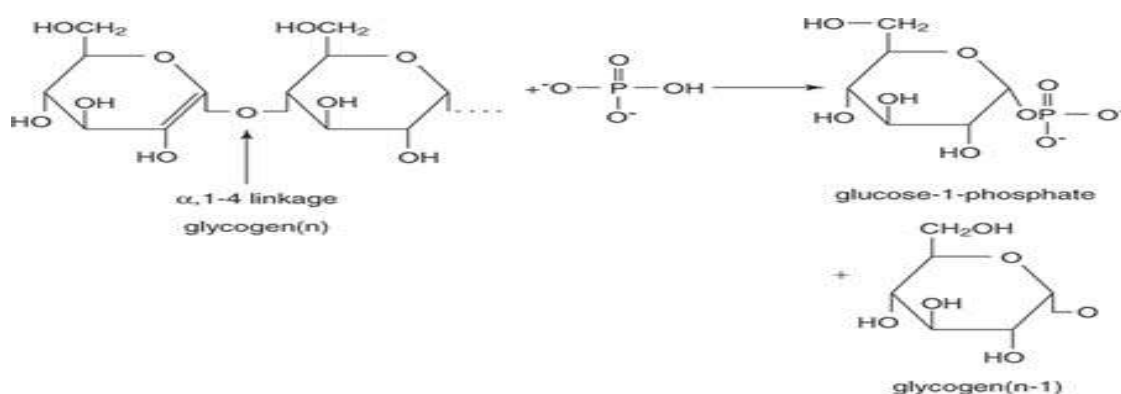
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (**GP**), είναι το καθοριστικό ένζυμο για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και αυτό γιατί καταλύει τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου, μέσω προσθήκης του ορθοφωσφορικού Pi, για απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση. Η ενδοκυτταρική αποικοδόμηση του γλυκογόνου ακολουθεί την εξής πορεία:



Η φωσφορυλάση καταλύει την διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ C-1 του τελικού καταλοίπου και C-4 του γειτονικού διασπάται από το ορθοφωσφορικό Pi. Ο δεσμός μεταξύ του ατόμου άνθρακα C-1 και του γλυκοζιτικού ατόμου οξυγόνου διασπάται από το Pi και η διαμόρφωση α στον C-1 διατηρείται (Εικόνα 2.3). Η 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P) που απελευθερώνεται από το γλυκογόνο μπορεί γρήγορα να μετατραπεί σε 6-φωσφορική γλυκόζη (Glc-6-P), ένα σημαντικό μεταβολικό ενδιάμεσο, με το ένζυμο φωσφογλυκομουτάση. Η αντίδραση που καταλύεται από τη GP είναι

αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την Glc-1-P είναι 3.6.<sup>(3)</sup>

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο, το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου.<sup>(3)</sup>



**Εικόνα 2.3:** Αντίδραση καταβολισμού του γλυκογόνου.

Η φωσφορυλίωση του γλυκογόνου σταματά τη διάσπαση των δεσμών α-1,4, όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων γλυκόζης από το σημείο της διακλάδωσης, καθώς οι γλυκοζιτικοί δεσμοί α-1,6 δεν διασπώνται από τη GP. Ένα στα δέκα κατάλοιπα γλυκόζης βρίσκονται σε διακλάδωση, επομένως η αποικοδόμηση του γλυκογόνου από την GP θα σταματήσει μετά την απελευθέρωση έξι μορίων γλυκόζης ανά διακλάδωση. Για να συνεχιστεί ο καταβολισμός του γλυκογόνου, δύο επιπλέον ένζυμα, ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο.

Τα ένζυμα αυτά είναι μια μεταφοράση και μια γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6. Η μεταφοράση μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη. Η μεταφορά αυτή αφήνει εκτεθειμένο ένα κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6. Η γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6 (ένζυμο αποδιακλάδωσης, υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης. Το ελεύθερο μόριο γλυκόζης στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται με το γλυκολυτικό ένζυμο εξοκινάση. Έτσι η διακλαδισμένη μορφή του γλυκογόνου μετατρέπεται σε γραμμική επιτρέποντας έτσι στην GP για περαιτέρω διάσπαση.<sup>(3)</sup>

### **2.1.4 Ρύθμιση μεταβολισμού του γλυκογόνου**

Η ρύθμιση της σύνθεσης και της αποικοδόμησης του γλυκογόνου περιλαμβάνει διάφορα ένζυμα που αποκρίνονται αλλοστερικά σε μεταβολίτες που σηματοδοτούν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Αυτές οι αλλοστερικές αποκρίσεις επιτρέπουν τη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας ώστε να ικανοποιεί τις ανάγκες του κυττάρου στο οποίο τα ένζυμα εκφράζονται.<sup>(3)</sup>

Εκτός των αλλοστερικών αποκρίσεων, ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται επίσης από ορμονικά διεγερόμενους καταρράκτες, οι οποίοι οδηγούν σε αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των ενζύμων που αλλάζει τις κινητικές τους ιδιότητες. Η ρύθμιση από ορμόνες επιτρέπει στον μεταβολισμό του γλυκογόνου να προσαρμόζεται στις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού. Με τους δύο αυτούς μηχανισμούς, ο καταβολισμός του γλυκογόνου ενοποιείται με τη σύνθεση του.<sup>(3)</sup>

## **2.2 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP)**

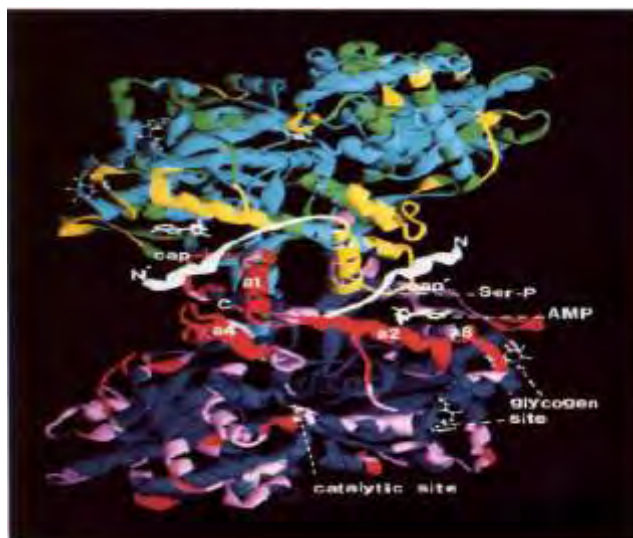
### **2.2.1 Γενικά**

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) (*Εικόνα 2.4*) είναι από τα πιο διαδεδομένα φωσφορολυτικά ένζυμα. Η GP είναι ένα ρυθμιστικό ένζυμο που καταλύει το πρώτο στάδιο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου για να δώσει 1-P γλυκόζη. Ανήκει στην τάξη των τρανσφερασών και πιο συγκεκριμένα στην τάξη των γλυκοζυλοτρανσφερασών και η συστηματική της ονομασία είναι 1,4-α-D-γλυκο:φωσφορικό α-D γλυκοτρανσφεράση. Υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου στον οργανισμό: του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Στους μύες, η 1-P γλυκόζη χρησιμοποιείται για την παραγωγή μεταβολικής ενέργειας μέσω γλυκόλυσης. Στο ήπαρ, η 1-P γλυκόζη κυρίως μετατρέπεται από φωσφογλυκομουτάση και 1-P φωσφατάση σε ελεύθερη γλυκόζη, η οποία απελευθερώνεται προς όφελος άλλων ιστών και ιδίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα όπου η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή καυσίμου.<sup>(4)</sup>

Η GP είναι το τρίτο ένζυμο του καταρράκτη αποικοδόμησης του γλυκογόνου. Είναι ομοδιμερές και εξαρτά τη δραστηριότητα του από τη φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου Ser14 (Thr10 στη φωσφορυλάση από ζύμη) από το ένζυμο PhK (κινάση φωσφορυλάσης) ή από την πρόσδεση του αλλοστερικού ενεργοποιητή AMP. Ωστόσο, εάν η φωσφορυλίωση του ενζύμου πραγματοποιηθεί απουσία γλυκογόνου, σχηματίζεται ανενεργό ομοτετραμερές στο οποίο παρεμποδίζεται στερεοχημικά η πρόσβαση γλυκογόνου στην καταλυτική περιοχή, εφόσον τα δυο ομοδιμερή διευθετούν τις καταλυτικές τους περιοχές απέναντι.<sup>(4)</sup>

Η GP ήταν το πρώτο αλλοστερικό ένζυμο που ανακαλύφθηκε. Το επίτευγμα αυτό ήταν ένα από τα πολλά επίτευγματα ορόσημο και πραγματοποιήθηκε

από τους Carl και Gerty Cori. Το 1943, με τη βοήθεια του Arda Green, οι δύο επιστήμονες ανακάλυψαν ότι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, υπήρχε είτε στην α ή στη β μορφή ανάλογα με την κατάσταση φωσφορυλίωσης του, καθώς και στις καταστάσεις R και T με βάση την παρουσία του AMP.<sup>(18)</sup>



**Εικόνα 2.4:** Κρυσταλλική δομή φωσφορυλάσης του γλυκογόνου όπου υποδεικνύονται οι ρυθμιστικές θέσεις Ser(P) και AMP.<sup>(23)</sup>

### 2.2.3 Δομή GP

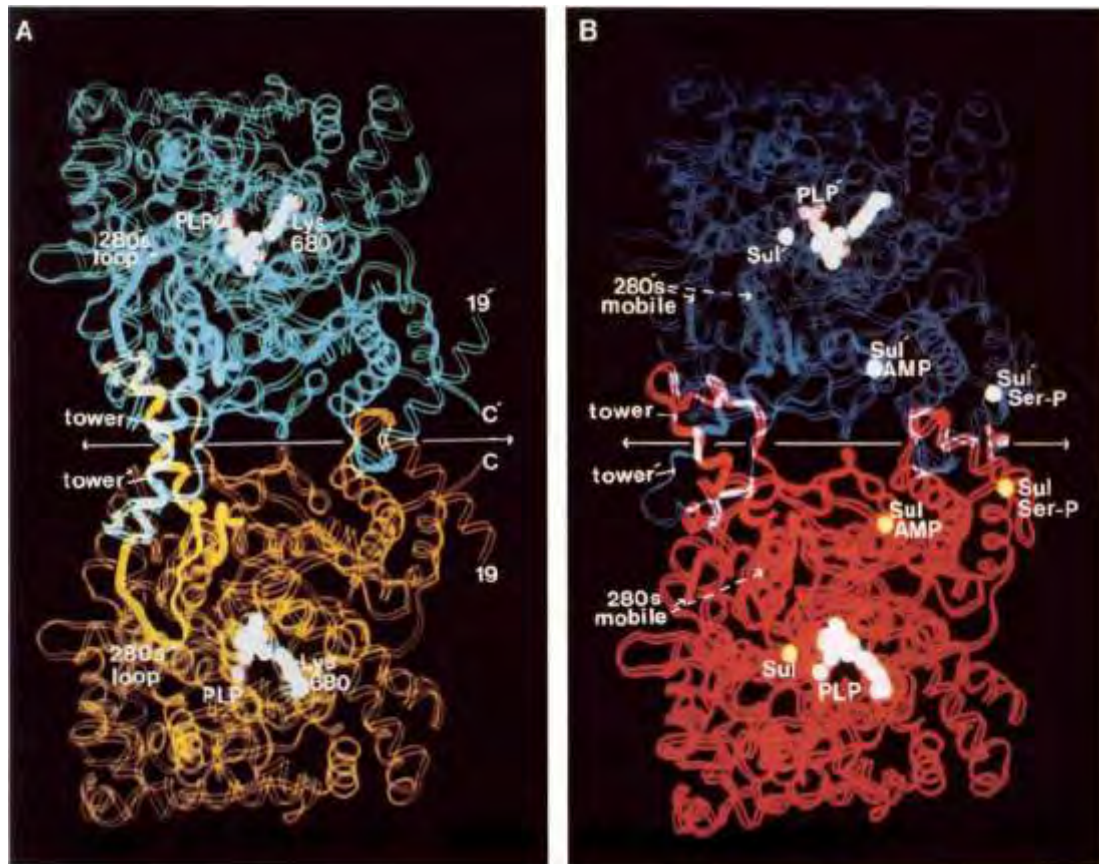
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα διμερές που αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες των 97 KDa. Κάθε υπομονάδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε μια αμινο-τελική δομική περιοχή (480 κατάλοιπων) και περιέχει μια θέση πρόσδεσης γλυκογόνου και μια καρβοξυ-τελική δομική περιοχή (360 κατάλοιπα). Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται σε μια βαθιά σχισμή που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα των αμινο- και καρβοξυ-τελικών δομικών περιοχών.<sup>(3)</sup>

Η GP είναι επίσης αλλοστερικό ένζυμο που υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέψιμες μορφές, GPb (χαμηλή δραστηριότητα, χαμηλή συγγένεια υποστρώματος, κυρίως σε T διαμόρφωση) και GPa (υψηλή δραστηριότητα, υψηλή συγγένεια υποστρώματος, κυρίως σε R διαμόρφωση). Η GP ρυθμίζεται από αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις και αντίστροφη φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλάση b (GPb), η μορφή του ενζύμου που βρέθηκε σε χαλαρούς μυς, απαιτεί AMP για την δραστηριότητά της και αναστέλλεται από 6-P- γλυκόζη και ATP. Το ένζυμο εμφανίζει ομοτροπικό αποτελέσματα (αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών για ταυτόσημες συνδέσεις) τόσο για υπόστρωμα όσο και AMP και αμοιβαία ετεροτροπικά αποτελέσματα (αλληλεπιδράσεις μεταξύ θέσεων για διαφορετικές συνδέσεις). Η κύρια οδός για φυσιολογική ενεργοποίηση γίνεται με ορμονική ή νευρική μετατροπή διέγερσης σε φωσφορυλάση με φωσφορυλίωση κινάσης,

καταλυόμενη από ένα απλό κατάλοιπο σερίνης, Ser-14. Η Φωσφορυλάση α (GP<sub>a</sub>) είναι ενεργός απουσία του AMP αν και το δεσμευμένο υπόστρωμα παραμένει να έχει συνεργιστική δράση. Η δραστηριότητα μπορεί να αυξηθεί κατά 10% από το AMP.<sup>(3)</sup>

Η σύγκριση των δομών GP<sub>a</sub> και GP<sub>b</sub> στην T διαμόρφωση απεκάλυψε τις δομικές μεταβολές που αντιπροσωπευτούν το πρώτο στάδιο της ενεργοποίησης με φωσφορυλίωση. Μία σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο δομές είναι η διάταξη των αμινοξέων του N-τελικού άκρου (κατάλοιπα 5-16) τα οποία είναι αποδιατεταγμένα στη GP<sub>b</sub> καθώς και η ταυτόχρονη αποδιάταξη των καταλοίπων του C-τελικού άκρου (κατάλοιπα 838-842). Κατά τη μετατροπή της φωσφορυλάσης b σε A, το N-τελικό άκρο αναδιπλώνεται σε μία παραμορφωμένη έλικα 3<sub>10</sub> και η Ser(P)-13 με τις Arg-69 από τη ίδια υπομονάδα, και με την Arg-43' από την συμμετρική υπομονάδα. Οι αλληλεπιδράσεις της Ser(P)-14 με της Arg-69, Arg-43', Val-15 και Gln-72 αποτελούν το έναυσμα για τη δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο υπομονάδων στις οποίες συμμετέχουν κατάλοιπα απόμακρυσμένα από το κέντρο της Ser-14. Τα αμινοξέα Ile-13 και Val-15 βρίσκονται εκατέρωθεν του κέντρου φωσφορυλίωσης και είναι "θαμμένα" σε κοιλότητες μαζί με μη πολικές ομάδες από τις πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων της έλικας α2. Η Arg-16 στη φωσφορυλάση α καταλαμβάνει τη θέση που έχει η Glu-839 στη φωσφορυλάση b. Η θέση που κατέχεται από την Arg-43' στη φωσφορυλάση b καταλαμβάνεται από την Arg-10 του N-τελικού άκρου στη φωσφορυλάση α. Η στροφή της Arg-43' δημιουργεί μια υδρόφοβη κοιλότητα στην οποία εισχωρεί η Ile-13. Η μεταβολή αυτή επηρεάζει την His-36' και ακολούθως τη γέφυρα άλατος μεταξύ της His-36' και του Asp-838, η οποία αποσυνδέεται, όπως και την έλικα α2 βοηθώντας στο σχηματισμό ενός κέντρου σύνδεσης με μεγάλη συγγένεια για το AMP στη φωσφορυλάση α. Στη φωσφορυλάση b η έλικα α2 είναι μερικώς ξετυλιγμένη στα αμινοξέα 65 και 66 με αποτέλεσμα να μετατοπίζεται κατά 0.8 Å σε σχέση με τη φωσφορυλάση α. Έτσι οι Gln-72 και Tyr-75 στην έλικα αυτή έχουν διαφορετικές διαμορφώσεις στη φωσφορυλάση α από ό,τι στη φωσφορυλάση b και μπορούν να κάνουν περισσότερες αλληλεπιδράσεις με το AMP στη φωσφορυλάση α. Παρόμοια, τα αμινοξέα του cap Asp-42' και Asn-44' στρέφονται ελαφρά εξαιτίας της μετακίνησης της Arg-43' και μπορούν να αλληλεπιδρούν καλύτερα με το AMP στη φωσφορυλάση α. Οι κινήσεις της έλικας α2 έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαμόρφωσης της Gln-71. Στη φωσφορυλάση b το αμινοξύ αυτό, αλληλεπιδρά με τον αναστολέα G-6-P, ενώ στην φωσφορυλάση α η διαφορετική διαμόρφωση του αμινοξέος αυτού εμποδίζει την πρόσβαση στο κέντρο σύνδεσης του αναστολέα. Έτσι μπορεί να δοθεί μια δομική εξήγηση για την απώλεια της ανασταλτικής δράσης της G-6-P στη φωσφορυλάση α. Γενικά, η φωσφορυλίωση της Ser-14 προάγει περισσότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων που οδηγούν στην αύξηση της συγγένειας του ενζύμου για το AMP και στην παρεμπόδιση της σύνδεσης της G-6-P (Sprang et al, 1988).



