



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

« ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΜΠΕΛΟΚΟΜΙΑΣ »



Πέγιου Καλλιόπη

Θέμα : « Αξιολόγηση της υπογλυκαιμικής δράσης εκχυλισμάτων αμπελοκομίας »

Subject : « Assessment of polyphenolic extracts from Vitis Vinifera for hypoglycemic action »

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- Δρ. Δημήτριος Δ. Λεωνίδας

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά

Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Δρ. Μαρία Κοντού

Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract.....	6
1 Εισαγωγή.....	8
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	8
1.2 Τύποι σακχαρώδους διαβήτη.....	10
1.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ινσουλινο-εξαρτώμενος, IDDM).....	10
1.2.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (μη ινσουλινο-εξαρτώμενος, NIDDM).....	11
1.3 Ομοιοστασία της γλυκόζης.....	13
1.3.1 Ινσουλίνη – Γλυκαγόνη.....	14
2 Βασικές γνώσεις.....	19
2.1 Γλυκόζη.....	19
2.2 Γλυκογόνο.....	21
2.2.1 Ρόλος του γλυκογόνου.....	23
2.2.2 Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	23
2.3 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP).....	27
2.3.1 Γενικά.....	27
2.3.2 Η PLP συμμετέχει στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου.....	28
2.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	30
2.4.1 Γενικά.....	30
2.4.2 Δομή.....	31
2.4.3 Μηχανισμός δράσης.....	32
2.4.4 Ρύθμιση.....	33
2.4.5 Κρυσταλλική δομή και κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	39
2.5 Κινητική ενζύμων και ενζυμική αναστολή	44
2.6 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	51

2.7	Vitis Vinifera.....	52
3	Πειραματικό μέρος.....	54
3.1	Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού.....	54
3.2	Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	59
3.2.1	Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου.....	59
3.2.2	Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (Km).....	60
3.2.3	Προσδιορισμός IC ₅₀ αναστολέα.....	62
3.3	Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b.....	63
3.4	Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης.....	64
3.5	Παρασκευή τυφλών.....	67
3.6	Προσδιορισμός φωσφόρου.....	68
3.7	Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit.....	69
3.8	Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων της Grb.....	72
4	Αποτελέσματα.....	74
4.1	Αποτελέσματα απομόνωσης της GPb.....	74
4.2	Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	75
4.3	Κινητική μελέτη εκχυλίσματος σταφυλιών.....	76
5	Συμπεράσματα.....	81
	Βιβλιογραφία.....	82

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Λειτουργικής και Δομικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2012- Δεκέμβριος 2012.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, που με δέχτηκε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία και υπό την καθοδήγησή την ολοκλήρωσα με επιτυχία. Οι γνώσεις του, η εμπειρία του, η προθυμία του και η βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς επίσης και η υπομονή που έδειξε ήταν πολύτιμες.

Ευχαριστώ επίσης την Δρ. Κοντού Μαρία και την Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία για τη συνεργασία τους μαζί μου.

Θα ήθελα να εκφράσω επίσης τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή Σ. Χαρουτουγιάν και στο εργαστήριό του στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την προσφορά των εκχυλισμάτων των υποπροϊόντων οινοποίησης του *Vitis vinifera*.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω και θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Π.Θ., Αναστασία Καντσάδη, η οποία μου προσέφερε την πολύτιμη βοήθειά της και μου έμαθε πολλά καθ' όλη την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, παρά τις υποχρεώσεις της στο εργαστήριο. Η υπομονή και η βοήθειά της στο εργαστήριο ήταν σημαντικές.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, καθώς και όσους βοήθησαν και συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στη διεκπεραίωση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Εύχομαι σε όλους μια σταθερά ανοδική πορεία στον τομέα τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ), μια από τις σοβαρότερες μεταβολικές και ορμονικές διαταραχές του δυτικού κόσμου, χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και από διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης, δηλαδή όταν τα επίπεδα σακχάρου (γλυκόζης) στο αίμα δεν διατηρούνται σταθερά. Είναι αποτέλεσμα είτε της ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε της ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Η θεραπευτική προσέγγιση έγκειται στη διατήρηση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα όσο το δυνατόν πιο κοντά στα φυσιολογικά. Για το σκοπό αυτό, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για την εύρεση φυσικών μορίων που εκλεκτικά θα τα ενεργοποιούν ή θα τα απενεργοποιούν με τελικό στόχο τη ρύθμιση των επιπέδων του σακχάρου στον οργανισμό. Προς αυτήν την κατεύθυνση, το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, απομονώσαμε το ένζυμο φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μύες κουνελιού και μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση φυσικών εκχυλίσματων από βόστρυχους και γίγαρτα διαφόρων ποικιλιών του *Vitis vinifera*, στην ενζυμική δραστηριότητα. Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι τα εκχυλίσματα αυτά αναστέλλουν την δραστηριότητα του ενζύμου με σταθερές αναστολής, να κυμαίνονται από 4.9 έως 8.15 $\mu\text{g/mL}$.

ABSTRACT

Diabetes mellitus, one of the most serious hormonal imbalance diseases, is characterized by elevated blood glucose levels (hyperglycemia) and glucose metabolism imbalance, which means that blood levels of glucose do not

remain stable. This is caused, either as a result of decreased insulin secretion or because of decrease in body cells sensitivity to insulin. The main goal in diabetes treating is to keep blood sugar as close as possible to normal limits. For that reason, enzymes involved in the regulation of blood glucose levels are promising molecular targets for the discovery of molecules, which will modulate their activity. In this way, glycogen phosphorylase being a key enzyme in glycogen metabolism, constitutes one of the most important molecular targets for designing new hypoglycemic drugs.

In the present study, we purified glycogen phosphorylase b from rabbit skeletal muscles and studied by kinetic experiments, the effect of extracts from bunches and seeds from Greek varieties of *Vitis vinifera*, on its enzymatic activity. Kinetic experiments were performed in the direction of glycogen synthesis and, they showed that the extracts display a moderate inhibitory potency on the enzymic activity with IC₅₀ values ranging between 4.9 - 8.15 µg/mL

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

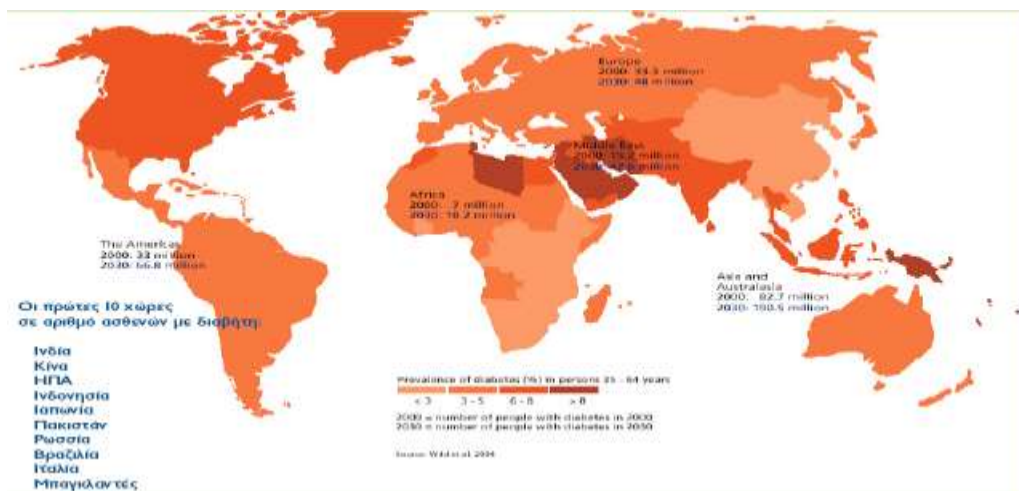
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα. Πρόκειται για μια μεταβολική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και από διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, είτε ως αποτέλεσμα ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε λόγω ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη που εκκρίνεται από το πάγκρεας και είναι απαραίτητη για τη μεταφορά της γλυκόζης που λαμβάνεται από τις τροφές, μέσα στα κύτταρα. Όταν το πάγκρεας δεν παράγει αρκετή ινσουλίνη ή η ινσουλίνη που παράγει δεν δρα σωστά, τότε η γλυκόζη που λαμβάνεται από τις τροφές δεν εισέρχεται στα κύτταρα ώστε να έχουν την απαραίτητη ενέργεια για τη λειτουργία τους και παραμένει στο αίμα με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της και άρα την εκδήλωση της νόσου. Ο διαβήτης δεν είναι μια ενιαία ασθένεια, αλλά αντιπροσωπεύει πολλές διαφορετικές ασθένειες με εντελώς διαφορετικό φαινότυπο, με κοινό χαρακτηριστικό όλων τα υψηλά επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Ο διαβήτης είναι ένας από τους πιο ισχυρούς παράγοντες κινδύνου για παθήσεις στα αγγεία της καρδιάς και του αίματος, όπως: καρδιακή προσβολή, στηθάγχη, εγκεφαλικό επεισόδιο και νεφρική βλάβη. Στα κλασσικά συμπτώματα του σακχαρώδους διαβήτη περιλαμβάνονται η υπεργλυκαιμία, η γλυκοζουρία, η πολυουρία, η πολυδιψία, η πολυφαγία, η ξαφνική απώλεια σωματικού βάρους, η έντονη κούραση, η θολή όραση, το μούδιασμα των άκρων, η αργή επούλωση των πληγών, σεξουαλικά προβλήματα και κολπικές μολύνσεις. [20]

Ο σακχαρώδης διαβήτης διακρίνεται σε τρεις κύριες κατηγορίες. Οι κύριοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη είναι ο διαβήτης τύπου 1, ο διαβήτης τύπου 2 και ο διαβήτης της κύησης, με τον διαβήτη τύπου 2 να διαγιγνώσκεται στο 90-

95% των διαβητικών ασθενών. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, μέχρι το 2030 περισσότερα από 300 εκατομμύρια άνθρωποι θα έχουν εκδηλώσει σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, ο οποίος αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως καθώς συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά επεισόδια και άλλες σοβαρές επιπλοκές (χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, τύφλωση και ακρωτηριασμοί). [21]



Εικόνα 1: Η διασπορά των ασθενών με διαβήτη παγκοσμίως και ο προβλεπόμενος αριθμός πασχόντων το 2030.

[Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας]

Τα αίτια του σακχαρώδους διαβήτη δεν έχουν αποσαφηνιστεί ακόμα. Φέρεται να εμπλέκονται τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες (κάπνισμα, έλλειψη άσκησης, καθιστική ζωή, αυξημένο σωματικό βάρος), οι οποίοι ευθύνονται και για τις επιπλοκές του διαβήτη είτε πρόκειται για οξείες, όπως η διαβητική κετοξέωση, και το διαβητικό κώμα, υπερωσμωτικό μη κετωτικό κώμα και η υπογλυκαιμία (επιπλοκή της θεραπείας), είτε για χρόνιες όπως είναι η διαβητική μικροαγγειοπάθεια και διαβητική μακροαγγειοπάθεια (αρτηριοσκλήρυνση, στεφανιαία νόσος).

Όσον αφορά τη διάγνωση, η έγκαιρη διάγνωση είναι σημαντική, ώστε ο διαβητικός να ακολουθήσει ορισμένη θεραπεία, όχι μόνο για την ανακούφιση των συμπτωμάτων αλλά και για την αποφυγή ή καθυστέρηση ανάπτυξης χρόνιων επιπλοκών. Είναι εύκολη όταν υπάρχουν τα κλασικά συμπτώματα και αρκεί η επιβεβαίωση με τη μέτρηση του σακχάρου του αίματος (τιμή γλυκόζης σε οποιαδήποτε στιγμή $> 200\text{mg/dl}$). Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος πραγματοποιείται το τεστ ανοχής γλυκόζης όπου λαμβάνονται, η τιμή της γλυκόζης νηστείας (που λαμβάνεται δηλαδή μετά από

τουλάχιστον 8 ώρες αποχής από την πρόσληψη τροφής) και η τιμή της γλυκόζης 2 ώρες μετά τη χορήγηση 75g γλυκόζης από του στόματος.

Η θεραπεία του διαβήτη (δεν είναι μόνιμη) έγκειται στον έλεγχο των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα μέσω κατάλληλης διατροφής, διακοπή καπνίσματος, μείωση σωματικού βάρους με παράλληλη άσκηση και χορήγησης ινσουλίνης. Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη που παράγεται από το πάγκρεας.

Παίζει κύριο ρόλο στο μεταβολισμό (στη διαχείριση) των συστατικών της τροφής, δηλαδή των λιπών, των πρωτεϊνών και κυρίως των υδατανθράκων (όπως είναι η γλυκόζη).

Ο συνηθέστερος τρόπος χορήγησης της ινσουλίνης είναι η υποδόρια χορήγηση. Ο τύπος ινσουλίνης, η δόση και η συχνότητα χορήγησης εξαρτώνται αποκλειστικά από τις ανάγκες του εκάστοτε ασθενούς. Για το λόγο αυτό, το σχήμα της ινσουλινοθεραπείας είναι απόλυτα εξατομικευμένο. Εκτός από την ινσουλίνη, υπάρχουν και άλλες φαρμακολογικές θεραπευτικές επιλογές, οι περισσότερες από τις οποίες είναι σε μορφή ταμπλέτας. [18]

1.2 Τύποι σακχαρώδους διαβήτη

1.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ινσουλινο-εξαρτώμενος, IDDM)

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 θεωρείται μια χρόνια αυτοάνοση νόσος που χαρακτηρίζεται από καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα να υπάρχει ολική έλλειψη ή ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης. Υπό αυτή την έννοια, ο ασθενής με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 είναι απόλυτα εξαρτημένος από τη εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης προκειμένου τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα του να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα. Ο τύπος αυτός αποτελεί την κυριότερη αιτία διαβήτη σε παιδιά και σε νέα άτομο ηλικίας κάτω των 30 ετών, γι' αυτό και του αποδόθηκε ο όρος «νεανικός διαβήτης», με αποκορύφωση κυρίως τις ηλικίες μεταξύ 5-15 ετών.

Στον διαβήτη τύπου 1 απουσιάζει η ινσουλίνη με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της γλυκαγόνης να βρίσκεται σε υψηλότερο επίπεδο από το φυσιολογικό. Επειδή υπάρχει ανεπάρκεια ινσουλίνης, παρεμποδίζεται η είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα. Το ήπαρ παραμένει σε κατάσταση γλυκονεογένεσης και κετογένεσης ενώ αναστέλλεται η γλυκόλυση.

Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 1 συνήθως εμφανίζονται απότομα και εξελίσσονται γρήγορα. Τα κλασικά συμπτώματα του διαβήτη τύπου 1 περιλαμβάνουν: πολυουρία, πολυδιψία, ξηροστομία, πολυφαγία, κόπωση και απώλεια βάρους. Πριν ένα άτομο συνειδητοποιήσει ότι έχει διαβήτη, τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα είναι πολύ υψηλά για μεγάλες χρονικές περιόδους, κατάσταση η οποία μπορεί να προκαλέσει διαβητική κετοξέωση. Αυτή μπορεί να εκδηλωθεί με συμπτώματα όπως ξηροδερμία, γρήγορη και βαθιά αναπνοή, υπνηλία, απώλεια συνείδησης, κοιλιακό άλγος και έμετος.[17]

Θεωρείται ότι προκαλείται από γενετική προδιάθεση, διαβητογόνους παράγοντες και/ή έκθεση σε ένα οδηγό αντιγόνο. Τα αίτια όμως του διαβήτη τύπου 1 δεν είναι πλήρως γνωστά. Τις περισσότερες φορές το ανοσολογικό σύστημα του οργανισμού επιτίθεται και καταστρέφεται το μέρος του παγκρέατος που παράγει ινσουλίνη. Ακόμα η κληρονομικότητα παίζει σημαντικό ρόλο αλλά σε ένα πολύ μικρό ποσοστό περιπτώσεων σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1. Πιστεύεται ότι άτομα που πάσχουν από άλλες αυτοάνοσες νόσους που επηρεάζουν ορμόνες όπως ο υποθυρεοειδισμός διατρέχουν μεγάλο κίνδυνο να προσβηθούν και από διαβήτη τύπου 1. Υπάρχει όμως και η μερίδα ασθενών με διαβήτη τύπου 1 στους οποίους δεν ανιχνεύονται αυτοαντισώματα. Ο τύπος αυτός ονομάζεται ιδιοπαθής σακχαρώδης διαβήτης. Οι ασθενείς είναι απόλυτα εξαρτημένοι από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης (ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης) προκειμένου τα επίπεδα σακχάρου του αίματος να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα. Έτσι απαιτείται η δια βίου χορήγηση ινσουλίνης.

1.2.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (μη ινσουλινο-εξαρτώμενος, NIDDM)

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 προσβάλλει ενήλικες κυρίως άνω των 40 ετών (γνωστός και ως διαβήτης ενηλίκων), χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα κυρίως όταν είναι παχύσαρκα. Είναι ο πιο κοινός τύπος διαβήτη αντιστοιχώντας σε περισσότερο

από το 90% των πασχόντων. Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου 1, στον οποίο η ινσουλίνη απουσιάζει παντελώς, στο διαβήτη τύπου 2, το πάγκρεας παράγει ινσουλίνη. Η ινσουλίνη που παράγεται μπορεί να είναι ανεπαρκής σε ποσότητα για τις ανάγκες του οργανισμού ή ο οργανισμός να μην μπορεί να τη χρησιμοποιεί αποτελεσματικά, με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται το σάκχαρο σαν κύρια πηγή ενέργειας.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα των ιστών να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη και τα επαγόμενα αποτελέσματα της δράσης της. Η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται –σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου 1 - από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου 2 ονομάζεται και "**μη ινσουλινοεξαρτώμενος**". Συνεπώς, η θεραπεία χορήγησης ινσουλίνης δεν είναι πάντοτε απαραίτητη. [19]

Στα πρώτα στάδια της νόσου, η ελαττωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη είναι η κύρια διαταραχή, ενώ τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα είναι αυξημένα. Τα αίτια αυτής της μορφής είναι άγνωστα. Στην ανάπτυξη του όμως συμβάλλουν διάφοροι προδιαθεσικοί παράγοντες όπως η παχυσαρκία, η ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό, με σπουδαιότερο την παχυσαρκία. Η παχυσαρκία προδιαθέτει στην ανάπτυξη ινσουλινοαντοχής πιθανόν λόγω της παραγωγής από το λιπώδη ιστό ουσιών που ελαττώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Επίσης, συνδέεται με την υπέρταση, την αυξημένη χοληστερόλη και το μεταβολικό σύνδρομο. Τα συμπτώματα εμφανίζονται σταδιακά και είναι πιο ήπια από αυτά του διαβήτη τύπου 1. Η πιθανότητα διαβητικής κετοξέωσης είναι μικρή, παρόλα αυτά ο κίνδυνος εμφάνισης επιπλοκών (νεφρική ανεπάρκεια, τύφλωση, στεφανιαία νόσο) παραμένει υψηλός.

Αρκετά συχνά τα συμπτώματα λείπουν τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής. Το πρώτο βήμα στη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 είναι η αλλαγή του τρόπου ζωής του ασθενούς με στόχο την απώλεια βάρους, την αύξηση της σωματικής άσκησης και την υγιεινή διατροφή. Εάν κριθεί απαραίτητο χρησιμοποιούνται αντιδιαβητικά σκευάσματα και αν δεν επιτευχθεί ο έλεγχος των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, χρησιμοποιούνται ενέσεις ινσουλίνης.

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις, ωστόσο έχουν αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών αποδεικνύονται και ανεπαρκείς. Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην διερεύνηση άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως για παράδειγμα ανταγωνιστές των υποδοχέων γλυκογόνου, αναστολείς της ηπατικής παραγωγής ινσουλίνης καθώς και συνδυαστικές θεραπείες.

Υπάρχει λοιπόν ένα σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών μέσων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου [1].

1.3 Γλυκόζη-Ομοιοστασία

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη. [2] Φυσιολογικά η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα κατά τις περιόδους νηστείας και μεταγευματικά διατηρείται σε στενό σχετικά εύρος ορίων μεταξύ 60-120 mg/dL.

Η ομοιοστασία της γλυκόζης εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ και της χρησιμοποίησής της, τόσο από ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο λιπώδης και ο μυϊκός ιστός, όσο και από μη ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος και ο νεφρικός ιστός.