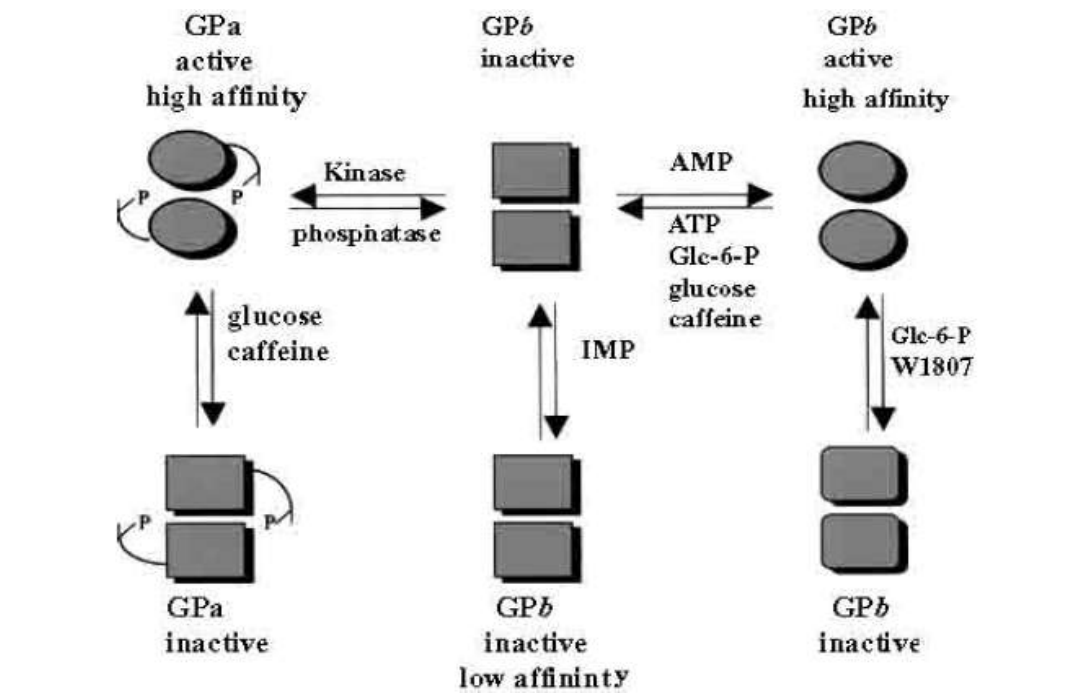


**Εικόνα 2.5:** (A) GPb σε T διαμόρφωση (κίτρινο και γαλάζιο) και (B) R διαμόρφωση GPb (κόκκινο και σκούρο μπλε). Το θειϊκό ιόν φαίνεται να δεσμεύεται στα κέντρα σύνδεσης της Ser(P), του AMP, και στο καταλυτικό κέντρο της GPb της R διαμόρφωσης. Η Lys-680 και η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) διακρίνονται στην T και R GPb. Διακρίνονται οι έλικες και ο βρόχος 280s (κατάλοιπα 262-290), καθώς και τα κατάλοιπα 160-165. Στη μετάβαση από T σε R, η μία υπομονάδα (με σκούρο μπλε) περιστρέφεται κατά  $10^\circ$  σε σχέση με την άλλη υπομονάδα. <sup>(23)</sup>

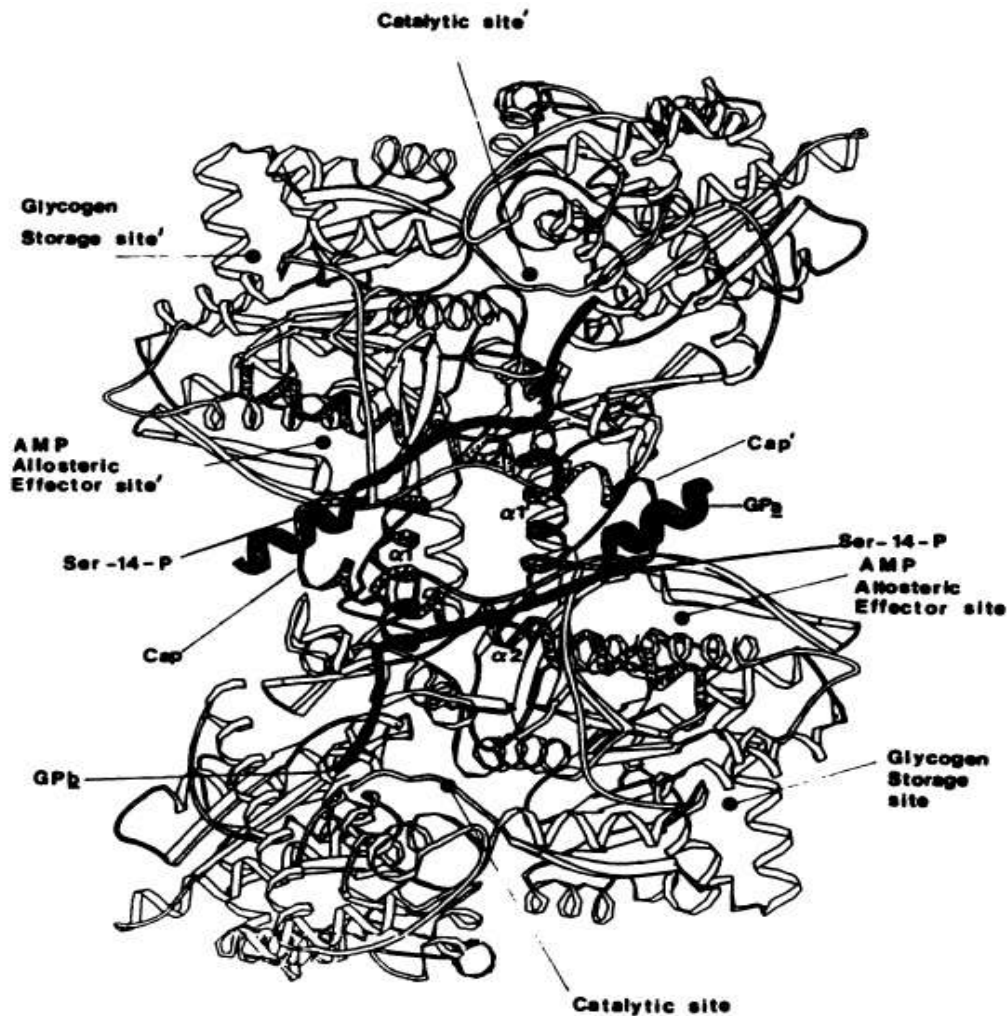
Μελέτες με τη χρήση περίθλασης ακτίνων Χ, έχουν δείξει διαμορφωτικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα μετά την ενεργοποίηση του ενζύμου των μυών και τη μετατροπή του από την T προς R διαμόρφωση με φωσφορυλίωση του AMP. Από την T στην R διαμόρφωση, οι διαρθρωτικές αλλαγές του τετραμερούς αντιπροσωπεύονται από μια περιστροφή της κάθε υπομονάδας κατά  $5^\circ$  γύρω από έναν άξονα τοποθετημένο κοντά στην επιφάνεια. <sup>(23)</sup>

Στην φυσιολογική T διαμόρφωση του ενζύμου, δεν υπάρχει πρόσβαση από την καταλυτική θέση στην επιφάνεια. Η πρόσβαση σε αυτή την περιοχή είναι

μερικώς φραγμένη από τον βρόχο 280s (κατάλοιπα 282 έως 286) στην T-διαμόρφωση του ενζύμου. Κατά τη μετάβαση από την T διαμόρφωση στην R, ο βρόχος 280s αποδιατάσσεται και εκτοπίζεται, ανοίγοντας έτσι ένα κανάλι που επιτρέπει στην κρίσιμη Αργινίνη, Arg569, να εισέλθει στην καταλυτική περιοχή, στη θέση του Asp283 και να δημιουργήσει τη θέση αναγνώρισης για το ορθοφωσφορικό ιόν. Το γεγονός αυτό παρέχει επίσης πρόσβαση στο υπόστρωμα γλυκογόνου να φτάσει στην καταλυτική θέση. Με την ίδια διαδικασία, η αλλαγή και αποδιάταξη του βρόχου 280s, συνδέεται με αλλαγές στις υπομονάδες του διμερούς που προκαλούν αλλοστερικές επιδράσεις.<sup>(25)</sup>



**Εικόνα 2.7:** Σχηματική αναπαράσταση των αλλοστερικών μεταπτώσεων της φωσφορυλάσης γλυκογόνου. T, T' και R καταστάσεις εμφανίζονται ως τετράγωνα, στρογγυλά τετράγωνα και κύκλους, αντίστοιχα.<sup>(25)</sup>



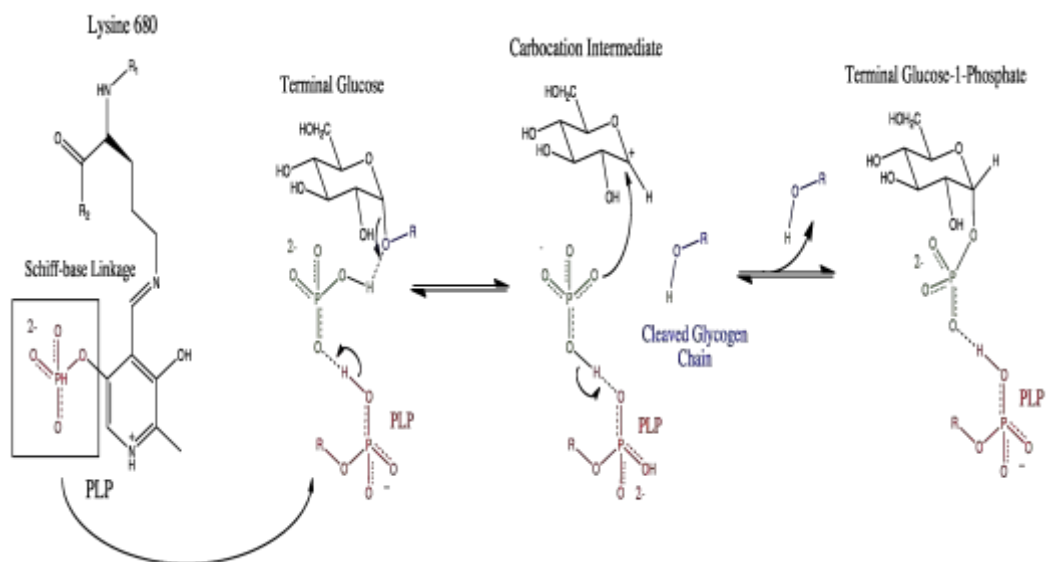
**Εικόνα 2.8:** Σχηματικό διάγραμμα του διμερούς φωσφορυλάσης γλυκογόνου. Η πρόσβαση στην καταλυτική θέση γίνεται από τη μακριά πλευρά του μορίου, και τις έλικες που σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα. Το διάγραμμα δείχνει τη σημαντική αλλαγή στη διαμόρφωση των αμινο-τελικών καταλοίπων στη φωσφορυλίωση. Τα κατάλοιπα 10-23 της GPβ εμφανίζονται ως μια παχιά γραμμή. Μετά την φωσφορυλίωση, τα κατάλοιπα 10-23 έχουν αλλαγή στη διαμόρφωσή τους και εμφανίζονται με σκοτεινή διαγράμμιση με τη θέση της Ser14-P να υποδεικνύεται στην μέσω-διεπαφή. Η αλλοστερική θέση σύνδεσης AMP βρίσκεται ανάμεσα στην έλικα α2 και την περιοχή του Cap στην άλλη υπομονάδα. Η θέση αποθήκευσης του γλυκογόνου βρίσκεται στην επιφάνεια της υπομονάδας και συνδέεται με μία μακρά α-έλικα. Η καταλυτική θέση είναι στο κέντρο της υπομονάδας όπου συγκλίνουν οι δύο επικράτειες.<sup>(22)</sup>

#### **2.2.4 Βιολογικός ρόλος GP**

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη, γεγονός που λαμβάνει χώρα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Εκεί, τα υποστρώματα γλυκογόνου και

ορθοφωσφορικού ανιόντος έρχονται σε επαφή, ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H<sub>2</sub>O.

Τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε-αμινομάδα της λυσίνης 680(Lys 680) (Εικόνα 2.9). Σύμφωνα με μελέτες του μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης, φαίνεται ότι το συνένζυμο δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση.<sup>(17)</sup>

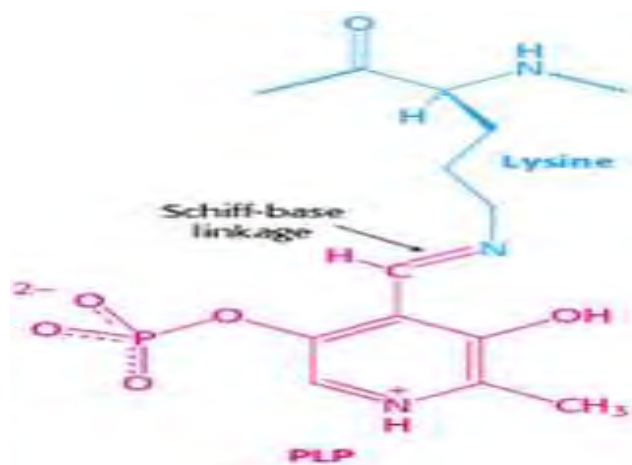


**Εικόνα 2.9:** Αντίδραση μετατροπής γλυκογόνου σε 1-φωσφορική-α-D-γλυκόζη από την GP.

### 2.2.5 Φωσφορική Πυριδοξάλη (PLP)

Μια ιδιαίτερη πρόκληση που έχει να αντιμετωπίσει η GP, είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά μάλλον παρά υδρολυτικά, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση του ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο. Διάφορες ενδείξεις παρέχουν πληροφορίες γύρω από τον μηχανισμό με τον οποίο η GP επιτυγχάνει τον αποκλεισμό του νερού. Τόσο το υπόστρωμα γλυκογόνου όσο και η παραγόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Μια άμεση προσβολή της φωσφορικής ομάδας στον

C-1 ενός σακχάρου θα ανέστρεφε τη διαμόρφωση στον άνθρακα αυτό, διότι η αντίδραση θα προχωρούσε μέσω μιας μεταβατικής κατάστασης. Επειδή η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α παρά β, απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων. Η πιο πιθανή εξήγηση για τα αποτελέσματα αυτά είναι ότι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν.<sup>(3)</sup>



**Εικόνα 2.10:** Δεσμός βάσης Schiff της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP). Η PLP (ροζ) σχηματίζει βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (γαλάζιο) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης.

Μια άλλη εξήγηση είναι ότι η GP χρειάζεται φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), ένα παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B<sub>6</sub>). Η αλδεϋδική ομάδα του συνενζύμου αυτού σχηματίζει μια βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα μια συγκεκριμένης Lys του ενζύμου (Εικόνα 2.10). Τα αποτελέσματα δομικών μελετών υποδηλώνουν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μια θέση μεταξύ της 5'-P της PLP και του υποστρώματος γλυκογόνου. Η 5'-P ομάδα της PLP δρα μαζί με ορθοφωσφορικό λειτουργώντας ως δότης πρωτονίων και στη συνέχεια ως δέκτης (οξεοβασικός καταλύτης).<sup>(3)</sup> Το ορθοφωσφορικό με τη μορφή HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο, που είναι συνδεδεμένο στον C-4 της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου και ταυτόχρονα προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό προς σχηματισμό φωσφορικής γλυκόζης δεσμού α-1, με την επακόλουθη επιστροφή ενός ατόμου υδρογόνου στην PLP. Ο ρόλος της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορικής διάσπασης δικαιολογείται από την απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο <sup>(3)</sup>.

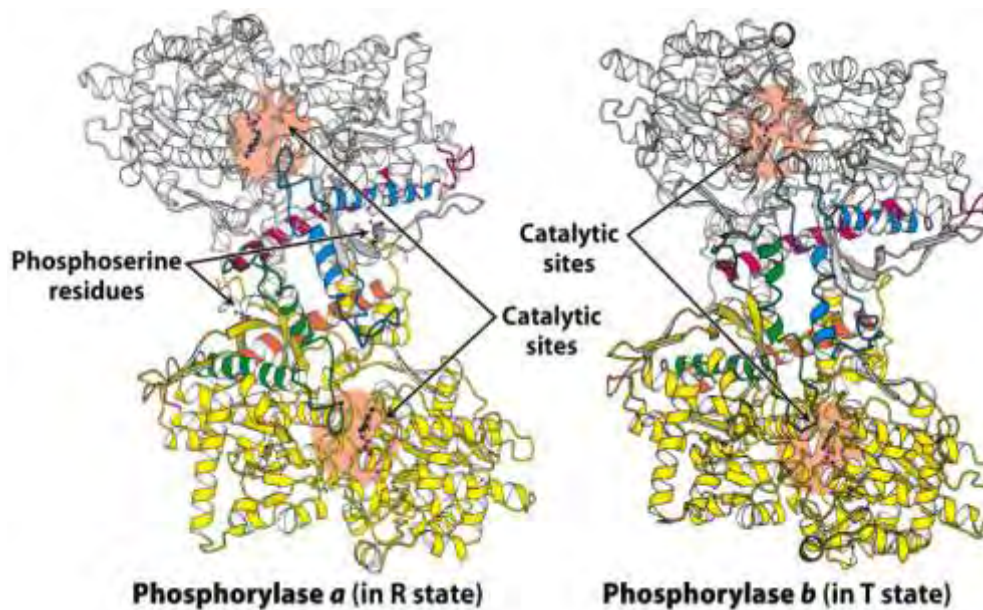
### **2.2.6 Ρύθμιση GP**

Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ελέγχεται με πολλούς μηχανισμούς και ο έλεγχος αυτός επικεντρώνεται στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Πολλοί αλλοστερικοί τελεστές ρυθμίζουν την GP και σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, όπως επίσης με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση, σε απόκριση προς ορμονικά σήματα, όπως της ινσουλίνης, επινεφρίνης και της γλυκαγόνης.

Στους σκελετικούς μυς η GP, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: μια συνήθως ενεργό φωσφορυλάση a και μια ενεργό φωσφορυλάση b. Αυτές οι μορφές βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ ενεργού χαλαρής κατάστασης R (Relaxed) και μιας λιγότερο ενεργής κατάστασης T (Tense). Η μορφή a διαφέρει από την b σε μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η b μπορεί να μετατραπεί σε a όταν φωσφορυλιώνεται σε ένα απλό κατάλοιπο Ser14 σε κάθε υπομονάδα. Το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση. Αυξημένα επίπεδα της επινεφρίνης (λόγω έντονης άσκησης ή φόβου) και η ηλεκτρική διέγερση των μυών έχουν ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του ενζύμου στη μορφή της φωσφορυλάσης a.<sup>(3)</sup>

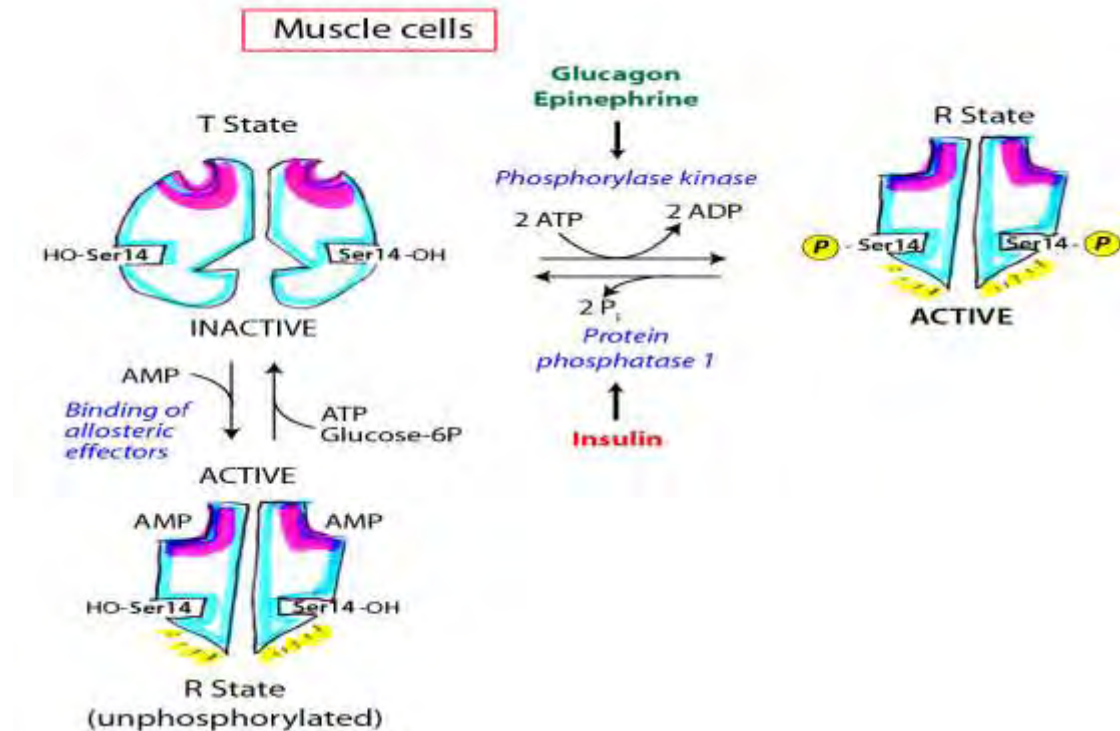
Η σύγκριση των δομών της φωσφορυλάσης a και b (*Εικόνα 2.11*), έδειξε ότι μικρές δομικές αλλαγές στις επιφάνειες επαφής των υπομονάδων μεταφέρονται στο ενεργό κέντρο. Η μετάβαση από την διαμόρφωση T στην διαμόρφωση R συνεπάγεται μια στροφή 10° γύρω από τον άξονα συμμετρίας δευτέρας τάξεως του διμερούς. Η μετάβαση αυτή προκαλεί αλλαγές στις α-έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Συνεπώς, η διαμόρφωση T είναι λιγότερο ενεργή λόγω παρεμπόδισης του καταλυτικού κέντρου, ενώ στην R είναι περισσότερο προσβάσιμο (το καταλυτικό κέντρο) και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη.<sup>(3)</sup>





**Εικόνα 2.11:** Δομή της φωσφορυλάσης *a* και *b*. Η GP*a* φωσφορυλιώνεται στη Ser14 κάθε υπομονάδας. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη δομή της ενεργού διαμόρφωσης R. Οι βρόχοι που είναι σημαντικοί στη ρύθμιση διακρίνονται (μπλε και κόκκινο), όπως και οι ρυθμιστικές δομές ( πορτοκαλί- πράσινο)

Η θέση ισορροπίας της GP*b* μεταξύ των καταστάσεων T και R ανταποκρίνεται στις συνθήκες του κυττάρου. Η μυϊκή φωσφορυλάση *b* είναι ενεργός μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της GP*b* στην κατάσταση R (Εικόνα 2.12). Το ATP δρα σαν αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP ευιώντας έτσι την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Η 6-φωσφορική γλυκόζη ευνοεί επίσης την κατάσταση T της GP*b*. Κάτω από τις περισσότερες φυσιολογικές συνθήκες η GP*b* είναι ανενεργός λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP και της 6-P φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η GP*a* είναι πλήρως ενεργός, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP, ATP και 6-P γλυκόζης. Στους μύς που βρίσκονται σε ηρεμία, σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή *b*. Η άσκηση επίσης οδηγεί στην απελευθέρωση ορμόνης η οποία προκαλεί τη δημιουργία της φωσφορυλιωμένης μορφής *a* του ενζύμου. Η απουσία φωσφατάσης της 6-P γλυκόζης στους μύς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-P γλυκόζης που παράγεται από γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια.

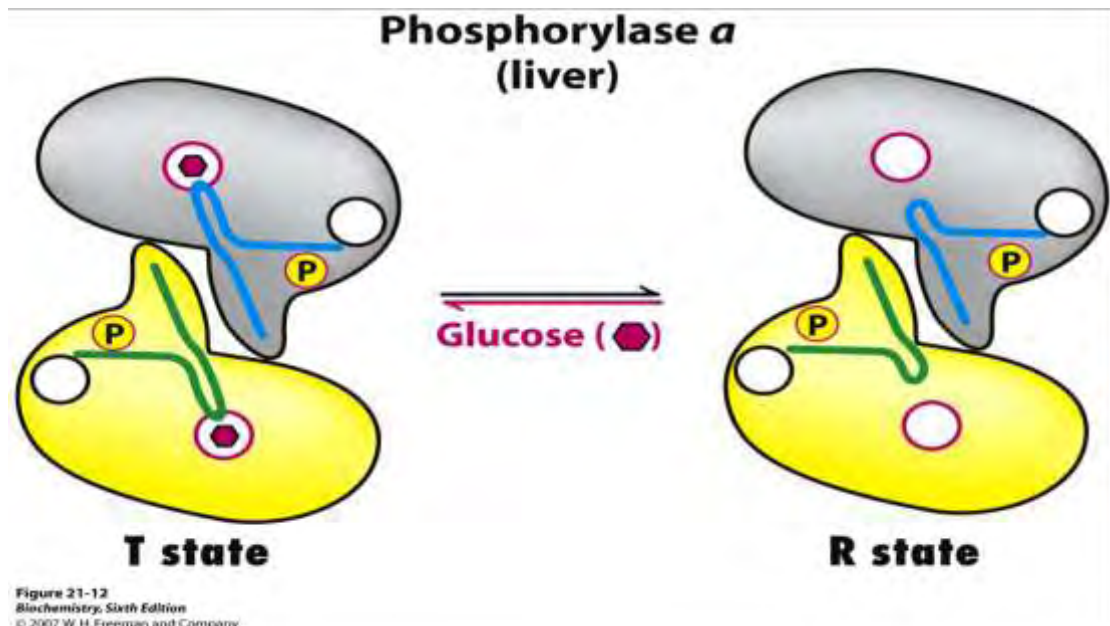


**Εικόνα 2.12:** Αλλοστερική ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης. Το χαμηλό ενεργειακό φορτίο, που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP, ευνοεί τη μετάβαση στη διαμόρφωση R.

Στο ήπαρ η ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από αυτή των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιοστασία της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Η ανθρώπινη ηπατική και μυϊκή φωσφορυλάση είναι κατά προσέγγιση 90% όμοιες στην αλληλουχία αμινοξέων. Οι διαφορές οδηγούν σε μικρές αλλά σημαντικές αλλαγές στη σταθερότητα των ποικίλων μορφών του ενζύμου.<sup>(3)</sup>

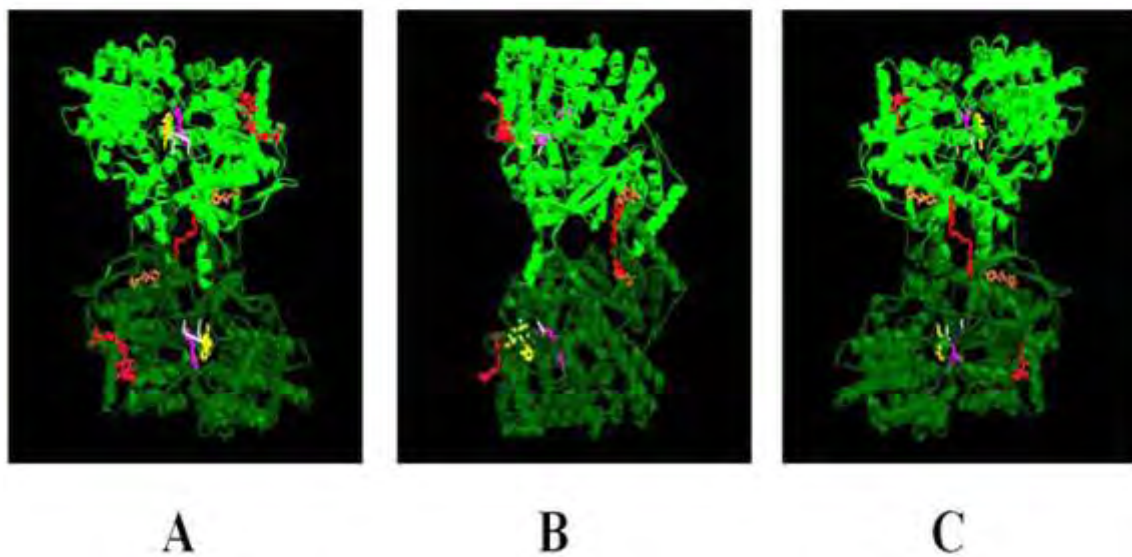
Εν αντιθέσει με τη μυϊκή, η ηπατική GPa και όχι η Grb παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την διαμόρφωση R στην T, απενεργοποιώντας το ένζυμο (Εικόνα 2.13). Ο ρόλος της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι η παραγωγή γλυκόζης για εξαγωγή στους άλλους ιστούς, όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλά. Επομένως, αν η ελεύθερη γλυκόζη προέρχεται από άλλες πηγές, όπως η τροφή, δεν υπάρχει ανάγκη κινητοποίησης γλυκογόνου. Εν αντιθέσει με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από AMP, καθώς το ήπαρ δεν υφίσταται μεγάλες αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο.<sup>(3)</sup>





**Εικόνα 2.13:** Αλλοστερική ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης. Η πρόσδεση της γλυκόζης στη φωσφορυλάση *a* μετατοπίζει την ισορροπία προς τη διαμόρφωση T και απενεργοποιεί το ένζυμο. Επομένως, το γλυκογόνο δεν κινητοποιείται και τα επίπεδα γλυκόζης αυξάνονται.

### 2.2.7 Καταλυτικό Κέντρο - Αλλοστερικό Κέντρο - Κέντρο Αναστολής - Κέντρο Αποθήκευσης



**Εικόνα 2.14:** Θέσεις του καταλυτικού κέντρου (μπλε), αλλοστερικού κέντρου (πράσινο), το κέντρο αναστολής (κίτρινο), το κέντρο αποθήκευσης (ανοιχτό κόκκινο) και το νέο αλλοστερικό κέντρο (κόκκινο) <sup>(34)</sup>.

### Καταλυτικό Κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο είναι μια βαθιά κοιλότητα που βρίσκεται στο κέντρο του μορίου, 15 Å από την επιφάνεια της πρωτεΐνης, καθώς και κοντά στον απαραίτητο συμπαράγοντα της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP). Στην πραγματικότητα, η ανάπτυξη αναστολέων αναλόγων γλυκόζης ως πιθανά αντιδιαβητικά φάρμακα υπήρξε το επίκεντρο πολλών προσπαθειών για να βρεθούν νέες ενώσεις που θα επιτρέψουν τη διαφοροποίηση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Η τρισδιάστατη δομή της T- διαμόρφωσης της GPb σε σύμπλοκο με α-D-γλυκόζη, έχει χρησιμοποιηθεί ως το σημείο εκκίνησης για το σχεδιασμό και τη σύνθεση μιας σειράς αναλόγων της γλυκόζης, αναστολείς που δεσμεύονται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Κατά το σχεδιασμό των αναστολέων, λαμβάνεται υπόψη ο περιορισμός ότι ο αναστολέας πρέπει να σταθεροποιήσει τη διαμόρφωση T του ενζύμου και να μιμείται τις επαφές της γλυκόζης που εντοπίζονται στην κλειστή διαμόρφωση του βρόχου 280s.<sup>(26,27,29)</sup>

### Αλλοστερικό Κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στην μεσεπιφάνεια των δύο υπομονάδων σε απόσταση 32 Å από το καταλυτικό κέντρο. Η τρισδιάστατη δομή του κέντρου αυτού έχει αναλυθεί και στις δύο πρωτεϊνικές διαμορφώσεις T και R τόσο στη φωσφορυλάση b όσο και στην a.

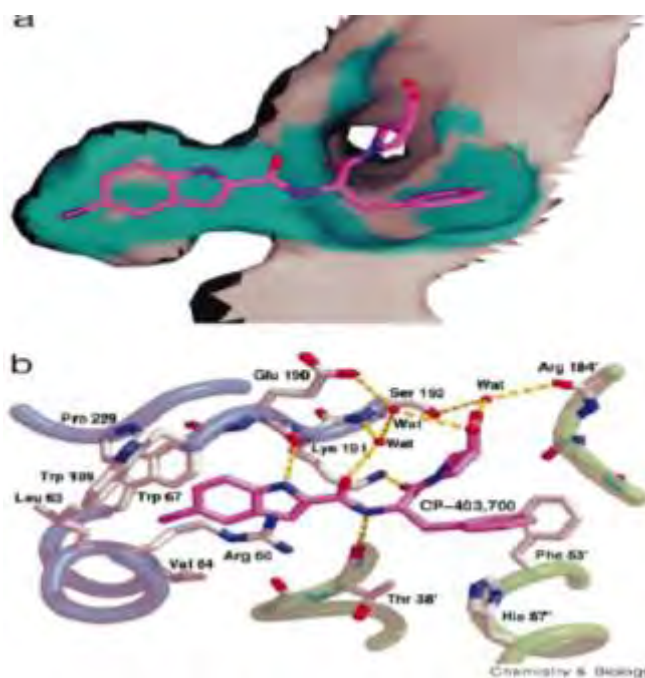
Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής, AMP, όταν συνδέεται βρίσκεται μεταξύ των ελίκων α2 και α8 (κατάλοιπα 47-78 και 289-314 αντίστοιχα) κοντά στην μεσεπιφάνεια των δύο υπομονάδων. Η σύνδεση του AMP στο κέντρο αυτό αυξάνει την V<sub>max</sub> καθώς και τη συγγένεια του ενζύμου για τα διάφορα υποστρώματα (Madsen, 1964; Helmreich & Cori, 1964) παρόλο που βρίσκεται σε απόσταση 32 Å από το καταλυτικό κέντρο. Στην T διαμόρφωση, όταν συνδέεται το AMP στο αλλοστερικό κέντρο, καταλαμβάνει C-3' ενδο-διαμόρφωση και σταθεροποιείται με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις της φωσφορικής του ομάδας με τις Arg-309 και Arg-310, ενώ η ριβόζη δεν αλληλεπιδρά με κανένα αμινοξύ του ενζύμου. Η Tyr-75 της έλικας α2 τοποθετείται παράλληλα προς την αδενίνη. Στη διαμόρφωση R, το AMP συνδέεται καταλαμβάνοντας διαφορετική διαμόρφωση από ότι στην πρωτεϊνική διαμόρφωση T, παρόμοια με εκείνη που έχει παρατηρηθεί στους ίδιους τους κρυστάλλους του AMP (Kraut & Jensen, 1963). Παρατηρείται δομική ανεξαρτησία των τριτοταγών και τεταρτοταγών μεταβολών της μεσεπιφάνειας του cap' /έλικας α2, ανάλογη με εκείνη που είχε παρατηρηθεί και στην μεσεπιφάνεια των δύο πύργων παρόλο που το μέγεθος των δομικών μεταβολών είναι μικρό. Η μετακίνηση του cap' προς την έλικα α2 διευκολύνεται και σταθεροποιείται από τη συντονισμένη μετακίνηση αμινοξέων λόγω της σύνδεσης των φωσφορικών ιόντων στο κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser-14.