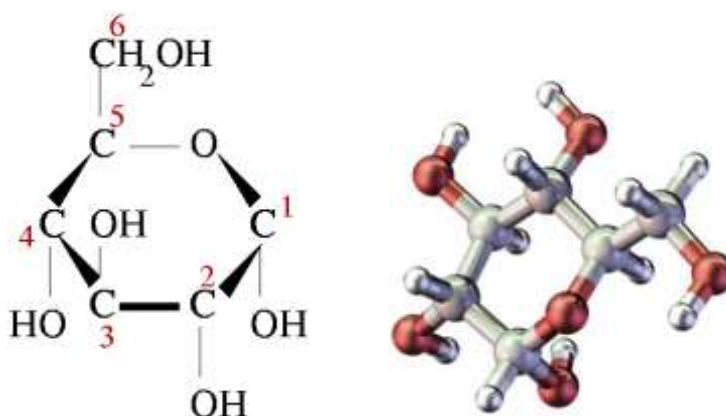
Η συγκέντρωση της κυκλοφορούσας γλυκόζης βρίσκεται υπό τον έλεγχο των παγκρεατικών ορμονών, ινσουλίνης και γλυκαγόνης. Η ινσουλίνη είναι η βασική ρυθμιστική ορμόνη σε φυσιολογικά εύρη των τιμών της γλυκόζης.

Η ομοιοστασία μεταξύ της παραγωγής και της κατανάλωσης της γλυκόζης επιτυγχάνεται μέσω τριών μηχανισμών:

Την ικανότητα του παγκρέατος να εκκρίνει ινσουλίνη, τόσο οξέος, όσο και σε συνεχόμενο ρυθμό.

Την ικανότητα της ινσουλίνης να αναστέλλει την έξοδο της ηπατικής γλυκόζης και να προωθεί την εναπόθεση της γλυκόζης στο ήπαρ (ευαισθησία ινσουλίνης).

1. Την ικανότητα της γλυκόζης να εισέρχεται στα κύτταρα απουσία ινσουλίνης (ευαισθησία γλυκόζης ή αποτελεσματικότητα γλυκόζης.[3]



Εικόνα : Απλή και τρισδιάστατη απεικόνιση ενός μορίου γλυκόζης

1.3.1 Ινσουλίνη – Γλυκαγόνη

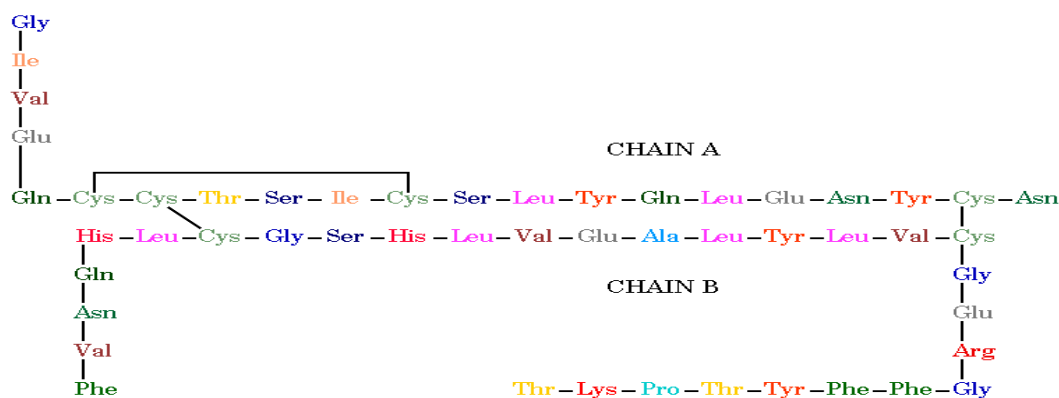
Η ινσουλίνη ρυθμίζει την συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα σε συνεργασία με την γλυκαγόνη. Αυτές οι 2 ορμόνες παράγονται ενδοκρινικά στο πάγκρεας με τη διαφορά ότι η γλυκαγόνη παράγεται στα α-κύτταρα. Ο

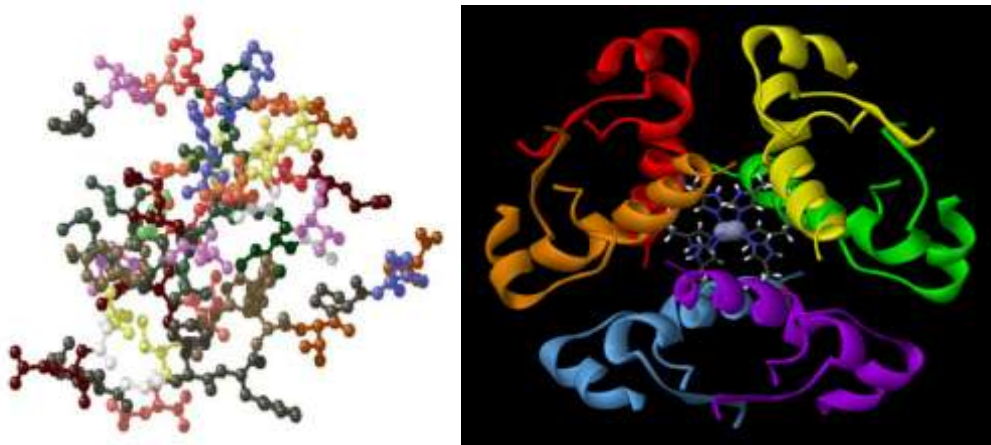
μηχανισμός δράσης τους είναι ακριβώς αντίστροφος, για αυτό μπορούμε να πούμε ότι αλληλορυθμίζονται μεταξύ τους. Η ινσουλίνη έχει αναβολική δράση και η γλυκαγόνη καταβολική. Είναι απαραίτητη η ισορροπία ανάμεσα στις 2 ορμόνες γιατί έτσι εξασφαλίζεται η καλή λειτουργία του οργανισμού.

Η ινσουλίνη είναι ορμόνη που παράγεται σε ειδική μοίρα του παγκρέατος (και συγκεκριμένα από ομάδες κυττάρων που ονομάζονται «νησίδια του Langerhans») ή Β-κύτταρα και εκκρίνεται απ' ευθείας στην κυκλοφορία του αίματος (ενδοκρινής ορμόνη). Αρχικά, παράγεται ένα πολυπεπτίδιο 11,5 kDa, η προ-προϊνσουλίνη, η οποία στο ενδοπλασματικό δίκτυο μετατρέπεται σε προ-ινσουλίνη (9 kDa). Στα κυστίδια του Golgi η προ-ινσουλίνη πέπτεται δίνοντας 2 μόρια: το πεπτίδιο C και την ώριμη πλέον, ενεργή, ινσουλίνη. Η ώριμη ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο περίπου 6 kDa, αποτελούμενη από 51 αμινοξέα, 21 αμινοξέα στην Α αλυσίδα και 30 στη Β.

Παίζει πρωτεύοντα ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων (σακχάρων) του οργανισμού. Είναι κυρίως ο ηπατικός, ο λιπώδης και ο μυϊκός, ωστόσο η ινσουλίνη παρεμβαίνει στην κυτταρική ανάπτυξη και μεταβολισμό των περισσότερων ιστών, βοηθώντας στην πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα.

(<http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%99%CE%BD%CF%83%CE%BF%CF%85%CE%BB%CE%AF%CE%BD%CE%B7>)





Εικόνα 2: Η ανθρώπινη ινσουλίνη (και τρισδιάστατη μορφή της)

Οι δράσεις της ινσουλίνης στο μεταβολισμό είναι: (1) Έλεγχος της πρόσληψης ορισμένων ουσιών και κυρίως της γλυκόζης από τους μυϊκούς και τους λιπώδεις ιστούς. (2) Ενίσχυση των μηχανισμών αντιγραφής του DNA και της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω ελέγχου της πρόσληψης αμινοξέων. (3) Τροποποίηση της δραστηριότητας πολλών ενζύμων.

Η δράση της στα κύτταρα περιλαμβάνει: (1) Ενίσχυση του μηχανισμού σύνθεσης γλυκογόνου και αποθήκευσής του. (2) Ενίσχυση των μηχανισμών σύνθεσης λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων στα λιπαρά κύτταρα. (3) Περιορίζει τη διάσπαση των πρωτεϊνών. (4) Περιορίζει τον σχηματισμό γλυκόζης από μη υδατανθρακικά μόρια. (5) Περιορίζει τις βλάβες που υφίστανται οργανίδια των κυττάρων. (6) Βελτιώνει την πρόσληψη αμινοξέων. (7) Βοηθά στην πρόσληψη καλίου από τα κύτταρα και έτσι μειώνει τη συγκέντρωσή του στο αίμα. (8) Χαλαρώνει το μυϊκό τόνο, αυξάνει τη ροή αίματος ιδιαίτερα μέσω των μικροαρτηριών. (9) Βοηθά στην έκκριση υδροχλωρικού οξέος από τα επιθηλιακά καλυπτήρια κύτταρα (parietal) του στομάχου.

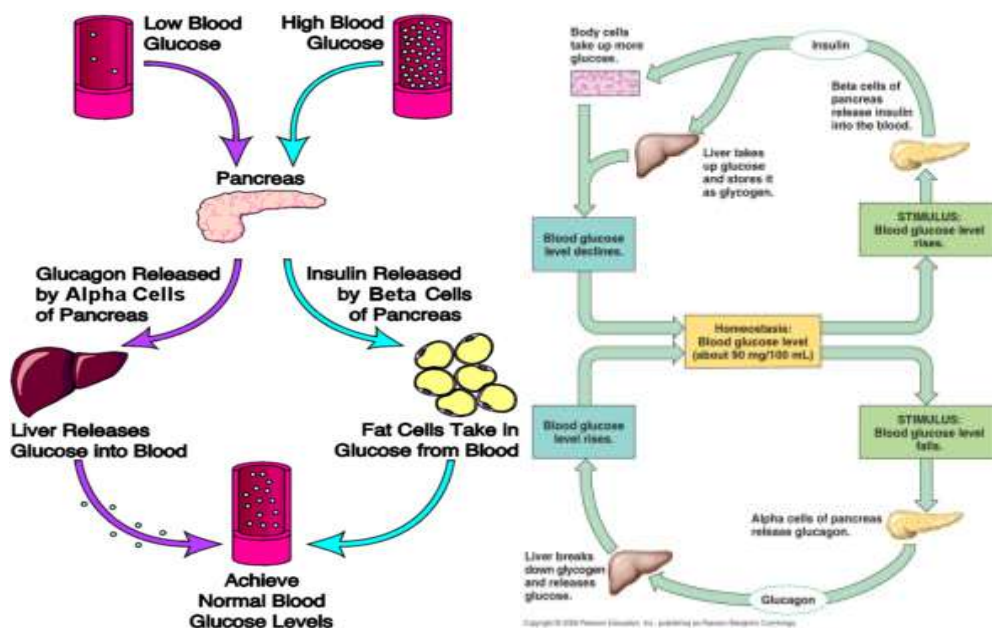
Ο φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης είναι να μειώνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Και αυτό γιατί αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης από τους μύς, το λιπώδη ιστό και από το ήπαρ, μειώνει το ρυθμό γλυκογονόλυσης (αποδόμηση του γλυκογόνου σε γλυκόζη), αυξάνει τη γλυκογονογένεση

να αυξήσει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Με άλλα λόγια, οι δύο αυτές ορμόνες (ινσουλίνη και γλυκαγόνη) έχουν αντίθετη δράση, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ρυθμιστική τους ικανότητα. Αποτελούν μέρος ενός συστήματος ανατροφοδότησης που κρατά τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα σε ένα σταθερό επίπεδο. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται ο γενικός μηχανισμός δράσης των εν λόγω ορμονών στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος.

Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα αυξηθούν πάνω από περίπου 5 mmol/L, τα β-κύτταρα του παγκρέατος διεγείρονται και εκκρίνουν ινσουλίνη με έναν αυξανόμενο ρυθμό αναλογικό με τη συγκέντρωση της γλυκόζης. Η ινσουλίνη με τη σειρά της, διευκολύνει την πρόσληψη της γλυκόζης από τα περισσότερα κύτταρα του οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα. Το ήπαρ προσλαμβάνει τη γλυκόζη και την αποθηκεύει με τη μορφή του γλυκογόνου. Όταν το ήπαρ κορεσθεί σε γλυκογόνο, η γλυκόζη κατευθύνεται προς το λιπώδη ιστό για σύνθεση λιπαρών οξέων. Με τη δράση της ινσουλίνης, τα κύτταρα αυτά, όταν χρειάζονται ενέργεια, χρησιμοποιούν γλυκόζη αντί για λιπαρά οξέα με αποτέλεσμα τη συσσώρευση λίπους στον οργανισμό. Επίσης η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη αμινοξέων για το σχηματισμό πρωτεϊνών, ενώ η έλλειψή της (σε περιόδους νηστείας) οδηγεί σε κατανάλωση και αλλοίωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών.

Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης πέσουν κάτω από τη συγκέντρωση των 4 mM, τα β-κύτταρα μειώνουν σημαντικά την έκκριση ινσουλίνης. Ταυτόχρονα τα α-κύτταρα εκκρίνουν γλυκαγόνη στο αίμα. Η γλυκαγόνη αυξάνει τα επίπεδα της γλυκόζης κυρίως μέσω της γλυκογονόλυσης και της γλυκονεογένεσης. Τα ηπατικά κύτταρα μετατρέπουν το γλυκογόνο σε μόρια γλυκόζης τα οποία και απελευθερώνει στην κυκλοφορία του αίματος. Τέλος, η γλυκαγόνη ενεργοποιεί και τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό αποδεσμεύοντας λιπαρά οξέα στην κυκλοφορία.

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι και οι δύο ορμόνες παράγονται φυσιολογικά στον οργανισμό σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο, και τα επίπεδά τους αυξομειώνονται ανάλογα με την κατανάλωση τροφής.



Εικόνα 4: Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί στην απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Αυτή, στο ήπαρ, προκαλεί τη σύνθεση γλυκογόνου με επακόλουθο, τη μείωση της συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα. Η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης από το πάγκρεας και προσλαμβάνεται από το ήπαρ. Εκεί η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης. Και οι δύο ορμόνες, στόχο έχουν να επαναφέρουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο φυσιολογικό.

2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

2.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη ή δεξτρόζη, είναι το πιο γνωστό σάκχαρο. Πρόκειται όπως προαναφέρθηκε, για έναν μονοσακχαρίτη που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου (δομή αλδόζης) με γενικό τύπο $C_6H_{12}O_6$. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης.

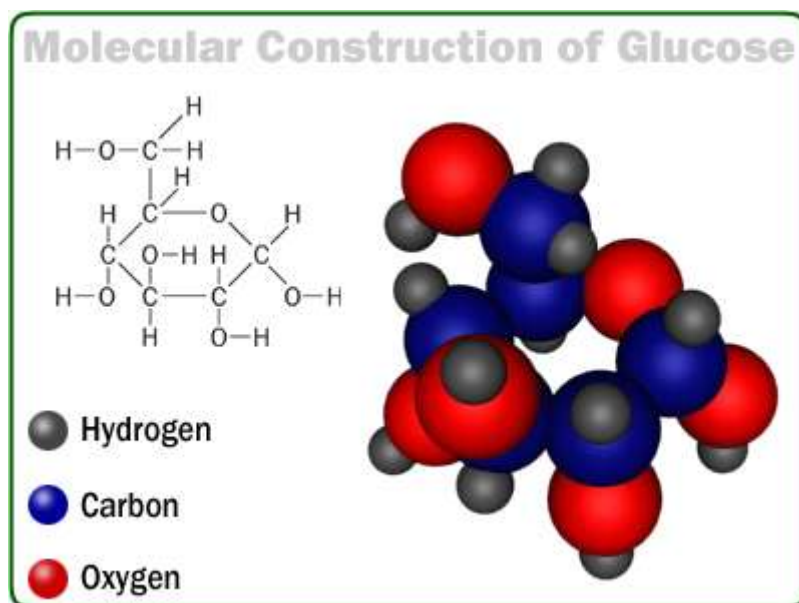
Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη. Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές κυρίως στα φρούτα και ειδικότερα 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 (π.χ. γλυκογόνο) αλλά και από μη υδατανθρακικές ενώσεις (π.χ. γαλακτικό οξύ). [4]. Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς (φυτικούς και ζωικούς), αφού ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως βασικό καύσιμο υλικό, ενώ τα ερυθροκύτταρα χρησιμοποιούν ως καύσιμο μόνο τη γλυκόζη. Έχει υπολογιστεί ότι, το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης.[4]. Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη [2].

Συνηθέστερα όμως 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.

Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης [4].

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το

γλυκογόνο σε γλυκόζη [24]. Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και τη διαιτητική κατάσταση του οργανισμού [4].

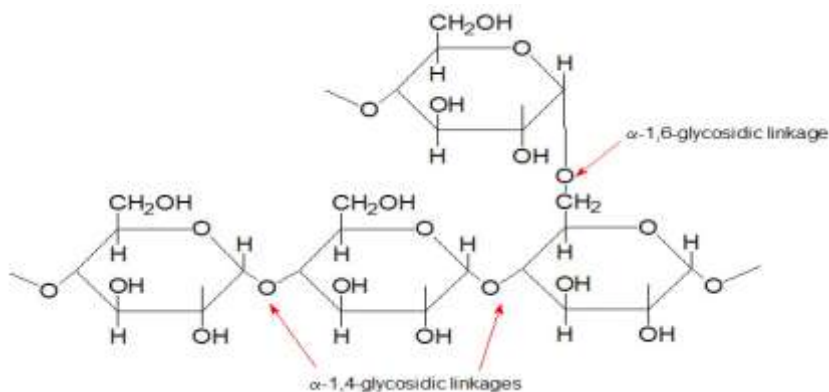


Εικόνα 5: Δομή γλυκόζης (συντακτική και τρισδιάστατη δομή)

2.2 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένας πολυσακχαρίτης, $(C_6H_{10}O_5)_n$, η κοινή ονομασία του οποίου είναι ζωικό άμυλο, που αποτελεί την αποθηκευτική μορφή της γλυκόζης στα κύτταρα (ήπαρ και μύες). Πρόκειται για ένα μεγάλο, διακλαδιζόμενο πολυμερές που αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης. Οι περισσότερες μονάδες της γλυκόζης στο γλυκογόνο είναι συνδεδεμένες με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4 και οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6, ανά 10 περίπου μόρια γλυκόζης. Ο σχηματισμός του γλυκογόνου από πηγές υδατανθράκων ονομάζεται γλυκογένεση· από μη υδατανθρακικές πηγές γλυκονεογένεση. Η μετατροπή του γλυκογόνου σε γλυκόζη ονομάζεται γλυκογονόλυση. Όταν τα επίπεδα γλυκόζης αίματος ελαττώνονται, το ήπαρ μετατρέπει το

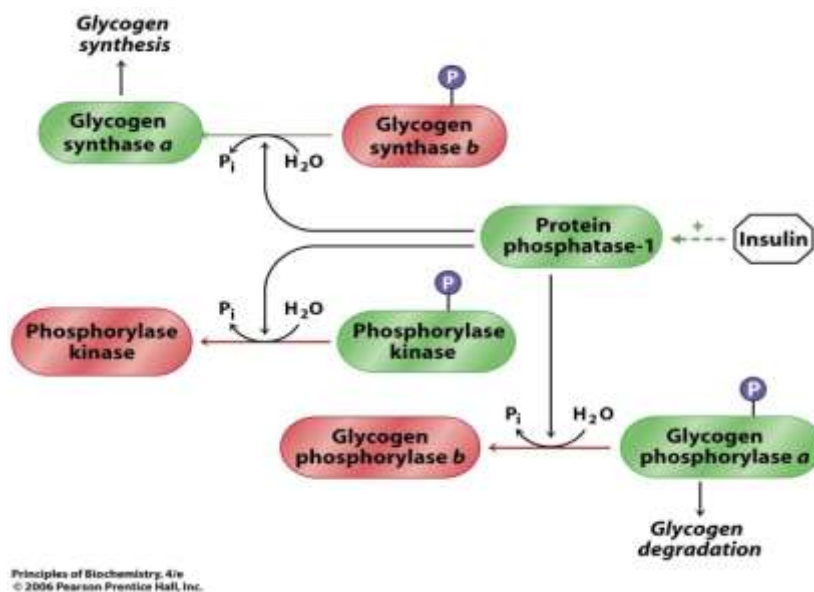
γλυκογόνο σε γλυκόζη· αυτή η διαδικασία διευκολύνεται από την ορμόνη γλυκαγόνη ή σε καταστάσεις στρες από την επινεφρίνη. Στα κύτταρα, η γλυκόζη υφίσταται οξείδωση προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενέργειας με τη μορφή ATP και θερμότητας. Στα μυϊκά κύτταρα σε αναερόβιες συνθήκες, η γλυκόζη μεταβολίζεται μόνο σε γαλακτικό οξύ και απαιτείται οξυγόνο για τη μετατροπή του γαλακτικού οξέος πάλι σε γλυκόζη, κυρίως στο ήπαρ.[13]



Εικόνα 6: Δομή του γλυκογόνου

Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωσή του είναι υψηλότερη στο ήπαρ παρά στους μύες (10% έναντι 2% κατά βάρος), αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύες συνολικά, λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους. Στο ήπαρ, η σύνθεση και η αποικοδόμησή του ρυθμίζονται ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα της γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως συνόλου. Αντίθετα, στους μύες οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών μόνο.

Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζονται αντίρροπα από τον, ορμονικά διεγερόμενο, καταρράκτη της κυκλικής AMP (μονοφωσφορικής αδενοσίνης) ο οποίος δρα μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A. Αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης εμποδίζει την σύνθεση του γλυκογόνου ταυτόχρονα με την αποικοδόμηση του και επιτρέπει στον μεταβολισμό του γλυκογόνου να προσαρμόζεται στις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού [2].



Εικόνα 7: Μονοπάτι ρύθμισης του γλυκογόνου (σύνθεση και αποικοδόμηση)

2.2.1 Ρόλος του γλυκογόνου

Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς, η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Ο ρόλος αυτός του γλυκογόνου είναι ιδιαίτερα σημαντικός, διότι η γλυκόζη είναι ουσιαστικά το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιείται από τον εγκέφαλο. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. [2]

2.2.1 Μεταβολισμός του γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου είναι σχετικά απλές διαδικασίες. Η αποικοδόμηση συνίσταται σε 3 βήματα:

- 1) Απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο
- 2) Ανακατασκευή του υποστρώματος γλυκογόνου για νέα αποικοδόμηση
- 3) Μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό

Η 6-φωσφορική γλυκόζη που προέρχεται από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου ακολουθεί 3 κατευθύνσεις. Μπορεί να αποτελέσει το υπόστρωμα για τη γλυκόλυση, να επεξεργαστεί με την πορεία των φωσφορικών πεντοζών προς απόδοση NADPH και παραγώγων της ριβόζης, ή τέλος, να μετατραπεί σε ελεύθερη γλυκόζη προς απελευθέρωση στην κυκλοφορία.

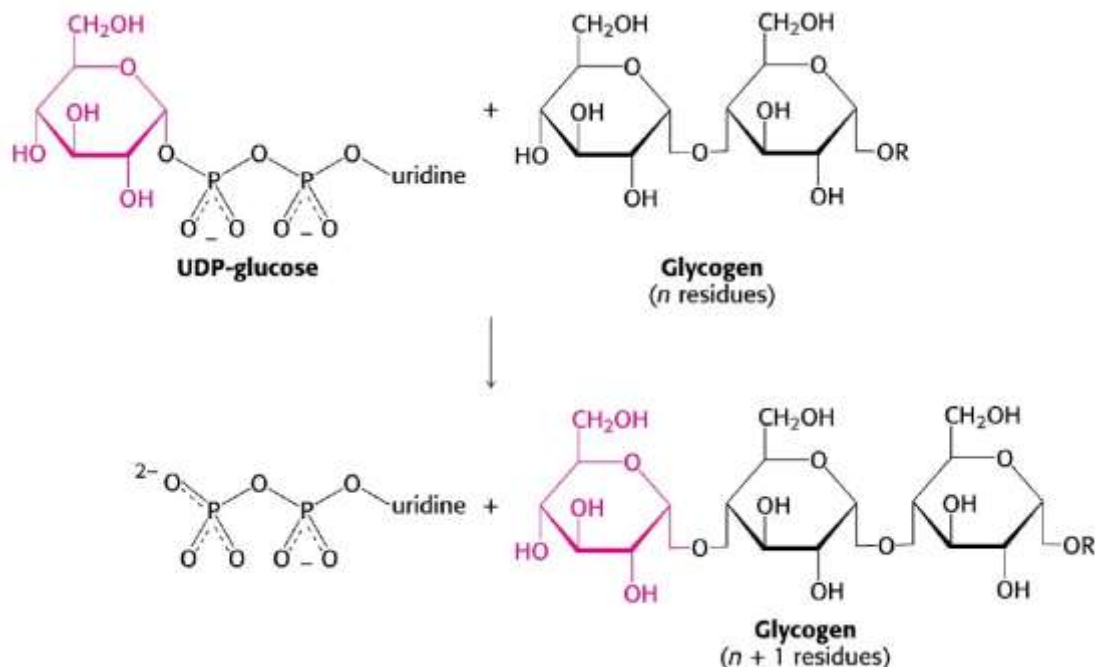
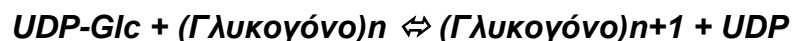
Η σύνθεση του γλυκογόνου χρειάζεται μια ενεργοποιημένη μορφή γλυκόζης, την ουριδινιφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη), η οποία παράγεται από την αντίδραση της UTP με 1-φωσφορική γλυκόζη. Η UDP-γλυκόζη προστίθεται στο μη αναγωγικό άκρο των μορίων γλυκογόνου, όπου τα μόρια θα πρέπει να ανακατασκευαστούν για να συνεχιστεί η σύνθεση.

Η ρύθμιση των διεργασιών αυτών είναι αρκετά πολύπλοκη και τα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου αποκρίνονται αλλοστερικά σε μεταβολίτες που σηματοδοτούν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου [2].

Σύνθεση του γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου απαιτεί ένα μόριο εκκινητή, ένα εναρκτήριο μόριο (τουλάχιστον τεσσάρων καταλοίπων) πάνω στο οποίο προστίθενται αλυσίδες ολιγοσακχαριτών με την δράση της συνθάσης του γλυκογόνου (GS). Αυτή η εναρκτήρια λειτουργία εξασφαλίζεται από τη γλυκογονίνη, μια πρωτεΐνη που περιλαμβάνει έναν ολιγοσακχαρίτη, αποτελούμενο από α-1,4-γλυκόζες, συνδεδεμένο με το φαινολικό άτομο οξυγόνου ενός καταλοίπου τυροσίνης. Αυτός είναι ο λόγος που πάντα όταν απομονώνεται γλυκογόνο αυτό περιέχει και πρωτεΐνες.

Η αντίδραση της σύνθεσης του γλυκογόνου καταλύεται από τη GS σύμφωνα με την παρακάτω πορεία:



Εικόνα 8: Πορεία σύνθεσης του γλυκογόνου

Η GS καταλύει τη μεταφορά της ενεργοποιημένης γλυκοζυλικής μονάδας από την UDP (ουριδινοφωσφορική) γλυκόζη στο υδροξύλιο του C-4 ενός άκρου του γλυκογόνου προς τον σχηματισμό ενός γλυκοζιτικού δεσμού α-1,4. Κατά την επιμήκυνση, η UDP αντικαθίσταται από την τελική υδροξυλική ομάδα του αυξανόμενου μορίου του γλυκογόνου. [2]

Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

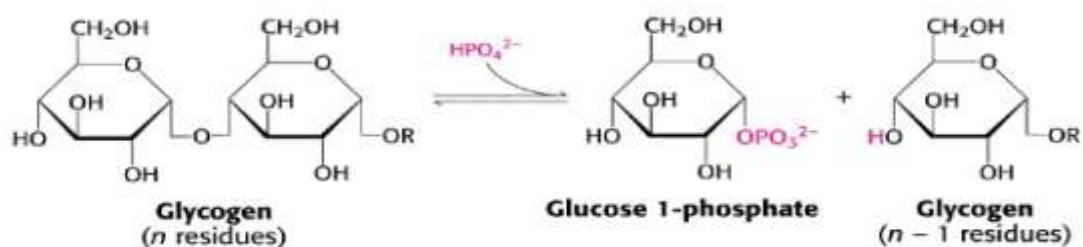
Η γλυκογονόλυση μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936. Το ζεύγος Cori απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), το οποίο είναι ένα ένζυμο «κλειδί» στη διαδικασία της γλυκογονόλυσης [Cori & Cori, 1936]. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς

απόδοση 1- φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού ιόντος αναφέρεται ως φωσφορόλυση. Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται [2].

Η αποδοτική αποικοδόμηση του γλυκογόνου για να προμηθεύσει 6-φωσφορική γλυκόζη χρειάζεται τέσσερις ενζυμικές δραστηριότητες: μια να αποικοδομεί το γλυκογόνο, δύο να ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο ώστε να παραμένει ένα υπόστρωμα για αποικοδόμηση και μία να μετατρέπει το προϊόν καταβολισμού του γλυκογόνου σε μια μορφή κατάλληλη για περαιτέρω μεταβολισμό.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται φαίνεται στην Εικόνα 9:

Γλυκογόνο(νκατάλοιπα) + Pi → 1-φωσφορική-γλυκόζη + γλυκογόνο (n-1 κατάλοιπα)



Εικόνα 9: Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Όμως η GP μπορεί να φέρει εις πέρας την πορεία αυτή από μόνη της μόνο σε περιορισμένη έκταση. Συγκεκριμένα η GP σταματά τη διάσπαση των δεσμών α-1,4 όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο διακλάδωσης, και αυτό γιατί η GP δεν μπορεί να διασπάσει τους δεσμούς α-1,6 των διακλαδώσεων.

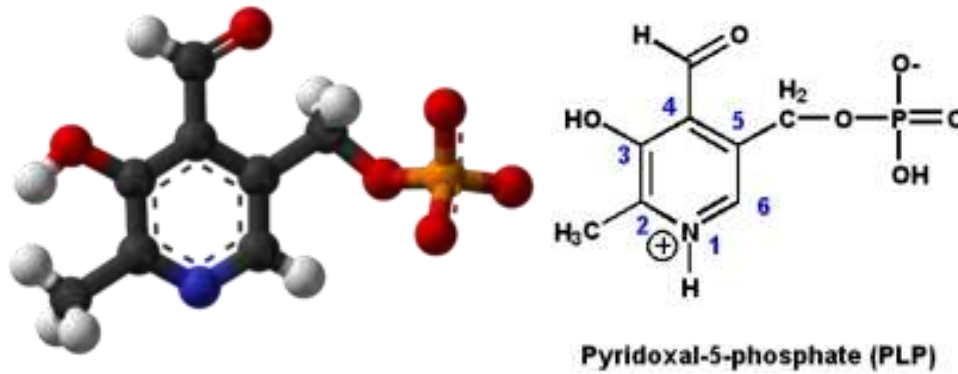
Για το σκοπό αυτό, συμμετέχουν και δύο άλλα ένζυμα: μια μεταφοράση και μια γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6. Η μεταφοράση μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη, αφήνοντας εκτεθειμένο ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6. Η γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6, γνωστή και ως ένζυμο αποδιακλάδωσης, υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης.