Το αλλοστερικό κέντρο αναγνωρίζει μια ποικιλία από φωσφορυλιωμένες ενώσεις όπως IMP (ασθενής ενεργοποιητής), ATP, γλυκόζη-6-P, NADH, UDP γλυκόζης, 2-δεσοξυ-γλυκόζης-6-P, β-γλυκεροφωσφορικό, και ανόργανο φωσφορικό.<sup>(22,23,29)</sup>

### Νέο Αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPb. Σε αυτό συνδέεται η ένωση CP320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδιο καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοπυρανοζουλουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GPb. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GPα.

Η θέση σύνδεσης για κάθε αναστολέα αποτελείται από κατάλοιπα και από τις δύο υπομονάδες και αποτελείται από δύο ποιοτικά διαφορετικά περιβάλλοντα (Εικόνα 2.15). Το ένα περιβάλλον είναι υδρόφοβο και σχηματίζεται σχεδόν αποκλειστικά από τη μία υπομονάδα και περιέχει το ήμισυ της χλωροϊνδόλης του αναστολέα. Το άλλο περιβάλλον δεσμεύει το καρβοξαμίδιο, τη φαινυλαλανίνη και τμήματα της αζετιδίνης, που είναι τόσο υδρόφοβα όσο και πολικά.. Το υδρόφοβο θυλάκιο χλωροϊνδόλης σχηματίζεται από το αλειφατικό τμήμα των πλευρικών αλυσίδων της Arg60 και Lys191, και τις πλευρικές αλυσίδες έξι υδρόφοβων αμινοξέων. Η ομάδα χλωροϊνδόλης είναι εντελώς θαμμένη στο συμπλόκο.<sup>(28) (28,29)</sup>



**Εικόνα 2.15** Το νέο αλλοστερικό κέντρο της GP<sup>(29)</sup>

### Κέντρο Αναστολής

Το κέντρο αναστολής είναι ένας υδρόφοβος θύλακας σύνδεσης, που βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, κοντά στην μεσεπιφάνεια των δύο υπομονάδων, στην είσοδο προς την καταλυτική θέση, και περιλαμβάνει αμινοξέα από τις επικράτειες 1 (κατάλοιπα 13 - 484) και 2 (κατάλοιπα 485 έως 842). Στη διαμόρφωση T, το κέντρο αναστολής εμποδίζει την είσοδο στη σήραγγα που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Η δέσμευση σε αυτό το κέντρο παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία. Πουρίνες (π.χ. αδερίνη και η καφεΐνη), νουκλεοζίτες (π.χ. αδενοσίνη και ινωσησίνη), νουκλεοτίδια (π.χ. AMP, IMP και ATP), το NADH και ορισμένες συναφείς ετεροκυκλικές ενώσεις όπως το FMN (φλαβινομονο-νουκλεοτιδιο), FAD (φλαβινο-αδενινοδινουκλεοτιδιο), και η ριβοφλαβίνη έχει δείχθει ότι συνδέονται στη θέση αυτή στη μυϊκή GPb και GPa, ενώ η ηπατική GPa δείχνει μια αυστηρότερη εκλεκτικότητα στη σύνδεση αναστολεις.<sup>(34)</sup>

Στην διαμόρφωση T, η Phe285, από τον βρόχο 280s, εντοπίζεται παράλληλα με το φαινολικό δακτύλιο της Tyr613, από την α19 (αμινοξέα 613 έως 631) και μαζί αυτά τα δύο υδρόφοβα αρωματικά αμινοξέα σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η πρόσδεση σε αυτό το κέντρο σταθεροποιεί την T διαμόρφωση του ενζύμου και εμποδίζει την πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο, προκαλώντας έτσι την αναστολή του ενζύμου.<sup>(27,34)</sup>

### Κέντρο Αποθήκευσης

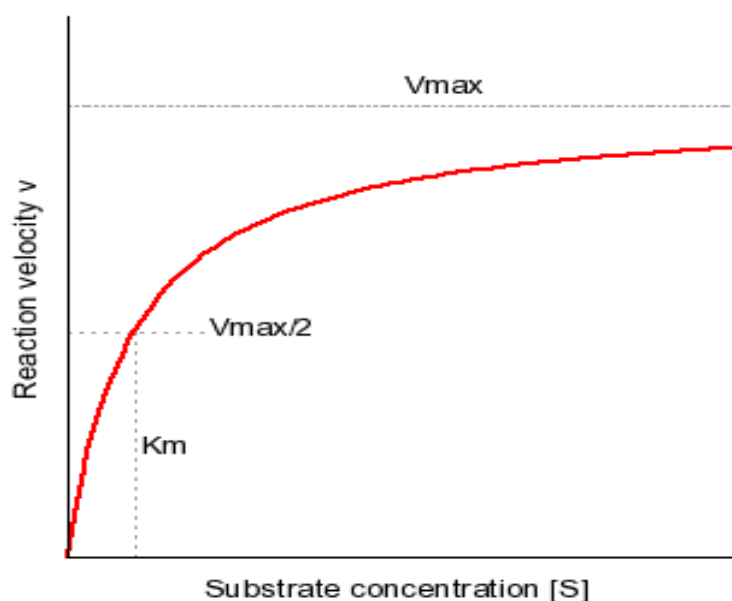
Η θέση αποθήκευσης γλυκογόνου, βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου, περίπου 30 Å από την καταλυτική περιοχή. Η θέση ταυτοποιήθηκε από κρυσταλλογραφικές μελέτες σύνδεσης με μαλτοπεντόζη (G5) και μαλτοεπτόζη (G7). Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε μια σχισμή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας. Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί και ως κέντρο ρύθμισης, μιας και η κατάληψη του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης.<sup>(34)</sup>

## **2.3 Κινητική Ενζύμων**

Τα ένζυμα, οι καταλύτες των βιολογικών συστημάτων είναι μόρια που προσδιορίζουν τον τρόπο των χημικών μετασχηματισμών και μεσολαβούν στο μετασχηματισμό των διαφόρων μορφών ενέργειας. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των ενζύμων είναι η καταλυτική ισχύς και η εξειδίκευσή τους.<sup>(4)</sup>

Η κύρια λειτουργία των ενζύμων είναι να αυξάνουν τις ταχύτητες των αντιδράσεων έτσι ώστε να είναι συμβατές με τις ανάγκες του οργανισμού. Για πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης  $V_0$ , η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο,

μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, [S]. Η ταχύτητα της κατάλυσης αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος και στη συνέχεια αρχίζει να σταθεροποιείται και να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος.<sup>(3)</sup>



**Κινητική Michaelis Menten:** Ένα διάγραμμα της ταχύτητας ( $V_0$ ) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος [S], για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα ( $V_{max}$ ) προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά Michaelis ( $K_m$ ) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με  $V_{max}/2$ .

Η αντίδραση που εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων είναι:



Ένα ένζυμο E αντιδρά με το υπόστρωμα S για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο ES με μια κινητική σταθερά  $k_1$ . Το σύμπλοκο ES μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους. Μπορεί να διασπαστεί σε E και S με μια κινητική σταθερά  $k_{-1}$ , ή να σχηματίσει προϊόν P με μια κινητική σταθερά  $k_2$ . Από το παραπάνω μοντέλο προκύπτει η σταθερά Michaelis- Menten ( $K_m$ ) που ορίζεται ως:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

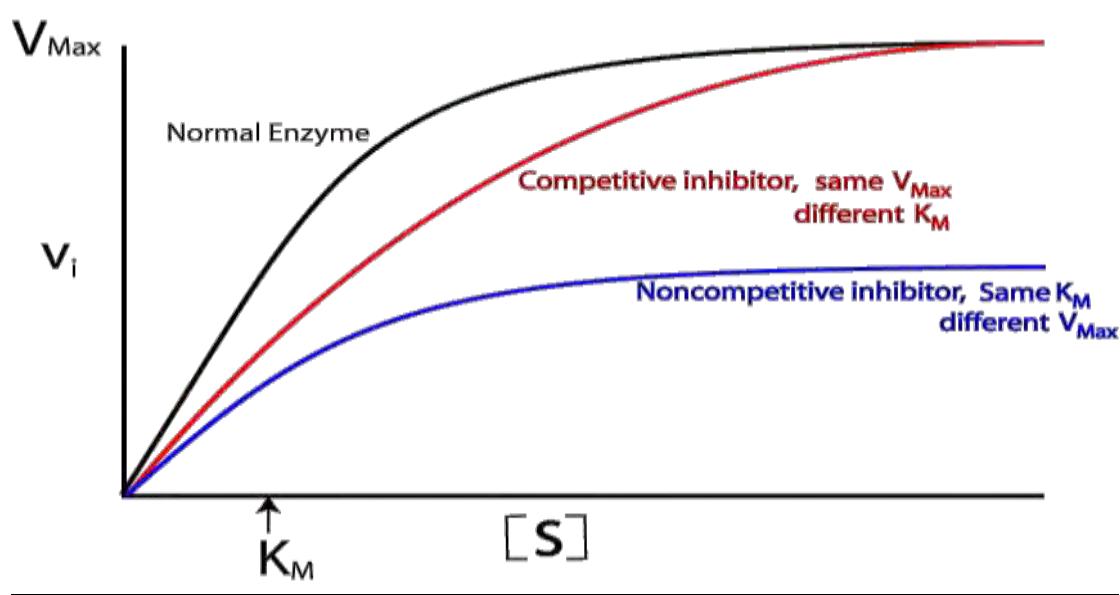
Η σταθερά Michaelis-Menten εκφράζεται σε μονάδες συγκέντρωσης και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις των S και E. Αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης. Η  $K_m$  είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα του ενζύμου έχουν καταληφθεί. Για να την προσδιορίσουμε πειραματικά είναι απαραίτητο να μελετήσουμε κινητικά το ένζυμο σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος. Η  $K_m$  για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα καθώς επίσης και από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. <sup>(3,4)</sup>

Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Αυτός ο τρόπος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας παίζει τον ρόλο του κύριου μηχανισμού ελέγχου στα βιολογικά συστήματα. Η αναστολή από ειδικές χημικές ουσίες μπορεί να είναι πηγή για την κατανόηση του μηχανισμού της ενζυμικής δράσης : αμινοξέα κρίσιμα για την κατάλυση μπορούν συχνά να προσδιοριστούν με τη χρησιμοποίηση ειδικών αναστολέων. Επιπλέον, πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες δρουν μέσω της αναστολής ενζύμων. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας (π.χ. πενικιλίνη) διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Σε αντίθεση, η αντιστρεπτή αναστολή χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Δύο είναι τα κυριότερα είδη αντιστρεπτής αναστολής: η συναγωνιστική και η μη συναγωνιστική αναστολή. <sup>(3)</sup>

Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο (E) μπορεί να προσδέσει το υπόστρωμα (ES) ή τον αναστολέα (EI), αλλά όχι και τα δύο μαζί (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η πρόσδεση του υποστρώματος, όπως φαίνεται και στην εικόνα 21. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Έτσι σε μια οποιαδήποτε συγκέντρωση αναστολέα, η συναγωνιστική

αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.<sup>(4)</sup>

Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδεθούν ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου (ESI) σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Συνεπώς, η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Σε μια πιο περίπλοκη κατάσταση (μεικτή αναστολή), ένας αναστολέας επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου.<sup>(3,4)</sup>



**Κινητική α) Συναγωνιστικού β) Μη Συναγωνιστικού Αναστολέα:** Α) Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα (κόκκινο), απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος για να επιτευχθεί μια ιδιαίτερη ενζυμική ταχύτητα. Η πορεία της αντίδρασης υποδηλώνει πόσο υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να υπερνικηθεί η συναγωνιστική αναστολή. Β) Η πορεία της αντίδρασης δείχνει ότι ο μη συναγωνιστικός αναστολέας (μπλε) προσδένεται και στο ελεύθερο ένζυμο και στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Συνεπώς, η ταχύτητα δεν μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή  $V_{max}$ , ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος.

## **2.4 Υπογλυκαιμικά Φάρμακα και GP**

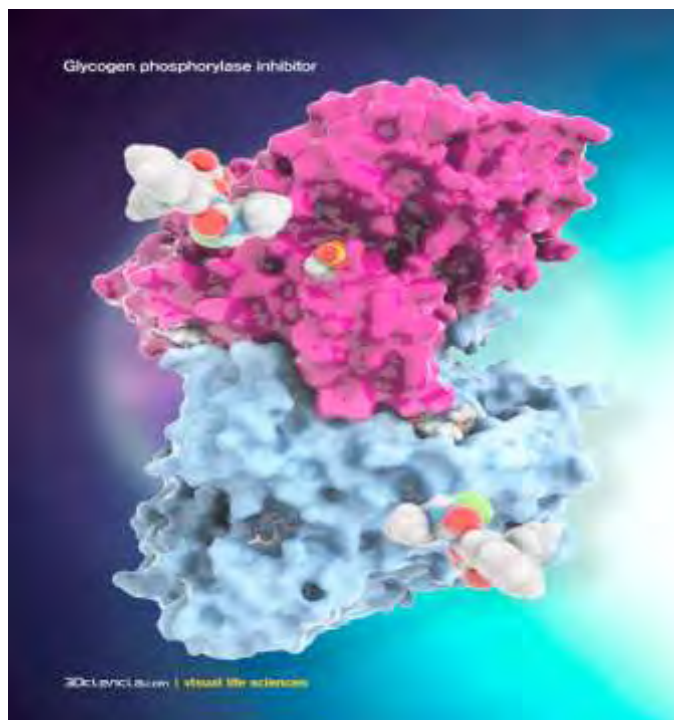
Ένας μεγάλος αριθμός θεραπευτικών στόχων, είναι επί του παρόντος υπό έρευνα, για την αναστολή της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης με μικρά μόρια. Ανταγωνιστές του υποδοχέα γλυκαγόνης, φωσφορυλάσης γλυκογόνου, 11-βητα-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης-1 και 1,6-δισφωσφατάσης φρουκτόζης είναι υπό αξιολόγηση σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους. Οι άλλες στρατηγικές, συμπεριλαμβανομένων των ανταγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και αναστολέων της παλμιτοϋλοτρανσφεράσης καρνιτίνης, υποστηρίζονται από μελέτες στον άνθρωπο καθώς και τρωκτικά. Αρκετοί δυνητικοί στόχοι συμπεριλαμβανομένης της τρανσλοκάσης, της φωσφατάσης της 6-P γλυκόζης, κινάσης της συνθάσης γλυκογόνου-3, του υποδοχέα των ανταγωνιστών της 2B αδενοσίνης, κινάσης του φωσφοενολοπιυροσταφυλικού και της κινάσης της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, έχουν επικυρωθεί από ενώσεις οι οποίες είναι αποτελεσματικές σε ζωικά μοντέλα<sup>(31,36)</sup>

Ένας τρόπος για τη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, είναι μέσω της αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η αποθήκευση και η αποικοδόμηση του ηπατικού γλυκογόνου είναι ένας σημαντικός μηχανισμός που συμβάλλει στην καθαρή πρόσληψη ή την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ.<sup>(30)</sup> Τα ποσοστά της σύνθεσης του γλυκογόνου και η αποικοδόμηση καθορίζονται από τις δραστηριότητες της συνθάσης του γλυκογόνου (GS) και GP, αντίστοιχα.<sup>(32)</sup> Η δραστηριότητα της GS, με τη σειρά της, καθορίζεται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της GP, επειδή η φωσφορυλιωμένη μορφή GP<sub>a</sub> είναι ένας ισχυρός αλλοστερικός αναστολέας της φωσφατάσης της συνθάσης του γλυκογόνου, η οποία καταλύει την αποφωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση του GS.<sup>(32,36)</sup> Η κατάσταση φωσφορυλίωσης του GP, επομένως, δεν καθορίζει μόνο το ποσοστό γλυκογονόλυσης, αλλά και το ρυθμό σύνθεσης γλυκογόνου και ως εκ τούτου, και τη μετάβαση μεταξύ της αποικοδόμησης και της σύνθεσης του γλυκογόνου. Εφόσον η γλυκόζη από τη γλυκονεογένεση ανακυκλώνεται μέσω του γλυκογόνου, η αναστολή της GP μπορεί να έχει αποτέλεσμα για τη μείωση της γλυκόζης που παράγεται τόσο από τη γλυκογονόλυση όσο και από την γλυκονεογένεση.<sup>(34,36)</sup>

Πολλές κατηγορίες ενώσεων, βρέθηκαν να είναι αναστολείς της GP. Η πιο ευρέως μελετημένη ομάδα των μορίων είναι παράγωγα γλυκόζης, τα οποία συνδέονται πρωτίστως στο καταλυτικό της GP.<sup>(34)</sup> Τα καλύτερα παράγωγα γλυκόζης είναι μικρογραμμομοριακοί αναστολείς GP<sub>b</sub> του μυ κουνελιού.<sup>(35)</sup> Οι N-ακυλο-β-D-γλυκοπιυρανοζυλαμίνες ήταν μεταξύ των πρώτων αναστολέων και πολλά ανάλογα-παράγωγα έχουν ερευνηθεί. Σε αυτή τη σειρά, η N-(2-ναφθοϋλ)-β-D-γλυκοπιυρανοζυλαμίνη ήταν ο καλύτερος αναστολέας, και χρησίμευσε επίσης ως επικεφαλής δομή για βιοϊσοστερικές αντικαταστάσεις. Η ενζυματική καθώς και η κρυσταλλογραφική μελέτη αποκάλυψε υψηλή ομοιότητα του αμιδίου και αναστολείς τύπου 1,2,3-τριαζόλης τόσο σε δεσμευτική ισχύ όσο και σε δομικά χαρακτηριστικά του ενζύμου-σύμπλοκου



αναστολέα.<sup>(33)</sup> Κινητικές μελέτες των βιοϊσοστερικών οξαδιαζολών 3-5 απέδειξαν ότι η σύσταση του ετεροκύκλου είχε μια ισχυρή επίπτωση στην αναστολή: ο πιο αποτελεσματικός αναστολέας σε αυτές τις σειρές ήταν 5-(β-D-γλυκοπυρανοσυλο) -3-(2-ναφθυλ)-1,2,4-οξαδιαζόλη. Άλλες έρευνες ετεροκυκλικών ενώσεων C-γλυκοπυρανοσυλίου με συμπυκνωμένους δακτυλίους έδειξαν ότι η βενζοθειαζόλη ήταν πολύ λιγότερο αποτελεσματική από βενζιμιδαζόλη.<sup>(33,34,36)</sup>



**Εικόνα 2.16:** Τρισδιάστατη απεικόνιση συμπλόκου GP- αναστολέα

Επί του παρόντος, η θεραπεία για το διαβήτη τύπου 2 βασίζεται κυρίως σε μια ποικιλία προσεγγίσεων, όπως ανάλογα γουανιδίνης, φάρμακα που κάνουν ευπαθή την ινσουλίνη, αναστολείς μεταφορέα γλυκόζης (SGLT-2), γλυκαγόνη που μιμείται τη δράση πεπτιδάσης-1 (GLP-1) αναστολείς των ανάλογων της διπεπτιδυλικής πεπτιδάσης-4 (DPP-IV), τα οποία όλα προορίζονται να μειώσουν την υπεργλυκαιμία.<sup>(30)</sup> Ωστόσο, αυτές οι θεραπείες έχουν σημαντικές παρενέργειες, όπως αύξηση του σωματικού βάρους και αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή ασθένεια, καθώς και περιορισμένη αποτελεσματικότητα και ανεκτικότητα.<sup>(29)</sup>

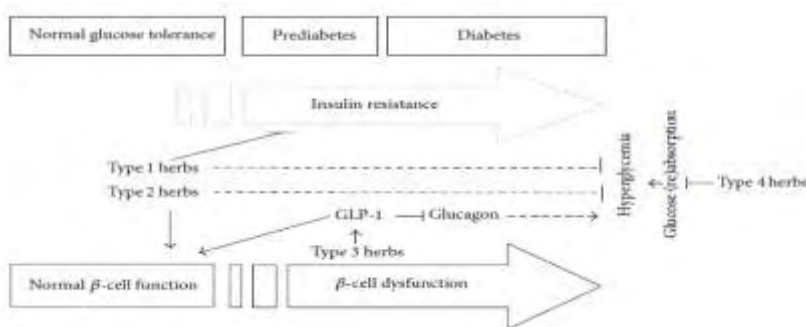
## **2.5 Φυτικά Εκχυλίσματα με Υπογλυκαιμική Δράση**

Η χρήση παραδοσιακών φαρμάκων και φαρμακευτικών φυτών στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες, ως θεραπευτικοί παράγοντες για την

διατήρηση της καλής υγείας, έχει ευρέως παρατηρηθεί. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας υπολογίζει ότι το 80% του πληθυσμού των αναπτυσσόμενων χωρών βασίζονται σε παραδοσιακά φάρμακα, ως επί το πλείστον φυτικά σκευάσματα, για τις πρωτοβάθμιες ανάγκες περίθαλψης.<sup>(40)</sup> Ο διαβήτης είναι μια ασθένεια που για τη θεραπεία του χρησιμοποιούνται φυτικά εκχυλίσματα. Η έρευνα που διεξάγεται τις τελευταίες δεκαετίες για τα φυτά που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για τη θεραπεία του διαβήτη έχει δείξει πως αρκετά έχουν αντιδιαβητικές ιδιότητες. Μέχρι σήμερα, πάνω από 1200 ανθοφόρα φυτά φέρεται να έχουν αντιδιαβητικές ιδιότητες. Μεταξύ αυτών, μόνο το ένα τρίτο έχουν μελετηθεί επιστημονικά και τεκμηριωμένα σε περίπου 460 δημοσιεύσεις.<sup>(37,40,54)</sup>

Τα φυτικά φάρμακα θεωρούνται ότι είναι απαλλαγμένα από παρενέργειες από ότι ένα συνθετικό. Είναι λιγότερο τοξικά, σχετικά φθηνά και δημοφιλή.<sup>(45)</sup>

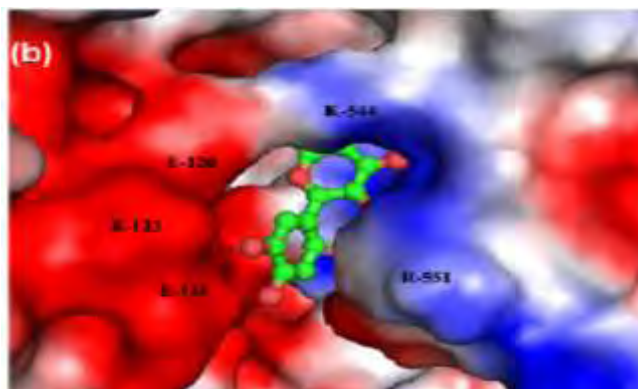
Η διαχείριση του διαβήτη χωρίς καμία παρενέργεια είναι ακόμα πρόκληση για την ιατρική κοινότητα. Για τη θεραπεία του διαβήτη, διάφορα φάρμακα, όπως διγουανίδια, σουλφονουλουρίες και θειαζολιδενοδιόνες είναι σήμερα διαθέσιμα για τη μείωση της υπεργλυκαιμίας στο σακχαρώδη διαβήτη. Η χρήση αυτών των φαρμάκων περιορίζεται από τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες τους, τα ποσοστά αποτυχίας και τις συνοδευτικές παρενέργειες. Έτσι ψάχνουν για μια νέα κατηγορία ενώσεων όπου είναι απαραίτητο να ξεπεραστούν τα προβλήματα διαβητικούς. Υπάρχει συνεχής αναζήτηση για εναλλακτικά φάρμακα.<sup>(44)</sup> Τα φαρμακευτικά φυτά μπορούν να παρέχουν τη χρήσιμη πηγή νέων υπογλυκαιμικών ενώσεων για την ανάπτυξη φαρμακευτικών φορέων ή και ως διαιτητικό συμπλήρωμα των υφιστάμενων θεραπειών. Διάφορα φαρμακευτικά φυτικά εκχυλίσματα που μειώνουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν μία ή περισσότερες από τις οδούς που ελέγχουν τη λειτουργία της αντίστασης στην ινσουλίνη, τη λειτουργία των παγκρεατικών κυττάρων, και την απορρόφηση της γλυκόζης.<sup>(42,43)</sup> (Εικόνα 2.17)



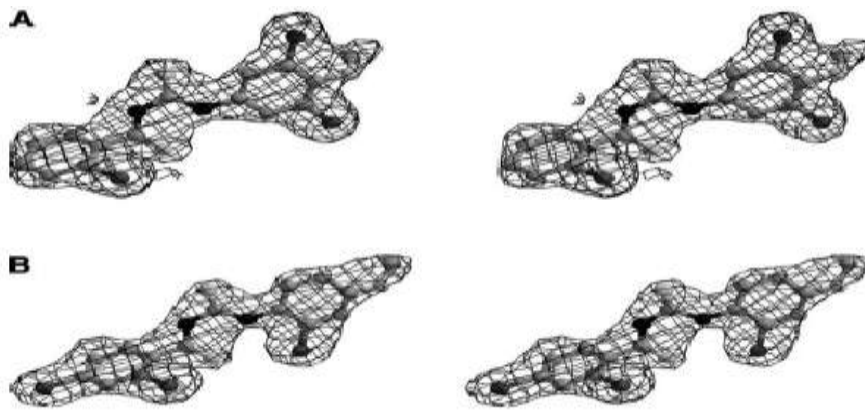
**Εικόνα 2.17:** Διαφορετικοί τύποι φαρμακευτικών βοτάνων μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τους τρόπους δράσης τους, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, η λειτουργία των β-κυττάρων, η GLP-1 και η επαναπορρόφηση γλυκόζης.<sup>(42)</sup>

Τη τελευταία δεκαετία, η GP είναι ο στόχος για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών παραγόντων. Η αποτελεσματικότητα των αναστολέων GP για τον έλεγχο της γλυκόζης του αίματος έχει επιβεβαιωθεί από βιολογικές μελέτες. Η καταλυτική θέση του ενζύμου έχει χαρτογραφηθεί με τη σύνδεση της γλυκόζης και αναλόγων γλυκόζης που έχουν σχεδιαστεί με βάση τις πληροφορίες που προέρχονται από την κρυσταλλική δομή της T-διαμόρφωσης του συμπλόκου GPb-α-D-γλυκόζης. Αναστολείς όπως η γλυκόζη, που σταθεροποιούν την διαμόρφωση T, μπλοκάρουν την είσοδο στην ενεργό θέση με την σταθεροποίηση μίας κλειστής θέσης βρόχου μήκους έξι καταλοίπων (βρόχος 280s). Έτσι, οι περισσότεροι αναστολείς έχουν σχεδιαστεί για να μιμούνται τις επαφές της γλυκόζης που εντοπίζονται στη κλειστή θέση του βρόχου 280s.<sup>(38,39)</sup>

Κατά την τελευταία δεκαετία ερευνητικές προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων αναστολέων GP, έχουν καταλήξει σε ενώσεις από φυσικά προϊόντα. Έτσι, φλαβονοειδή παράγωγα, τριτερπένια και τα παράγωγα βενζοϊκού οξέος έχουν βρεθεί ότι επιδεικνύουν σημαντική ανασταλτική δραστηριότητα στην GP.<sup>(38)</sup>

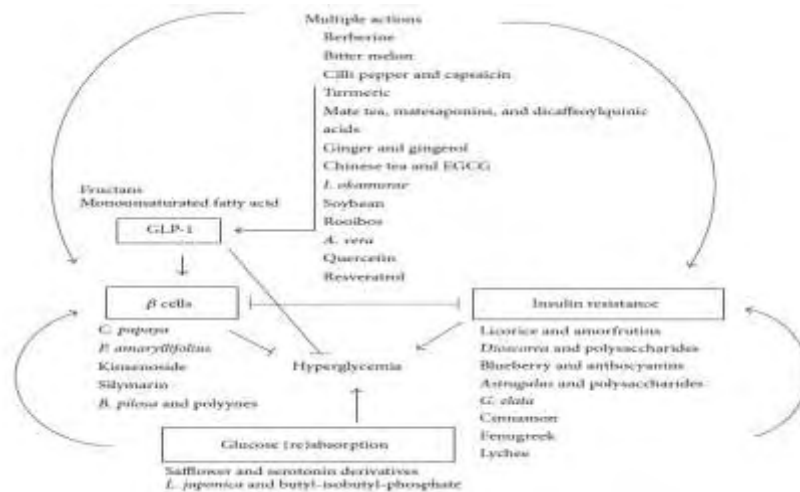


**Εικόνα 2.18:** Πρόσδεση ενός αναστολέα στην επιφάνεια της GPb.<sup>(38)</sup>

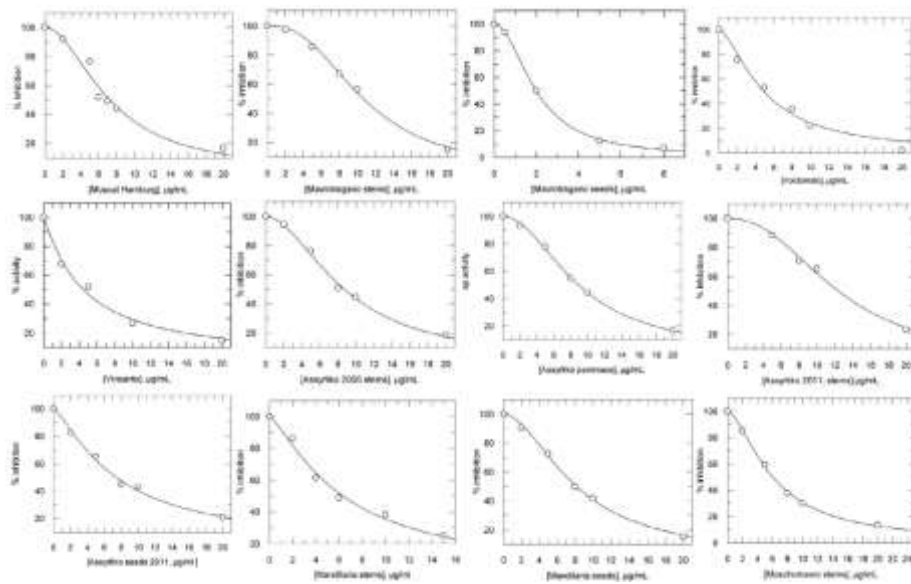


**Εικόνα 2.19:** Στερεοδιάγραμμα ηλεκτρονικής πυκνότητας φυτικών εκχυλισμάτων-αναστολέων φωσφορυλάσης του γλυκογόνου <sup>(44)</sup>.

Με βάση ένα μεγάλο αριθμό χημικών και φαρμακολογικών ερευνητικών εργασιών, πολλές βιοδραστικές ενώσεις έχουν βρεθεί σε φαρμακευτικά φυτά για το διαβήτη. Αυτές οι ενώσεις περιλαμβάνουν τερπενοειδή (τριτερπένια, διτερπένια, μονοτερπένια), πολυσακχαρίτες, φλαβονοειδή, ανάλογα ινσουλίνης αμινοξέων, αλκαλοειδή, στερόλες, ακόρεστα λιπαρά οξέα. <sup>(41)</sup>



**Εικόνα 2.20:** Φυτικά εκχυλίσματα με αντιυπεργλυκαιμική δράση <sup>(42)</sup>



**Εικόνα 2.21:** Αναστολή της GPb από εκχυλίσματα των ποικιλιών του ελληνικού *Vitis Vinifera*<sup>(38)</sup>

## **2.6 Φυτικά Εκχυλίσματα Rosaceae**

Τα *Rosaceae* (η οικογένεια των ρόδων), είναι μια μεσαίου μεγέθους οικογένεια ανθοφόρων φυτών, συμπεριλαμβανομένων περίπου 2830 είδη σε 95 γένη. Το όνομα προέρχεται από το είδος του γένους *Rosa*. Μεταξύ των πιο πλούσιων σε είδη γένη είναι τα *Alchemilla* (270), *Sorbus* (260), *Crataegus* (260), *Cotoneaster* (260), *Rubus* (250), και *Prunus* (δαμάσκηνα, κεράσια, ροδάκινα, βερίκοκα, και αμύγδαλα ) με περίπου 200 είδη.<sup>(47)</sup> Ωστόσο, όλοι αυτοί οι αριθμοί θα πρέπει να θεωρηθούν ως εκτιμήσεις. Τα *Rosaceae* περιλαμβάνουν βότανα, θάμνους και δέντρα. Τα περισσότερα είδη είναι φυλλοβόλα, αλλά μερικά είναι αιθαλή. Έχουν μια παγκόσμια εμβέλεια, αλλά είναι διαφορετικά στο βόρειο ημισφαίριο.<sup>(45)</sup>

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής εκχυλίσματα από την οικογένεια των *Rosaceae*: *Rosa Canina*, *Crataegus Orientalis*, *Rubus Sanctus*.