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6. Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), 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, σε αντίθεση με τη γλυκόζη.
[2]

2.3 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP)

2.3.1 Γενικά

Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP, φωσφορική-5-πυριδοξάλη, P5P) είναι μια προσθετική ομάδα ορισμένων ενζύμων. Είναι η δραστική μορφή της βιταμίνης B6, η οποία αποτελείται από τρεις φυσικές οργανικές ενώσεις, πυριδοξάλη, πυριδοξίνη και την πυριδοξαμίνη.[14]

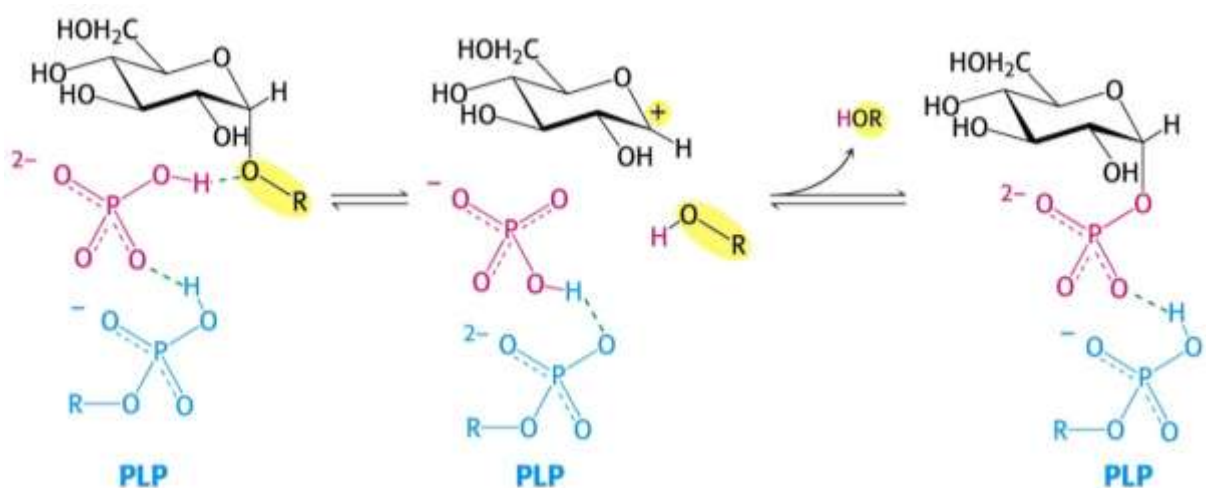


Εικόνα 10: Τρισδιάστατη και συντακτική δομή της PLP

2.3.2 Η PLP συμμετέχει στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου

Η φωσφορύλαση θα πρέπει να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά ώστε να εξοικονομήσει το ATP που απαιτείται για τη φωσφορύλιση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο.

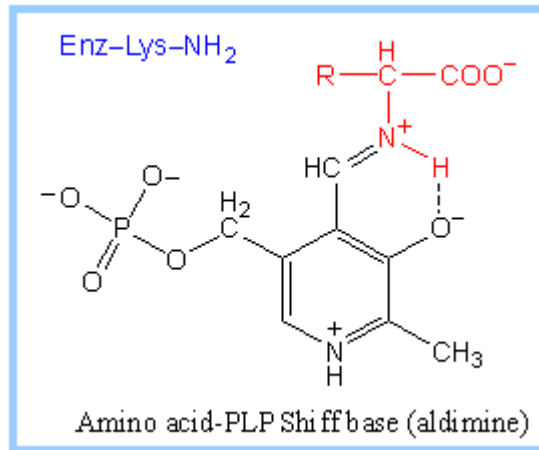
Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1 (ο χαρακτηρισμός α σημαίνει ότι το άτομο οξυγόνου που συνδέεται με τον C-1 είναι κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη.



Εικόνα 11: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα HPO_4-2 (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζυτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται από τη μεταφορά ενός πρωτονίου από τη πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης.

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου.

Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης [2].



Εικόνα 12: Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η φωσφορική πυριδοξαλη σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης

Η PLP δρα ως συνένζυμο σε όλες τις αντιδράσεις τρανσαμίνωσης, και σε ορισμένες αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης και απαμίνωσης των αμινοξέων. Η αλδεϋδική ομάδα του PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με την ε-αμινομάδα μιας συγκεκριμένης πλευρικής αλυσίδας λυσίνης στο εκάστοτε ένζυμο. Επιπλέον, η PLP χρησιμοποιείται από αμινοτρανσφεράσες (ή τρανσαμινάσες) που δρουν σε ασυνήθιστα σάκχαρα, όπως η περοζαμίνη.

Σε αυτές τις αντιδράσεις, η PLP αντιδρά με το γλουταμινικό οξύ. Είναι επίσης ενεργή στην αντίδραση συμπύκνωσης κατά τη σύνθεση της αίμης. Τέλος, η PLP παίζει ρόλο στη μετατροπή της ντόπα σε ντοπαμίνη, επιτρέπει τη μετατροπή του διεγερτικού νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό στον ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή GABA, και επιτρέπει στο SAM να αποκαρβοξυλιωθεί ώστε να σχηματιστεί προτυλαμίνη, πρόδρομο μόριο των πολυαμινών. [2]

2.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

2.4.1 Γενικά

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του, απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη. Η φωσφορυλάση του

γλυκογόνου ανήκει στην τάξη των τρανσφερασών, στην υπόταξη των γλυκοζυλοτρανσφερασών και στην υπο-υποτάξη των εξοζυλοτρανσφερασών σύμφωνα με την IBU και IUPAC όσον αφορά την φύση της αντίδρασης που καταλύει και έχει συστηματική ονομασία 1,4-α-D-γλυκο,φωσφορικό α-D γλυκοτρανσφεράση. Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μύες ενώ η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό και στους ιστούς απουσιάζει το ένζυμο υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6- φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση της γλυκόζης [2]. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ήταν το πρώτο αλλοστερικό ένζυμο που ανακαλύφθηκε ότι υπάρχει σε δύο μορφές, την α και τη β, που εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωση του ενζύμου, καθώς και στις καταστάσεις R και T που βασίζονται στην παρουσία του AMP. [2]

2.4.2 Δομή

Δομικά η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97.434kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα.

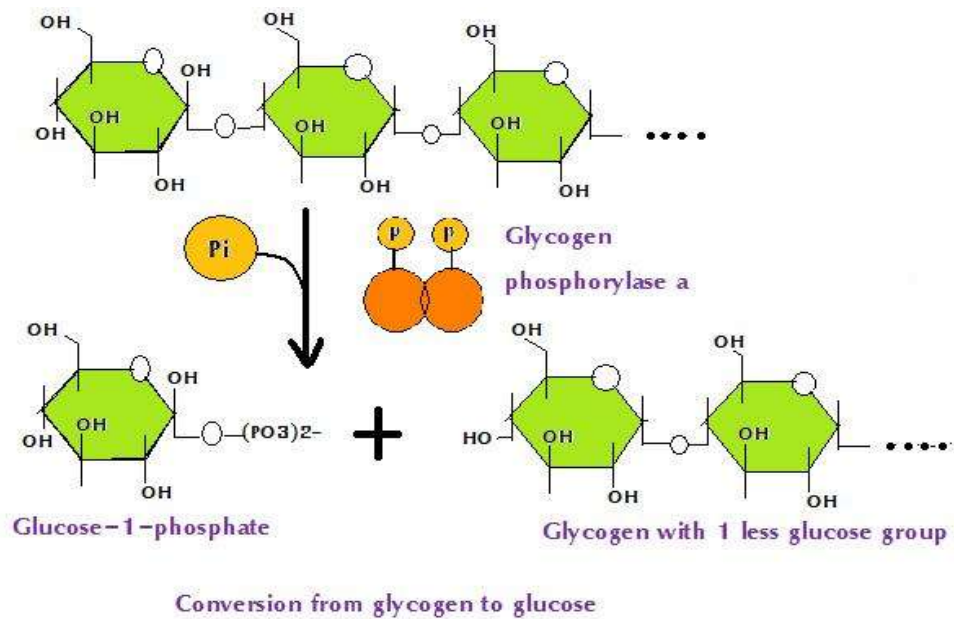
Κάθε υπομονάδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε μια αμινο-τελική δομική περιοχή (480 αα) που περιέχει μια θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου και μια καρβοξυ-τελική δομική περιοχή (360 αα). Το καταλυτικό κέντρο εντοπίζεται σε μια βαθιά σχισμή που σχηματίζεται με κατάλοιπα από τις αμινο- και καρβοξυ-τελικές περιοχές [2]. Συνεπώς, κάθε υπομονάδα αποτελείται από

χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, αλλοστερικές περιοχές και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου. [15]

2.4.3 Μηχανισμός δράσης

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα από τα κυριότερα φωσφορολυτικά ένζυμα. Αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη η οποία λαμβάνει χώρα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, όπου τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γεινίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H₂O. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο 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.

Με βάση τις μελέτες μηχανισμού κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση.