### **2.6.1 Rosa Canina**

Ο *Rosa canina* είναι ένας θάμνος της οικογένειας *Rosaceae*, που εντοπίζεται στην Ευρώπη, Δυτική Ασία και βόρειο-ανατολική Αφρική. Είναι ένα ξερομεσοφυτικό πενταπλοειδές είδος που φτάνει το ύψος των 3-5 m. Οι βλαστοί και τα κλαδιά του καλύπτονται με μικρά αιχμηρά αγκάθια. Μπορεί να βρεθεί μέχρι υψόμετρο 1200 μ. Αυτό το είδος εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία, καθώς εντοπίστηκαν περισσότερες από 200 ποικιλίες, μορφές και υβρίδια.<sup>(46)</sup> Η θρεπτική και θεραπευτική αξία του ώριμου φρούτου του *Rosa Canina* (*Cynosbati fructus*) έγκειται στην περιεκτικότητά τους σε: σάκχαρα, οργανικά οξέα, πηκτίνες, φλαβονοειδή, τανίνες, καροτενοειδή (β-

καροτένιο, λυκοπένιο, και ισομερή ρουβιξανθίνης, βιταμίνες (κυρίως βιταμίνη C, αλλά επίσης βιταμίνες B1, B2, K, PP, D και E).<sup>(48)</sup>



**Εικόνα 2.22:** Άνθος και καρποί *Rosa Canina*

Τα φρούτα του *Rosa canina* L. (*Rosaceae*) χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για τη θεραπεία του διαβήτη στην Ανατολία. Εκχυλίσμα αιθανόλης από τα φρούτα *canina* και τα κλάσματα τους, σαρώθηκαν για την αντιοξειδωτική, υπογλυκαιμική τους και αντιδιαβητικών δραστηριότητες. Το εκχύλισμα αιθανόλης που χορηγήθηκε για 7 ημέρες διέθετε μια αξιοσημείωτη υπογλυκαιμική επίδραση στα 250 mg / kg δόσης στρεπτοζοτοκίνης (STZ) που επάγεται σε διαβητικούς αρουραίους. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν συνεχόμενη σημαντική αντιδιαβητική δράση (50-62%) σε διαβητικούς αρουραίους.<sup>(48,46)</sup>

### **2.6.2 Crataegus Orientalis**

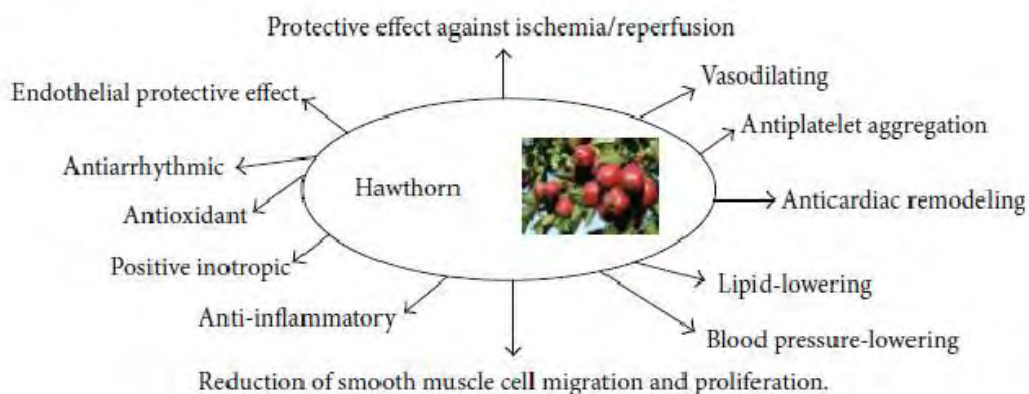
Το *Crataegus* ανήκει στην υποοικογένεια *Maloideae* των *Rosaceae*, μια ομάδα φυσικών συγκροτημάτων γενών με την ικανότητα να διασταυρώνονται ελεύθερα (υβριδοποιούνται). Όλα αυτά έχουν το βασικό αριθμό των 17 χρωμοσωμάτων. Γενικά φαίνεται ότι δεν σχηματίζουν μεγάλα δέντρα ή κουβούκλιο που δεσπόζει στα δάση. Ορισμένα είδη είναι αναμφισβήτητα θαμνώδης, ενώ άλλα μπορούν να αυξηθεί σε ύψος 12 m, αν και τα περισσότερα είδη μπορούν να επιτύχουν μεγέθη σε αναλογίες δέντρου.<sup>(49)</sup>





**Εικόνα 2.23:** *Crataegus Orientalis*

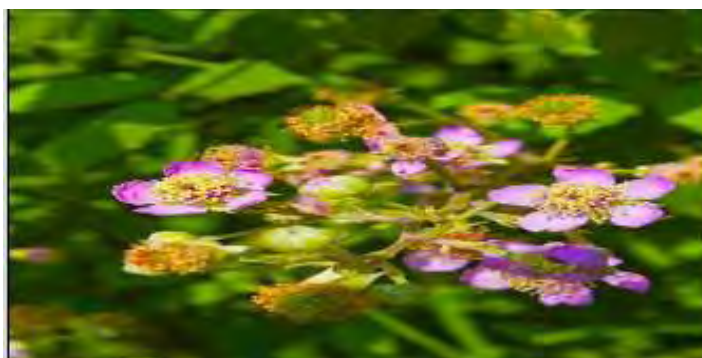
Τα προϊόντα *Crataegus* χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία καρδιακών και κυκλοφορικών διαταραχών, ιδιαίτερα για στηθάγχη, καρδιακή ανεπάρκεια, και υπερλιπιδαιμία καθώς θεωρούνται να έχουν πολλαπλές καρδιαγγειακές προστατευτικές επιδράσεις. Τα *Crataegus* φύλλα, λουλούδια, φρούτα περιέχουν ποικίλες ποσότητες ενός αριθμού βιολογικά ενεργών ουσιών, όπως ολιγομερείς προκυανιδίνες, φλαβονοειδή, και τριτερπένια. Μεταξύ αυτών των συστατικών, τα φλαβονοειδή και τριτερπένια, ειδικά το ουρσολικό οξύ, έχουν αναφερθεί ως τα κύρια δραστικά συστατικά που ασκούν υπολιπιδαιμικές αποτελέσματα.<sup>(50)</sup> Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η υπολιπιδαιμική δράση του *Crataegus* μπορεί να σχετίζεται με τις ανασταλτικές επιδράσεις των φλαβονοειδών στην 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-συνενζύμου Α ρεδοουκτάση, στη ρύθμιση της εντερικής ακυλο-CoA ακυλοτρανσφεράση της χοληστερόλης, στη δραστηριότητα από τα τριτερπένια [13], και την ενεργοποίηση από πολλαπλασιαστή υποδοχέα υπεροξυσώματος α (PPAR) άλφα στο λιπώδη ιστός, ή στο ήπαρ.<sup>(50,51)</sup>



**Εικόνα 2.24:** Θεραπευτικές Ιδιότητες *Crataegus Orientalis*<sup>(49)</sup>

### **2.6.3 Rubus Sanctus**

Τα είδη *Rubus* (*Rosaceae*) έχουν χρησιμοποιούνται παραδοσιακά για θεραπευτικούς σκοπούς. Για παράδειγμα, τα εκχυλίσματα των φύλλων και οι ρίζες αυτού του γένους έχουν χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη, ρευματισμούς, πονόλαιμος, αιμορροΐδες, διάρροια και εντερικές διαταραχές παρόμοια. Πιο συγκεκριμένα, αφέψημα που παρασκευάζεται από τις ρίζες του *Rubus sanctus* χρησιμοποιείται ως τσάι βοτάνων να ανακουφίσει τον πόνο και να θεραπεύσει ρευματισμούς. Επιπλέον, αποξηραμένο και θρυμματισμένα νεαρά βλασάρια του *Rubus* έχουν εφαρμοστεί σε τραύματα, τσιμπήματα εντόμων μολυσμένων και σπυράκια. Αρκετές δοκιμές βιολογικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκαν για *Rubus* είδη, που επικεντρώνονται στην αντιμικροβιακή, αντισπασμωδική, μυοχαλαρωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιπροσληπτική δράση.<sup>(52)</sup>



**Εικόνα 2.25:** *Rubus Sanctus*

Φυτοχημικές μελέτες, έδειξαν το χημικό περιεχόμενο των εναερίων μερών κάποιου είδους *Rubus*, το οποίο περιέχει флаβονοειδή (κερκετίνη, καμπφερόλη, το καφεϊκό οξύ και το χλωρογενικό οξύ), φαινολικά οξέα, τανίνες, αμινοξέα, σάκχαρα, πηκτίνες, καρβοξυλικά οξέα, ανθοκυανίνες, κατεχίνες, βιταμίνη C και κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα.<sup>(52)</sup>



### **3.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### **3.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού**

Για την απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού χρησιμοποιείται τροποποιημένη η μέθοδος Fischer&Krebs (1962). Συγκεκριμένα, αντί L-κυστεΐνης χρησιμοποιείται 2-μερκαπτο-αιθανόλη ως αναγωγικός παράγοντας σε όλα τα στάδια της πορείας καθαρισμού.

#### **Υλικά**

- 3 κουνέλια
- Απιονισμένο H<sub>2</sub>O
- Όξινοανθρακικόκάλιο, MB. 100.12
- 2- μερκαπτο-αιθανόλη, MB. 78.3
- EDTA, MB. 372.24
- Οξικό οξύ 99-100%, MB. 60.05
- β- γλυκερινοφωσφορικό νάτριο 0.005M, MB. 306.12
- 5'- φωσφορική αδενοσίνη, MB. 367.2

- Τρίς- (υδροξυμεθύλο)- αμινομεθένιο, MB. 121.1
- Οξικό μαγνήσιο, MB. 214.46
- Θειικό αμμώνιο, MB. 132.14
- C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> - Γλυκερόλη 100%
- Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης. Πριν από τη χρήση τους υφίστανται κατεργασία με 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 10 mM EDTA στους 100°C (30 min) και στη συνέχεια έκπλυση με απεσταγμένο ύδωρ 100°C (30 min).

### Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO<sub>3</sub>),
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N (CH<sub>3</sub>COOH)
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρεις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα οξικού μαγνησίου 1.0M ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg)

### Όργανα

- Φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο
- Πεχάμετρο
- Αναλυτικός ζυγός
- Χρονόμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Αντλία κενού Buchner
- Συσσκευή Vortex
- Χειροκίνητη κρεατομηχανή

### Διαδικασία

### Βήμα 1<sup>ο</sup> : Παραλαβή μυϊκού εκχυλίσματος

Αρχικά, αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από 3 κουνέλια, αλέθονται με χειροκίνητη κρεατομηχανή και ζυγίζονται. Ο κιμάς που προκύπτει εκχυλίζεται 3 φορές με απιονισμένο ύδωρ και συλλέγεται εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες εκχυλίσεις πραγματοποιούνται με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 30 λεπτά. Τέλος, το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

### Βήμα 2<sup>ο</sup>: Όξινη καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

Στη συνέχεια, ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Παρατηρείται αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000 rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C με χρήση μεγάλης κεφαλής. Το υπερκείμενο συλλέγεται και διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Το διάλυμα ογκομετρείται και ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κεκορεσμένο  $\text{KHCO}_3$ .

### Βήμα 3<sup>ο</sup>: Καταβύθιση του ενζύμου με θειϊκό αμμώνιο (90%)

Το ένζυμο καταβυθίζεται με διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L πρωτεϊνικού διαλύματος. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, ο μεγαλύτερος όγκος του υπερκείμενου αποχύνεται με χρήση αντλίας και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C, με χρήση μεγάλης κεφαλής, για συλλογή του ίζηματος. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.001M, pH 7.5 για 16 ώρες.

### Βήμα 4<sup>ο</sup>: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται από τα σακουλάκια διαπίδυσης και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 17000 rpm για 10 min στους 20-25°C με χρήση μικρής κεφαλής. Το υπερκείμενο ογκομετρείται και προστίθενται: α) διάλυμα 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M pH 7.0 όγκου ίσο με τα 3/27 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, β) διάλυμα EDTA 0.1 M pH 7.0 ίσο με τα 5/1000 του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και γ) αλκαλικό διάλυμα Tris 2 M για ρύθμιση του pH στο 8.8. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και

ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου όπου προστίθεται διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 17000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20-25°C με μικρή κεφαλή και ογκομετρείται το υπερκείμενο.

#### Βήμα 5<sup>ο</sup>: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση του ενζύμου

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη AMP 0.1M (pH 7.0) και  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$  1M (pH 7.0) σε όγκο ίσο με το 1/100 του πρωτεϊνικού διαλύματος. Το μίγμα τοποθετείται σε σωλήνες φυγοκέντρωσης και αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Ακολούθως, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρωση στις 15500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ( $\beta$ -GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8). Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20-25°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων. Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ , όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 3h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP και  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ .

#### Βήμα 6<sup>ο</sup>: Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C σε ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1. Η ενζυμική συγκέντρωση προσδιορίζεται με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και υπολογίζεται από τον τύπο:  $C_{\text{ενζύμου}} = \text{OD}_{280} / 1,32$ .

Τέλος, προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20 °C.

### 3.2.Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

#### 3.2.1Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity,  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του

ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την παρακάτω αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου:



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα ( $\text{P}_i$ ) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Δείγμα από το αποθηκευμένο σε γλυκερόλη ένζυμο αραιώνεται με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 pH 6.8 (50 mM β-γλυκερινοφωσφορικού νατρίου, 50 mM 2-μερκαπτοαιθανολης, 1mM EDTA) και λαμβάνεται το εναιώρημα ενζύμου. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό διάλυμα που περιέχει 25μg ενζύμου ανά mL, γλυκογόνο 1 % (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου β-GP 2,5 mM, β-Merc 2,5 mM, EDTA 0,05mM

Επίσης, σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D-Glc-1-P 2.0mM με προσθήκη 200μL υποστρώματος α-D- Glc -1-P 9.0mM, 18μL AMP 50mM και 502μL H<sub>2</sub>O.

Στη συνέχεια, το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C για 15 λεπτά. Μετά την επώαση, προστίθενται 180μL από το ενζυμικό μείγμα στον σωλήνα του υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες: 5.0 μg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υποστρώματα α-D-Glc-1-P από 9 mM έως 90 mM , η θερμοκρασία είναι 30° C και το pH 6.8. Ανά τακτά και καθορισμένα χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού), λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το διάλυμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1%. Το SDS, είναι απορρυπαντικό και προκαλεί την αποδιάταξη και την αδρανοποίηση του ενζύμου.

Έπειτα, γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) στα δείγματα. Εκτός από αυτά τα δείγματα, ο προσδιορισμός του φωσφόρου γίνεται και σε τυφλά δείγματα, όπως α-D-Glc-1-P, λόγω της υδρόλυσης της αλλά και στο γλυκογόνο λόγω, της παρουσίας των φωσφορικών.

### **3.2.2 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>)**

Η σταθερά Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης

( $V_{max}$ ). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος ( $\alpha$ -D- Glc-1-P).

Στην αντίδραση αυτή η λιγότερο ενεργή μορφή του ενζύμου (T διαμόρφωση), μετά από ενεργοποίηση με AMP, δρα αντίστροφα, προς σχηματισμό γλυκογόνου, παρουσία G-1-P ( $\alpha$ -D-1-φωσφορικής γλυκόζης), και ελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα ( $P_i$ ). Η καταλυόμενη αντίδραση σε συνθήκες κορεσμού σε AMP 1.0 mM και γλυκογόνο 1.0% w/v, ακολουθεί μία κινητική κατά Michaelis-Menten, σύμφωνα με την οποία η καμπύλη της ταχύτητας ως προς το υπόστρωμα, την 1-φωσφορική γλυκόζη, αποτελεί τμήμα υπερβολής. Σε μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση του υποστρώματος όσο και την ποσότητα του ενζύμου. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, όπου επέρχεται κορεσμός, η ταχύτητα εξαρτάται αποκλειστικά από την ποσότητα του ενζύμου στο μίγμα της αντίδρασης.

#### Διαδικασία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 1% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων  $\alpha$ -D- Glc-1-P 9.0 έως 90 mM, με προσθήκη 200  $\mu$ L από το αντίστοιχο υπόστρωμα  $\alpha$ -D- Glc-1-P, 18  $\mu$ L AMP 50 mM και 502  $\mu$ L  $H_2O$ .

Το ενζυμικό μείγμα τοποθετείται για επώαση στους 30 °C επί 15 λεπτά και τα υποστρώματα επί 5 λεπτά. Στη συνέχεια, για την εκκίνηση της αντίδρασης σε όλους τους σωλήνες των υποστρωμάτων σταδιακά προστίθενται 180  $\mu$ L ενζυμικού μίγματος. Στις συνθήκες αυτές, στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, έχουμε: 5.0  $\mu$ g ένζυμο/mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2% w/v, υπόστρωμα  $\alpha$ -D- Glc-1-P 2.0-20 mM, ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM ιμιδαζολίου, 1 mM EDTA, 100 mM KCl και 1 mM DTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1,2,3,4) λαμβάνονται δείγματα των 200  $\mu$ L από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50  $\mu$ L SDS 1.0% w/v.

Στα δείγματα γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως  $\alpha$ -D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών).

#### **3.2.3 Προσδιορισμός $IC_{50}$ αναστολέα**

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των

ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Η σταθερά  $IC_{50}$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της  $IC_{50}$  και για συγκεκριμένη συγκέντρωση Glc-1-P (1-φωσφορικής γλυκόζης). Συνήθως οι ποσότητες των προς εξέταση ουσιών δεν είναι μεγάλες και αυτό περιορίζει την δυνατότητα για μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να καλύψουν την πιθανότητα για την εξαγωγή τόσο των κινητικών παραμέτρων για την ανίχνευση της επίδρασης του αναστολέα στο ένζυμο, όσο και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Σκοπός μας είναι να προσεγγίσουμε όσο το δυνατό καλύτερα τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50%.

### Υλικά

- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης ( $\alpha$ -D- Glc-1-P) 9mM
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM  $\beta$ -φωσφογλυκερόλης ( $\beta$ - GP), 50 mM  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Γλυκογόνο 1 % (w/v)
- Διάλυμα SDS 1%
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8
- Διάλυμα του αναστολέα

### Όργανα

- Υδατόλουτρο (ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία στους 30° C.)
- Φασματοφωτόμετρο
- Δοκιμαστικούς σωλήνες
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Συσσκευή vortex
- pHμετρο



- Χρονόμετρο

### **3.3 Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b**

Το ένζυμο φυλάσσεται σε εναιώρημα γλυκερόλης στους -20 °C. Από αυτό το εναιώρημα παίρνουμε 10  $\mu$ L και το αραιώνουμε σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Το διάλυμα φωτομετρείται στα 280 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου, με χρήση κυψελίδας χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm.

Στη συνέχεια, σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα. Περιέχει το ένζυμο σε συγκέντρωση 25  $\mu$ g/mL, γλυκογόνο 1% (w/v), ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου και νερό. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα με την προσθήκη του διαλύματος υποστρώματος γίνεται σε καθορισμένες συνθήκες: 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mMAMP, 0.2% w/v γλυκογόνο, σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος  $\alpha$ -D-Glc-1-P και μεταβαλλόμενης αναστολέα.

Το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 30 °C, για επώαση, 15 λεπτά.

### **3.4 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης**

Παρασκευάζονται 2 ρυθμιστικά διαλύματα:

Ρυθμιστικό διάλυμα 1: ιμιδαζόλιο 200 mM, KCL 400 mM, DTT 4 mM, EDTA 4 mM, pH 6,8

Ρυθμιστικό διάλυμα 2: ιμιδαζόλιο 135 mM, KCL 270 mM, DTT 2,7 mM, EDTA 2,7 mM, pH 6,8 (με αραιώση του ρυθμιστικού διαλύματος 1)

Φυλάσσονται στους 4 °C.

Από το πυκνό διάλυμα της G1P (400 mM), το ρυθμιστικό διάλυμα 1 και νερό, αναμιγνύονται κατάλληλοι όγκοι ώστε να προκύψει διάλυμα G1P (90 mM), ιμιδαζόλιο (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) και με pH 6.8.

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της G1P προκύπτουν με αραιώση του διαλύματος της G1P 90 mM με το ρυθμιστικό διάλυμα 2 και νερό.

Συνολικά προκύπτουν τα παρακάτω διαλύματα:

- Glc-1-P 90mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 45mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 27mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 18mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 9mM, Ιμιδαζόλιο (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8

Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -20°C για να αποφευχθεί υδρόλυση της Glc-1-P.

#### Διαδικασία

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η  $IC_{50}$ , σε σταθερή συγκέντρωση α-D- Glc-1-P 9mM και AMP 50mM ώστε μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180μl) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P να είναι 2 mM και της AMP 1mM. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720 μL. Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D- Glc-1-P	200μL	200 μL
AMP (50mM)	18 μL	18 μL
Αναστολέας	-	X μL
H <sub>2</sub> O	502 μL	720-(200+18+X) μL
Τελικός όγκος	720 μL	720 μL

Ταυτόχρονα ετοιμάζονται και δοκιμαστικοί σωλήνες που περιέχουν 50  $\mu$ L SDS 1% (τέσσερις για κάθε πείραμα), που θα χρησιμοποιηθούν για να σταματήσουμε την αντίδραση.

Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος καθώς και των διαλυμάτων του υποστρώματος, μεταφέρονται 180  $\mu$ L από το ενζυμικό διάλυμα σε κάθε διάλυμα υποστρώματος με τη σειρά, έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια ανά 1 λεπτό και σε χρόνους 1, 2, 3, και 4 λεπτών λαμβάνονται και μεταφέρονται 200  $\mu$ L από το διάλυμα της αντίδρασης στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν το SDS 1% και η αντίδραση σταματά, λόγω της αδρανοποιητικής δράσης του SDS. Στη συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί, προστίθενται από 2.5 mL διάλυμα ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά στους 30 °C και μετά ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των φωσφορικών ιόντων (Pi), που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση.

Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου και σε τυφλά, όπως α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών).

Στη συνέχεια ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit, προκειμένου να προσδιοριστεί η IC<sub>50</sub>.

Ακολουθεί η περιγραφή των συνθηκών των κινητικών πειραμάτων που έγιναν για την ένωση που περιλαμβάνεται στην παρούσα εργασία:

- G1P: 2 mM
- AMP: 1 mM
- Γλυκογόνο: 0.2% w/v

### **3.5 Παρασκευή τυφλών**

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC<sub>50</sub> του ενζύμου βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb, γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να διορθωθούν οι απορροφήσεις λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά :

- Τυφλό νερού για την ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται στην IC<sub>50</sub> ή με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της G1P στην περίπτωση της Km, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της
- Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών
- Τυφλό διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε μmolPi.

Παρασκευάζονται από δυο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός του νερού, και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους.

### **3.6 Προσδιορισμός φωσφόρου**

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστηκότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορύλασης του γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου.

#### **Μέθοδος ασκορβικού οξέος**

Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου, αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φωσφορικά ιόντα Pi πρέπει να είναι μεταξύ 0,05-0,4 μM, προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

#### **Υλικά**

- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου, με ρύθμιση pH 5.0. Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με HCl 1N.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), με ρύθμιση pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N.

Στη συνέχεια αναμιγνύουμε τα διαλύματα με αναλογία όγκων 4:1 (4 όγκους αντιδραστηρίου μολυβδαινικού και 1 όγκο ασκορβικού).

Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από 15 min μετά την παρασκευή του και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα.

### Διαδικασία

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2.5mL από το παραπάνω αντιδραστήριο χρώσης. Μετά από ανάδευση οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850nm. Επίσης γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών.

### **3.7 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit**

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της G1P και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό διάλυμα) μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity) αποτελεί έκφραση της ποσότητας αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου και ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1μmol υποστρώματος ή παραγωγή 1 μmol προϊόντος ανά λεπτό κάτω από ορισμένες συνθήκες. Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit, εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simpleweighting'). Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων είναι η εξής:

$$v = \frac{1}{t} \ln \left( \frac{\text{όριο}}{\text{όριο} - \mu\text{molP}_i} \right) \text{όριο}/\text{mg}_{\text{ενζύμου}}$$

όπου **k**: είναι η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης

**t**: ο χρόνος της αντίδρασης

**όριο**: προκύπτει από το γινόμενο της συγκέντρωσης της G1P που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος επί τον όγκο του δείγματος επί την μέγιστη υδρόλυση της G1P στην ισορροπία της αντίδρασης (78%).

Οι αρχικές ταχύτητες που προκύπτουν από την παραπάνω εξίσωση επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις

τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων (ετεροσκεδαστικότητα 'explicit weighting'). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους  $V_{max}$  και  $K_m$  και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ ) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten με την προϋπόθεση σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]}$$



όπου  $v$  : Η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης.

**$V_{max}$** : Η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

**[S]**: Η συγκέντρωση του υποστρώματος

**E**: Το ένζυμο

**S**: Το υπόστρωμα

**ES**: Το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος

**P**: Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten,  $v = V_{max}[S]/K_m + [S]$  (οπού  $v$ : ταχύτητα,  $V_{max}$ : μέγιστη ταχύτητα,  $[S]$ : συγκέντρωση υποστρώματος,  $K_m$ : σταθερά Michaelis-Menten). Γίνεται η καμπύλη  $V=f([S])$ , η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του  $V_{max}$ .

Στον προσδιορισμό της σταθεράς  $IC_{50}$ , οι ειδικές δραστηρότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηρότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηρότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{s.a._{control} - s.a._i}{s.a._{control}} \times 100\%$$

όπου: **s.a.<sub>control</sub>** : η ειδική δραστηρότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

s.a.i:η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία  $i$  συγκεντρώσεως αναστολέα

Το πείραμα για την εξαγωγή της  $IC_{50}$  θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της  $IC_{50}$  προκύπτει από το διάγραμμα **%αναστολή=f([I])**. Από την τιμή της  $IC_{50}$  προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής  $K_i$  που αποτελεί όπως και η  $K_m$  έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υποστρώμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

$$IC_{50} = \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

Όπου: **[S]** η συγκέντρωση του υποστρώματος ως προς το οποίο εξετάζεται η GPb, δηλαδή η συγκέντρωση της Glc-1-P.

### **3.8 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων της Gpb**

Προκειμένου να σχηματιστούν κρύσταλλοι θα πρέπει στο διάλυμα του ενζύμου να μην υπάρχει AMP. Για τον λόγο αυτό ακολουθείται διαδικασία για την απομάκρυνση του.

Το διάλυμα του ενζύμου υφίσταται διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM BES/NaOH (pH 6.7) για 16 h. Ο λόγος των απορροφήσεων  $A_{260}/A_{280}$ , που αποτελεί κριτήριο ύπαρξης νουκλεοτιδίων, είναι συνήθως 0.62 κατάλληλος για την καλύτερη διατήρηση του ενζύμου και της ενζυμικής δραστηριότητας. Στην τιμή αυτή ο γραμμομοριακός λόγος ενζύμου: AMP είναι περίπου 1:1. Για την απομάκρυνση του AMP (που είναι απαραίτητη για την κρυστάλλωση) το ένζυμο κατεργάζεται με ενεργό ζωικό άνθρακα (Norit A) σε αναλογία ενζύμου:ζωικός άνθρακας περίπου 1:1 (κ.β.). Λόγος των απορροφήσεων  $A_{260}/A_{280}$  0.53-0.54 θεωρείται ενδεικτικός της απομάκρυνσης του AMP.

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T state) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο batch. Η μέθοδος



αυτή αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων GPb (T state), η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου P43212) εντός γυάλινων σωλήνων.

Υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM BES/NaOH (σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-Αμινοαιθανίου), pH 6.7, 1mM EDTA 2% w/v NaN<sub>3</sub>, 2 mM DTT
- Διάλυμα DTT 200mM, pH 6.7
- Διάλυμα σπερμίνης 200mM, pH 6.7
- Διάλυμα IMP 200mM pH 7.0 (5'- φωσφορική ινοσίνη (με τα Νατρίου άλας), C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>PNa<sub>2</sub>, MB 392.17 g/mol (SIGMA))
- Πυρήνες κρυστάλλωσης
- Εναιώρημα GPb περιεκτικότητας 20-30 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα BES/NaOH pH 6.7.
- Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3 mm και μήκους 3 cm

Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο UV

### Διαδικασία

Για την ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων (ομάδας συμμετρίας χώρου P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2) της GP χρησιμοποιείται η στατική μέθοδος (batch method). Το ένζυμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από AMP ( $A_{260}/A_{280} = 0.53-0.54$ ). Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε μικρούς σωλήνες μήκους περίπου 3 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3 mm, των οποίων τα δύο άκρα κλείνονται με parafilm.

Οι κρύσταλλοι της φυσικής T διαμόρφωσης της GPb αναπτύσσονται από μίγμα 20-30 mg/ml καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 1 mM IMP, 10 mM BES/NaOH (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub> στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης

αραίωσης (Oikonomakos *et al.*, 1985). Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 h, ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας των κρυστάλλων είναι  $a=b=128.6 \text{ \AA}$ ,  $c=116.1 \text{ \AA}$  και  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ .

Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι ισόμορφοι με τους κρυστάλλους που αναπτύσσονται παρουσία οξικού μαγνησίου αντί σπερμίνης. Συνήθως το μέγεθος τους είναι 0.2-0.5 mm, κατάλληλο για την περαιτέρω χρήση αυτών σε πειράματα περίθλαση ακτινών

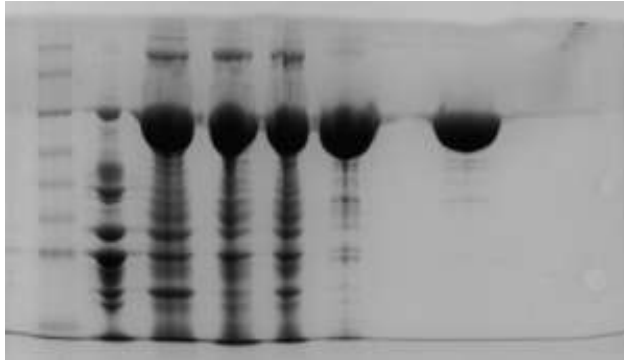
Χ. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι:  $I = I_0 * e^{-\mu t}$

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### **4.1 Απομόνωση GPb από σκελετικούς μυς κουνελιού**

Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μυς κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος (παράγραφος 1).

**M 1 2 3 4 5 6**



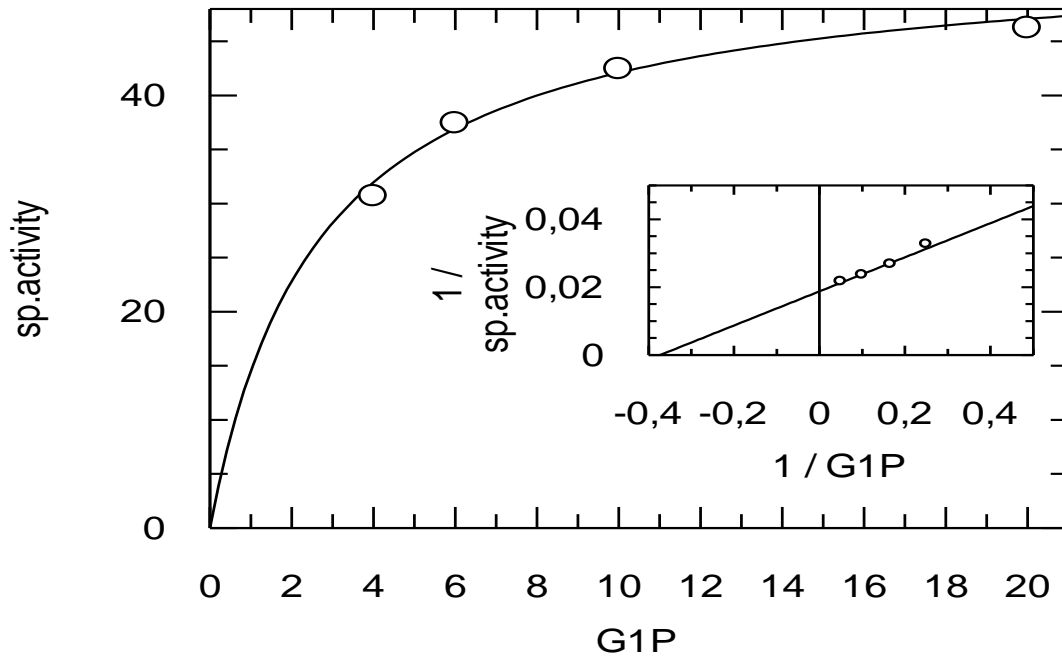
**Εικόνα 4.1:** M: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, 1: Μετά την καταβύθιση των πρωτεϊνών σε όξινο περιβάλλον, 2: Μετά την καταβύθιση των πρωτεϊνών με θειικό αμμώνιο, 3: Μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH, 4: Μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση, 5: Μετά την τέταρτη ανακρυστάλλωση, 6: Καθαρή πρωτεΐνη μετά την απομόνωση.

## **4.2 Αποτελέσματα Κινητικών Πειραμάτων**

### **4.2.1 Αποτελέσματα Κινητικής Μελέτης της GP (Km)**

Η σταθερά  $K_m$  (σταθερά Michaelis-Menten) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (1-P γλυκόζη για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η  $K_m$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας ( $V_{max}$ ). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 3mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της  $K_m$ .

Στο παρακάτω διάγραμμα της  $K_m$  παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity,  $\mu\text{mol}$  φωσφορικών /  $\text{min}/\text{mg}$  ενζύμου) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (1-φωσφορική γλυκόζη).



**Εικόνα 4.2:** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνουσε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

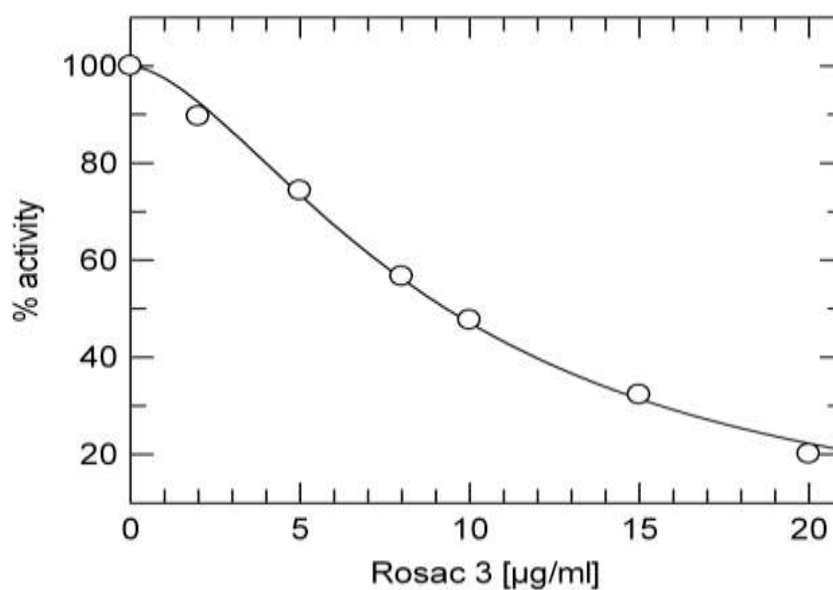
Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου ( $K_m$  και  $V_{max}$ ) βρέθηκαν να είναι:

$K_m = 2.68 \pm 0.41$  mM και

$V_{max} = 53.39 \pm 2.21$  μmol/min/mg

#### 4.2.2 Αποτελέσματα Κινητικών Μελετών Εκχυλισμάτων *Rosaceae* (IC<sub>50</sub>)

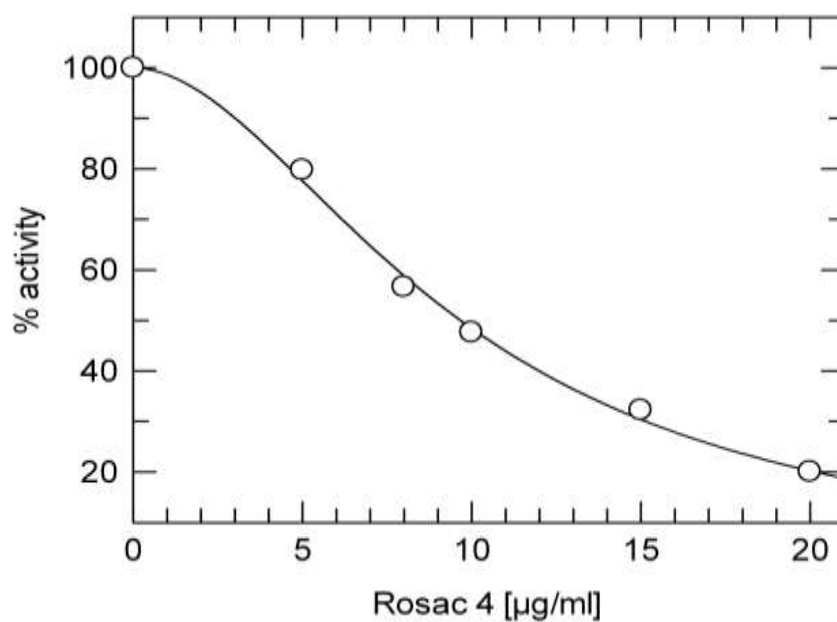
### Εκχύλισμα Rosa Canina (Rosac 3)



**Εικόνα 4.3:** Καμπύλη που εκφράζει την αναστολή ως συγκέντρωση του εκχυλίσματος *Rosa Canina*, ενώ υπολογίζεται και η  $IC_{50}$

Extract [µg/ml]	% activity
0	100
2	89,6210
5	74,2860
8	56,6240
10	47,6370
15	32,2490
20	20,0580
$IC_{50}: 9,31 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$	

### Εκχύλισμα Crataegus Orientalis (Rosac 4)



**Εικόνα 4.4:** Καμπύλη που εκφράζει την αναστολή ως συγκέντρωση του εκχυλίσματος *Crataegus Orientalis*, ενώ υπολογίζεται και η  $IC_{50}$

Extract [µg/ml]	% activity
0	100
5	79,7830
8	56,6240
10	47,6370
15	32,2490
20	20,0580
$IC_{50}: 9,67 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$	

**Εκχύλισμα *Rubus Sanctus* (Rosac 5)**

Μετά από κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο εκχύλισμα, το διάγραμμα κινητικής μελέτης και οι τιμές της IC<sub>50</sub>, έδειξαν ότι δεν υπάρχει αναστολή από το συγκεκριμένο εκχύλισμα, όσο και αν αυξάναμε τη συγκέντρωσή του κατά τη διαδικασία των κινητικών πειραμάτων.

## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Η συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε ως μέρος της γενικότερης έρευνας που γίνεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από διάφορες ποικιλίες φυτών του ελλαδικού χώρου και μη. Η αναστολή αφορά κυρίως τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η οποία είναι ένα ένζυμο που αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με υπογλυκαιμική δράση για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2. Τα φυτικά εκχυλίσματα λόγω της φύσης τους έχουν λιγότερες παρενέργειες, είναι λιγότερο τοξικά, ενώ κοστίζουν λιγότερο.

Στην συγκεκριμένη εργασία, πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη για τον προσδιορισμό της IC<sub>50</sub> τριών φυτικών εκχυλισμάτων της οικογένειας *Rosaceae*: *Rosa Canina*, *Crataegus Orientalis* και *Rubus Sanctus*. Τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων με τη μέθοδο της IC<sub>50</sub>, έδειξαν ότι τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση την έχει ο αναστολέας από εκχύλισμα *Crataegus*, ενώ δεύτερη καλύτερη δράση μεταξύ των εκχυλισμάτων *Rosaceae* έχει το εκχύλισμα *Rosa Canina* με την IC<sub>50</sub> των δύο να είναι  $9,67 \pm 0,20$  μg/ml και  $9,31 \pm 0,20$  μg/ml αντίστοιχα. Παρ' όλα αυτά, και τα δύο φυτικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μιας και οι τιμές της IC<sub>50</sub> είναι μικρότερες του 10 μg/ml.<sup>(38)</sup> Κρυσταλλογραφικές μελέτες είναι σε εξέλιξη για την ταυτοποίηση της βιοδραστικής ουσίας των εκχυλισμάτων αυτών. Το τρίτο εκχύλισμα από *Rubus Sanctus* από τις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, αποδείχτηκε ότι δεν υπάρχει αναστολή του ενζύμου.

Οι διαφορές στην ανασταλτική επίδραση των αναστολέων από τα φυτικά εκχυλίσματα πιθανότατα οφείλεται στη χημική σύσταση τους δημιουργώντας έτσι διαφορετικούς βαθμούς συγγένειας με το κέντρο σύνδεσης τους στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Για να γίνει πιο αναλυτική η ταυτοποίηση της δομής των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων *Rosaceae* μπορεί να γίνει η κρυσταλλογραφική μελέτη συμπλόκων τους με το ένζυμο, όπου θα αναλυθεί περαιτέρω η σύνδεση της δραστικής ουσίας στη GP, καθώς και οι βιοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο. Επίσης μπορεί να μελετηθεί η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων σε κυτταρικό επίπεδο.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Αθανάσιος Σμοκοβίτης, 2007, *Φυσιολογία*, 5<sup>η</sup> έκδοση, Εκδοτικός Οίκος Αφои Κυριακίδη
2. William J Marshall, Stephen K. Bangert *Κλινική Χημεία* ISBN 978-960-489-056-9
3. Stryer L., J.M. Berg, J.L.Tymoczko 2012, *Βιοχημεία*, Έκδοση 5<sup>η</sup>, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
4. Γεωργατσός Γ. Ιωάννης, Κυριακίδης Α. Δημήτριος, Γιουψάνης Α. Τραϊανός, *Ενζυμολογία*, ISBN13 9789604317486, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, Νοέμβριος 2001.
5. Σωτήριος Α. Ράπτης, 1998, *Εσωτερική Παθολογία*, Τόμος IV, Επιστημονικές Εκδόσεις «Γρηγόριος Παρισιανός» Μαρία Γρ. Παρισιανού, Αθήνα
6. Αιμιλία Ζίφα *Διακυτταρική Επικοινωνία-Μεταγωγή Σήματος*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, Φεβρουάριος 2012
7. Abbas E. Kitabchi , Guillermo E. Umpierrez, Rupal Patel Mansukhani<sup>1,2</sup>, Lucio R. Volino<sup>1,3</sup>, Rozena Varghese<sup>4</sup> *Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus* Pharmacology & Pharmacy, 2014, 5, 487-503
8. John M. Miles and Joseph N. Fisher *Hyperglycemic Crises in Adult Patients With Diabetes* Diabetes Care. Jul 2009; 32(7): 1335–1343
9. I.World Health Organization. II.International Diabetes Federation *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia* : report of a WHO/IDF consultation. ISBN 92 4 159493 4 ISBN 978 92 4 159493 6
10. American Diabetes Association *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*
11. International Diabetes Federation *IDF Diabetes Atlas* ISBN: 2-930229-85-3
12. David E. Moller *New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome*, Nature, 2001
13. Halim Eshirat M. Ali Hussain *Hypoglycemi, hypolipidemic and antioxidant properties of combination of curcumin from Curcuma Longa, Linn, and partially purified product from Abroma Augusta, Linn. in Streptozotocin Induced Diabetes*. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2002, 17 (2), 33-43
14. Kubisch, C., Wicklein, E. M., Jentsch, T. J. Molecular diagnosis of McArdle disease: revised genomic structure of the myophosphorylase gene and identification of a novel mutation. Hum. Mutat. 12: 27-32, 1998. [PubMed: [9633816](#)]
15. Gautron, S., Daegelen, D., Mennecier, F., Dubocq, D., Kahn, A., Dreyfus, J.-C. Molecular mechanisms of McArdle's disease (muscle glycogen phosphorylase deficiency). J. Clin. Invest. 79: 275-281, 1987. [PubMed: [3466902](#), related citations]
16. P. Daisy and Feril G. Jeeva Kani *Evaluation of Antidiabetic Activity Of Various Extracts Of Cassia Aurilicata Linn. Bark on Streptozotocin- Induced Diabetic Wistar Rats* ISSN-0975-1491
17. Christopher B. Newgard, Peter K. Hwang Robert J. Fletterick *THE FAMILY OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASES: STRUCTURE AND FUNCTION* Volume 24, Issue 1 (1989)
18. William H. Martin, Dennis J. Hoover, Sandra J. Armento, Igrid A. Stock, R.Kirk McPherson, Dennis E. Danley, Ralph W. Stevenson, Eugene J. Barretti, and Judith L.

- Treadway *Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, pp. 1776–1781, February 1998
19. Laura J. Hampson and Lorraine Agius *Increased Potency and Efficacy of Combined Phosphorylase Inactivation and Glucokinase Activation in Control of Hepatocyte Glycogen Metabolism*
  20. David J. Baker,<sup>1</sup> Paul L. Greenhaff,<sup>1</sup> Alan MacInnes,<sup>2</sup> and James A. Timmons<sup>3</sup> *The Experimental Type 2 Diabetes Therapy Glycogen Phosphorylase Inhibition Can Impair Aerobic Muscle Function During Prolonged Contraction*
  21. R.J. Fleiterick, J. Sygusch, H. Semple, and N.B. Madsen *Structure of Glycogen Phosphorylase a at 3.0Å resolution and Its Ligand Binding Sites at Received for publication, July 9, 1976, and in revised form, August 16, 1976*
  22. L. N. Johnson *Glycogen Phosphorylase: Control by Phosphorylation and allosteric effectors*. Laboratory of Molecular Biophysics, University of Oxford, Oxford, OX1 3QU England.
  23. Louise N Johnson and David Barford. *Glycogen Phosphorylase. The structural Basis of the Allosteric Response and comparison with other Allosteric Proteins* Vol. 265, No. 5, Issue of February 15, pp. 2409-2412, 1990
  24. Aiston,<sup>1</sup> Birgitte Andersen, and Lorraine Agius<sup>1</sup> *Glucose 6-Phosphate Regulates Hepatic Glycogenolysis Through Inactivation of Phosphorylase* DIABETES, VOL. 52, JUNE 2003
  25. Nikos G. Oikonomakos *Glycogen Phosphorylase as a Molecular Target for Type 2 Diabetes Therapy Current Protein and Peptide Science, 2002, 3, 561-586*
  26. D. Barford and L.N. Johnson *The molecular mechanism for the tetrameric association of glycogen phosphorylase promoted by protein phosphorylation Protein Science (1992). 1, 472-493*
  27. Peter J. Parker, F Barq Caudwell, and Philip Cohen *Glycogen Synthase from Rabbit Skeletal Muscle; Effect of Insulin on the State of Phosphorylation of the Seven Phosphoserine Residues in vivo Eur. J. Biochem. 130, 227-234 (1983)*
  28. Nikos G Oikonomakos, Vicky T Skamnaki<sup>1</sup>, Katerina E Tsitsanou, Nikos G Gavalas and Louise N Johnson<sup>2</sup> *A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions* 0969-2126/00
  29. Virginia L Rath , Mark Ammirati , Dennis E Danley , Jennifer L Ekstrom , E Michael Gibbs , Thomas R Hynes , Alan M Mathiowetz , R Kirk McPherson , Thanh V Olson , Judith L Treadway and Dennis J Hoover *Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site Chemistry & Biology 2000, 7:677-682*
  30. Hitesh B. Vaidya, Abeer A. Ahmed, Ramesh K. Goyal and Sukhinder K. Cheema *Glycogen Phosphorylase-a is a Common Target for Anti-Diabetic Effect of Iridoid and Secoiridoid Glycosides* 16(4) 530 - 540, 2013
  31. Adolfo Andrade-Cetto *Effects of medicinal plant extracts on gluconeogenesis Botanics: Targets and Therapy 2012:2 1–6*
  32. Darya Zibrova, Rolf Grempler, Rüdiger Streicher and Stefan G. Kauschke *Inhibition of the interaction between protein phosphatase 1 glyco-targeting subunit and glycogen phosphorylase increases glycogen synthesis in primary rat hepatocytes Biochem. J. (2008) 412, 359–366 (Printed in Great Britain)*
  33. Eva Bokor, Tibor Docsa, P. Gergely, and Laszlo Somsak *C-Glucopyranosyl-1,2,4-triazoles As New Potent Inhibitors of Glycogen Phosphorylase*

34. L. Somsák, K. Czifrák, M. Tóth<sup>1</sup>, É. Bokor, E.D. Chrysina<sup>2</sup>, K.-M. Alexacou, J.M. Hayes, C. Tiraidis<sup>2</sup>, E. Lazoura<sup>2</sup>, D.D. Leonidas, S.E. Zographos and N.G. Oikonomakos *New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15, 2933-2983
35. David J. Baker,<sup>1</sup> James A. Timmons,<sup>2</sup> and Paul L. Greenhaff *Glycogen Phosphorylase Inhibition in Type 2 Diabetes Therapy A Systematic Evaluation of Metabolic and Functional Effects in Rat Skeletal Muscle*
36. Nikos G Oikonomakos & László Somsák *Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design Current Opinion in Investigational Drugs* 2008 9(4):379-395
37. W.L Li, H.C. Zheng, J. Bukuru, N.De Kimpe *Natural Medicines Used In Traditional Chinese Medical System for therapy of Diabetes Mellitus Journal of Ethnopharmacology* 92 (2004) 1-21
38. Anastassia L. Kantsadi , Anna Apostolou , Stavroula Theofanous , George A. Stravodimos , Efthimios Kyriakis , Vyron A. Gorgogietas , Demetra S.M. 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
39. Nafisa PC Fernandes, Chakradhar V Lagishetty, Vandana S Panda and Suresh R Naik An experimental evaluation of the antidiabetic and antilipidemic properties of a standardized Momordica charantia fruit extract *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2007, 7:29
40. Yasmin Hilmi, Muna F Abushama<sup>1</sup>, Haidar Abdalgadir, Asaad Khalid and Hassan Khalid A study of antioxidant activity, enzymatic inhibition and in vitro toxicity of selected traditional sudanese plants with anti-diabetic potential Hilmi et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014, 14:149
41. Shivani Saini\*, Sunil Sharma *Antidiabetic Effect Of Helianthus Annuus L., Seeds Ethanolic Extract In Streptozotocin- Nicotinamide Induced Type 2 Diabetes Mellitus International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences ISSN- 0975-1491 Vol 5, Issue 2, 2013*
42. Cicero L. T. Chang,<sup>1</sup> Yenshou Lin,<sup>2</sup> Arlene P. Bartolome,<sup>3,4</sup> Yi-Ching Chen,<sup>4</sup> Shao-Chih Chiu,<sup>5,6</sup> and Wen-Chin Yang *Herbal Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: Chemistry, Biology, and Potential Application of Selected Plants and Compounds Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2013, Article ID 378657, 33 pages*
43. Adeneye Adejuwon Adewale<sup>1,2</sup>, Crooks Peter Anthony<sup>2</sup>, Fadhel-Albayati Zaine<sup>2</sup>, Miller Anne- Frances<sup>3</sup>, Zito S. Williams<sup>4</sup>, Adeyemi Olufunmilayo Olaide<sup>5</sup>, Agbaje Esther Oluwatoyin<sup>5</sup> *ANTIHYPERGLYCEMIC PROFILE OF ERINIDINE ISOLATED FROM HUNTERIA UMBELLATA SEED Adeneye et al., Afr J Tradit Complement Altern Med. (2013) 10(2):189-202*
44. Nikos G. Oikonomakos, Magda N. Kosmopoulou, Evangelia D. Chrysina, Demetres D. Leonidas, Ioannis D. Kostas, K. Ulrich Wendt, Thomas Klabunde and Elisabeth Debossa *Crystallographic studies on acyl ureas, a new class of glycogen phosphorylase inhibitors, as potential antidiabetic drugs Protein Science* (2005), 14:1760–1771

45. Sayed M. Rawi, Iman M. Mourad, Dawlat A.Sayed Biochemical changes in experimental diabetes before and after treatment with *mangifera indica* and *psidium guava* extracts *Int J Pharm Biomed Sci* 2011, 2(2), 29-41 ISSN No: 0976-5263
46. Gogu GHIORGIȚĂ, N. Antohe, Ioan Viorel RAȚI, Diana-Elena Maftai *The Study Of Some Parameters Of Rosa Canina L. Genotypes From Different Native Populations and From The Same Population* ISSN: 1223-6578, E-ISSN: 2247-2711
47. C. DURMUŞKAHYA & M. ÖZTÜRK Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants Used for the Treatment of Diabetes in Manisa, Turkey *Sains Malaysiana* 42(10)(2013): 1431–1438
48. Yvonne E Granfeldt\* and Inger ME Björck *A bilberry drink with fermented oatmeal decreases postprandial insulin demand in young healthy adults* Granfeldt and Björck *Nutrition Journal* 2011, 10:57
49. Miao Hu, Weiwei Zeng, and Brian Tomlinson Evaluation of a *Crataegus*-Based Multiherb Formula for Dyslipidemia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial Volume 2014, Article ID 365742, 9 pages
50. Dinesh Kumar, Vikrant Arya, Zulfi qar Ali Bhat, Nisar Ahmad Khan, Deo Nandan Prasad The genus *Crataegus*: chemical and pharmacological perspectives *Brazilian Journal of Pharmacognosy* ISSN 0102-695X
51. Catrinel Florentina Giurescu Bedreag, Adriana Trifan, Laura Adriana Bucur, Mariana Arcus, Carmen Tebrencu, Anca Miron, Irina Iuliana Costache *Chemical and antioxidant studies on Crataegus pentagyna leaves and flowers* *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 19, No.6, 2014
52. Ipek Suntar, Ufuk Koca, Hikmet Keles, and Esra K"upeli Akkol *Wound Healing Activity of Rubus sanctus Schreber (Rosaceae): Preclinical Study in Animal Models* *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2011, Article ID 816156, 6 pages
53. N Orhan, M Aslan, S Hosbas, Orhan D Deliorman *Antidiabetic Effect and Antioxidant Potential of Rosa canina Fruits* Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 06330 Hipodrom-Ankara, Turkey
54. Clifford J Bailey, Caroline Day *Traditional Plant Medicines As Treatment for Diabetes* *Diabetes Care*, Vol 12 No8, September 1989