Εικόνα 13: Μηχανισμός δράσης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου: το γλυκογόνο, παρουσία ορθοφωσφορικού ανιόντος και μέσω της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, μετατρέπεται σε 1-φωσφορική α-D-γλυκόζη και HOR (η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερη)

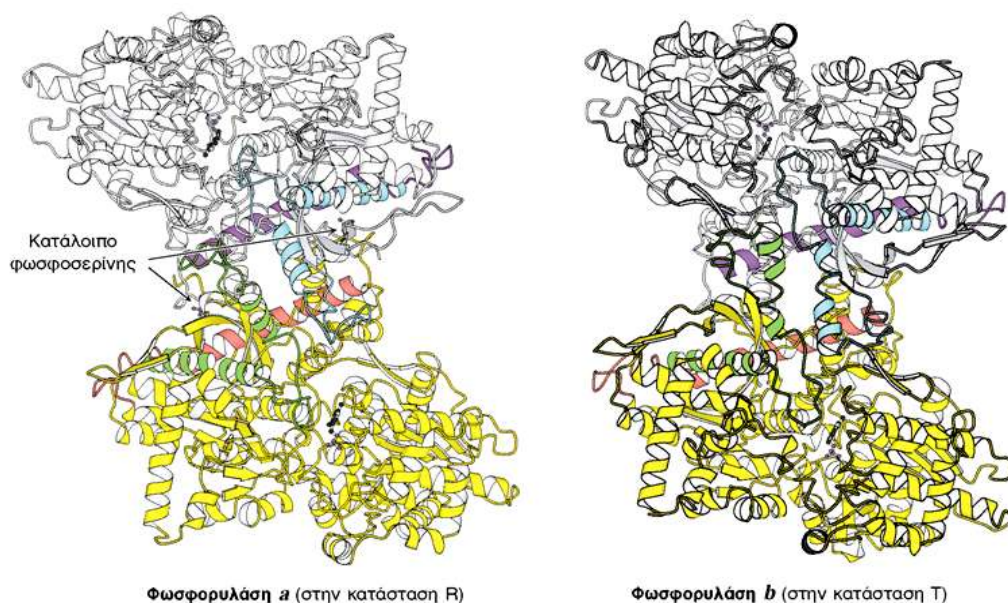
2.4.4 Ρύθμιση

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ρυθμίζεται με διάφορους αλλοστερικούς τελεστές οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, όπως επίσης με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση, ως απόκριση σε ορμονικά σήματα όπως της ινσουλίνης, της γλυκαγόνης και της επινεφρίνης. Αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για το σχεδιασμό αναστολέων με φαρμακευτικές εφαρμογές στη βελτιστοποίηση του ελέγχου του σακχάρου σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2.

Το ένζυμο εμφανίζεται σε δύο μορφές. Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a (φωσφορυλιωμένη μορφή, GP_a) και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b (αποφωσφορυλιωμένη μορφή, GP_b). [1]

Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση ρυθμίζοντας φυσιολογικά τη δραστηριότητα της GP. [2]. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G₁(PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP).

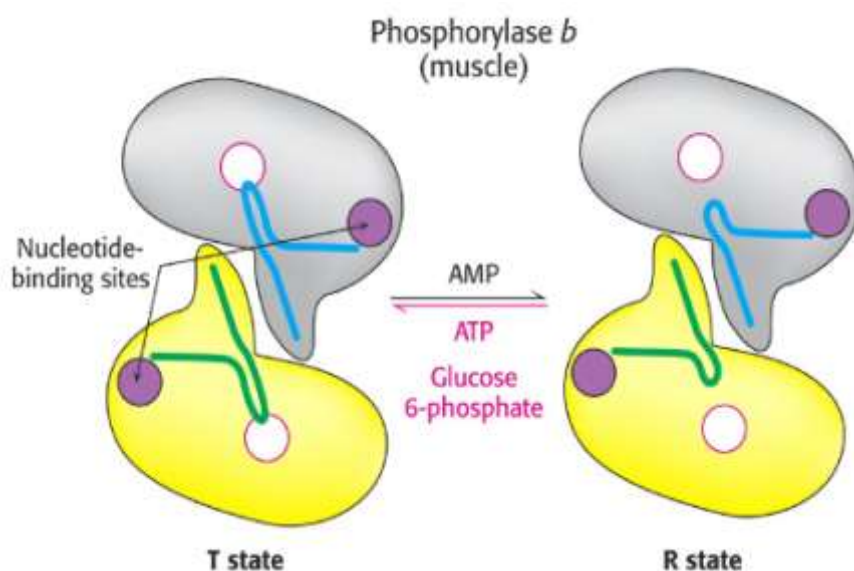
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της (a και b) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T (Εικόνα 14). Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση a) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α-έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη. [2]



Εικόνα 14: Δομή της φωσφορυλάσης *a* και *b*. Η φωσφορυλάση *a* φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο Ser14 κάθε υπομονάδας. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη δομή της περισσότερο ενεργής R διαμόρφωσης. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν είναι φωσφορυλιωμένη και υπάρχει κυρίως στην T διαμόρφωση. [27]

Η μυϊκή φωσφορυλάση *b* είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης *b* στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης *b* από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση *b* είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης.

Αντίθετα η φωσφορυλάση α είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP, του ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης (**Εικόνα 15**). Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μύς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια. [2]

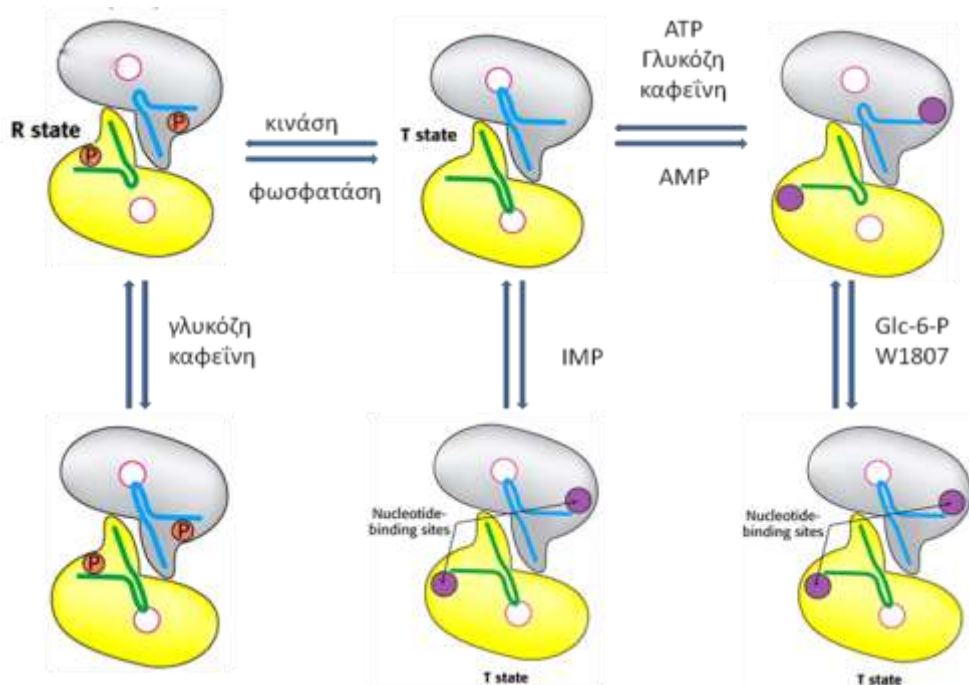


Εικόνα 15: Αλλοστερική ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης: Ένα χαμηλό ενεργειακό φορτίο που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP, ευνοεί την μετάβαση στη μορφή R

Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο. Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική T διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την T διαμόρφωση.

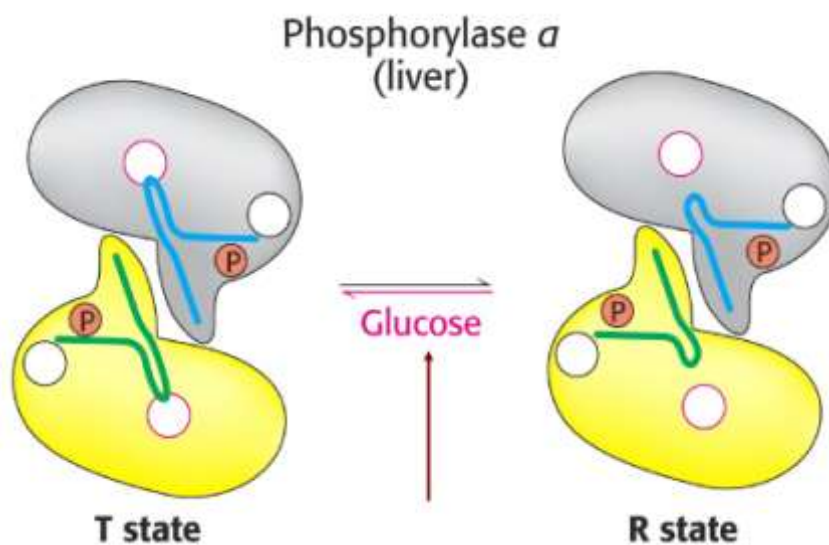
Τέλος στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την T κατάσταση, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την R κατάσταση και το ATP που απλά ανταγωνίζεται το AMP .

Η ανενεργός μορφή της φωσφορυλάσης b μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν in vitro να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} . Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P. (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιόσταση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως συνόλου. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α, αλλά όχι η β παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο (**εικόνα 17**). Και αυτό γιατί ο ρόλος της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι η παραγωγή γλυκόζης για εξαγωγή σε άλλους ιστούς, συνεπώς όταν η ελεύθερη γλυκόζη προέρχεται από άλλες πηγές, όπως η διατροφή, δεν υπάρχει ανάγκη κινητοποίησης του ενζύμου. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. [2]



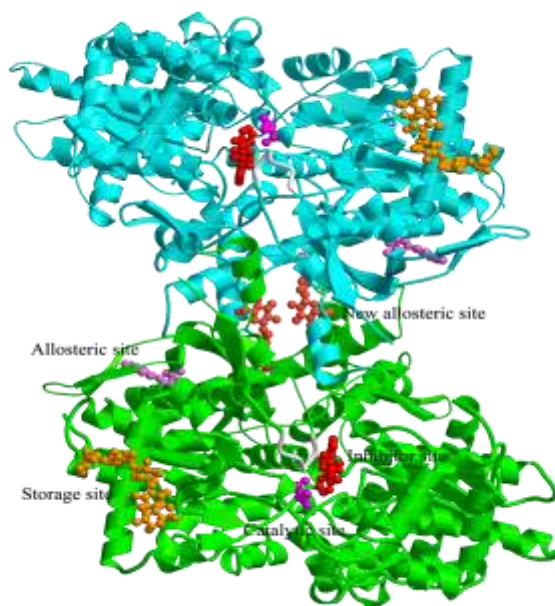
Εικόνα 17: Αλλοστερική ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης: Η πρόσδεση της γλυκόζης στη φωσφορυλάση α μετατοπίζει την ισορροπία προς την κατάσταση T και απενεργοποιεί το ένζυμο. Έτσι το γλυκογόνο δεν κινητοποιείται όταν η γλυκόζη είναι ήδη σε αφθονία

2.4.5 Κρυσταλλική δομή και κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου GP

Οι κρυσταλλικές δομές της GP_a και της GP_b (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 από τους Barford και Johnson (Barford & Johnson, 1989). Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά νερού (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Κι αυτό συμβαίνει γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους [Barford & Johnson, 1989]. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου μπορεί να χωριστεί σε δυο διακριτές περιοχές, την 1 και την 2. Η περιοχή 1 ονομάζεται ρυθμιστική και αποτελείται από τα αμινοξέα 10-484. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα καθώς και ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή 2 ονομάζεται καταλυτική και αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων.[7] Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου περιέχει 6 κέντρα σύνδεσης:

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- Αλλοστερικό κέντρο (N)
- Καταλυτικό κέντρο
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων).

Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60x60x55 Å. Η GP είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 310 μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια π έλικα μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (cap) και πύργος (tower) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόγχος 280 (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18). [28].



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση του διμερούς μορίου της GPb όπου βλέπουμε τις θέσεις του καταλυτικού, του αλοστερικού, του κέντρου πρόσδεσης του αναστολέα και του νέου αλοστερικού κέντρου (CP320626)

Κέντρα σύνδεσης της GP

Όπως προαναφερθήκαμε η GP έχει έξι κέντρα σύνδεσης

A) Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14

Το κέντρο αυτό είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή a στη μορφή b. Εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων. Κεντρικό ρόλο έχει η Ser 14, η οποία φωσφορυλιώνεται και οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο του ενζύμου. Στην GPb, αυτά τα αμινοξέα είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στη GPa έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με αλλά αμινοξέα και των 2 υπομονάδων. [2]

B) Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å περίπου από την Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις 2 διαμορφώσεις, T και R, της GPa και της GPb. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι αποτελείται από 3 υποκέντρα, τα οποία είναι τα εξής:

- Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
- Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων ριβόζης
- Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων πουρίνης

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο, είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, G1P, Pi, SO_4^{2-}), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP, όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. [28]

Γ) Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από την σύνδεση των υποστρωμάτων (Glc-1-P, Pi) και αναλόγων τους. Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε μια απόσταση 15 Å από την επιφάνεια. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση επιτυγχάνεται μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται από τον βρόχο αμινοξικής αλληλουχίας 282-285. Κατά τη μετάπτωση από T σε R, ο βρόχος 282-285 εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από τη βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 οδηγεί στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας. [28]

Δ) Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου in vivo. 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. [28]

Ε) Το κέντρο αναστολής (ή νουκλεοζιτικό κέντρο)

Πρόκειται για ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου, σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου.

Περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (13-484 αα), καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (485-842 αα). Στην T διαμόρφωση, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού, που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχθεί ότι: πουρίνες όπως η αδενίνη, νουκλεοσίδια όπως η αδενοσίνη και η ινοσίνη, φωσφονουκλεοτίδια όπως το AMP, το IMP και το ATP, το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σωμάτια, συνδέονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GP_a και GP_b, όχι όμως και στη ηπατική GP_a, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα. [28]

Στην T διαμόρφωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η Phe²⁸⁵ του βρόχου 280 εντοπίζεται κοντά στη Tyr⁶¹³ από την έλικα α-19, και μαζί αυτά τα δύο υδρόφοβα μόρια, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η σύνδεση στο κέντρο αυτό, έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου και συγχρόνως την φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. [28]

Η σύνδεση των αναστολέων με την πρωτεΐνη δεν πραγματοποιείται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων [10].

ΣΤ) Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GP_b. Σε αυτό συνδέεται η ένωση P320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδια καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GP_b. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GP_a. [29]

2.5 Κινητική ενζύμων και ενζυμική αναστολή

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, όπως διατυπώθηκε κυρίως από τους Michaelis-Menten, ασχολείται με την μέτρηση χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου, V_{max} και K_M , και με την μέτρηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι παράγοντες είναι: η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεων, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς), το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.

Η **ενεργότητα ενός ενζύμου E**, εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, η ταχύτητα, V , ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος, S , που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων, P , που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου και υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten:

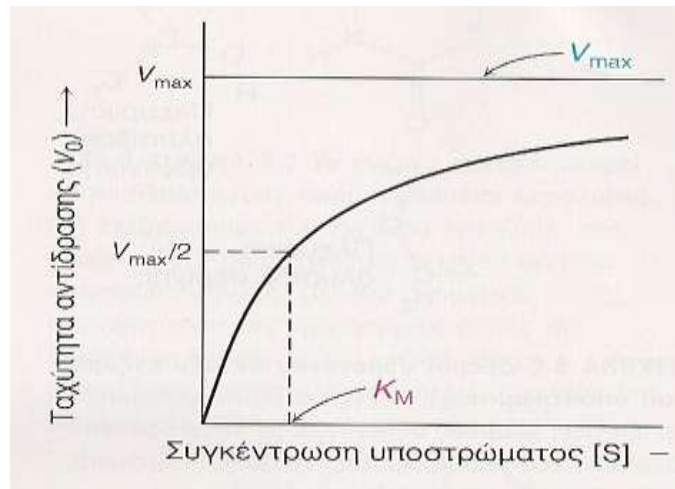
$$V_0 = V_{MAX} \left(\frac{[S]}{K_M + [S]} \right)$$

Όπου V_0 η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, $[S]$ η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{MAX} η μέγιστη ταχύτητα για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε και K_M η σταθερά Michaelis.

Από την εξίσωση Michaelis-Menten προκύπτει ότι η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας, V_0 , με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, $[S]$, είναι μια ορθογώνια υπερβολή.

Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως, $V_0=k[S]$), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητικής μηδενικής τάξεως, $V_0=k$) και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας, V_{MAX} (Εικόνα 19). Η σταθερά Michaelis είναι η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία έχουμε το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Έτσι έχουμε μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα. Οι καταλυτικές σταθερές K_M και V_{MAX} είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή K_M είναι σταθερά για ένα ένζυμο με ένα ορισμένο υπόστρωμα κάτω από καθορισμένες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος, εκφράζεται ως συγκέντρωση και συνήθως κυμαίνεται σε 10^{-1} με 10^{-7} M. Αντίθετα η V_{MAX} εξαρτάται από το ποσό του ενζύμου που χρησιμοποιείται και γι αυτό εκφράζεται ως ταχύτητα σχηματισμού προϊόντος ανά μονάδες ενζύμου (π.χ. $\mu\text{moles Pi}/\text{min}/\text{mg}$ πρωτεΐνης).

Η πρωταρχική 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, $[S]$ (Εικόνα). 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. [2]



Εικόνα 19: 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 $V_{max}/2$.

Το 1913, ο Leonor Michaelis και η Maud Menten πρότειναν ένα απλό μοντέλο που εξηγεί αυτά τα κινητικά χαρακτηριστικά. Το κρίσιμο χαρακτηριστικό στη συμπεριφορά των ενζύμων είναι ότι ένα ειδικό σύμπλοκο ES είναι το αναγκαίο ενδιάμεσο στην κατάλυση. Το μοντέλο που προτάθηκε, το οποίο είναι το απλούστερο που εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων, είναι:



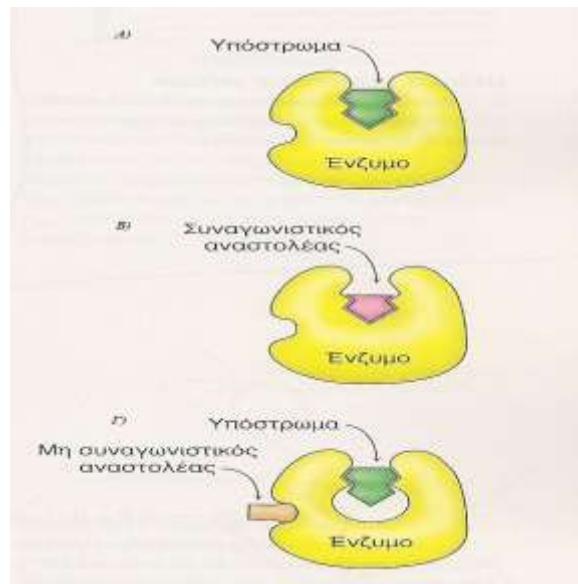
Από την παραπάνω σχέση προκύπτει μια σταθερά, η σταθερά Michaelis-Menten, η οποία ορίζεται ως εξής:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{ή} \quad K_M = \frac{[E] + [S]}{[ES]}$$

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m , mol) 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}). [2] Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α-D- Glc-1-P).

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 ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, καθώς συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά, με αποτέλεσμα να αδρανοποιείται, σχεδόν πάντα, οριστικά. Σε αντίθεση, η αντιστρεπτή αναστολή χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Στην κλασική ενζυμική κινητική διακρίνονται διάφορα είδη αντιστρεπτής αναστολής όπως: συναγωνιστική, μη συναγωνιστική. Όλες διακρίνονται μεταξύ τους μέσω κινητικής μελέτης που βασίζεται στην αρχική αντίδραση (**Εικόνα 20**).



Εικόνα 20: Διάκριση μεταξύ ενός συναγωνιστικού και ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα. Α) Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος απουσία αναστολέα. Β) Συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το υπόστρωμα δεν συνδέεται. Γ) Μη συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται σε σημείο διαφορετικό με το ενεργό κέντρο. Το υπόστρωμα συνεχίζει να συνδέεται, αλλά το ένζυμο δεν καταλύει την αντίδραση λόγω της παρουσίας του αναστολέα.

Η εξίσωση Michaelis - Menten στο σύστημα με συναγωνιστική αναστολή είναι της μορφής :

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S]([I]K_i + 1)}$$

Παρατηρούμε ότι η μέγιστη ταχύτητα V_{max} δεν μεταβάλλεται, ενώ η τιμή της σταθεράς Michaelis μεγαλώνει κατά το ποσό $([I]K_i + 1)$. Όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι μηδέν, ή όταν η σταθερά K_i , που ορίζεται ως η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI, είναι πολύ μικρή, δηλαδή υπάρχει μικρή αγχιστεία μεταξύ ενζύμου και αναστολέα, δεν φανερώνεται η αναστολή, με αποτέλεσμα η K_m να είναι φυσιολογική.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι τόσο μεγάλη, δηλαδή η [S] πάει να πάρει την τιμή που μας δίνει η μέγιστη ταχύτητα, ώστε ο όρος K_i να γίνεται πάλι μηδαμινός, με αποτέλεσμα η φυσιολογική V_{max} να μη μεταβάλλεται. Λόγω λοιπόν της μορφής του παρονομαστή στην εξίσωση, η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα, δηλαδή η τιμή της [I], είναι ψηλή ή όταν η τιμή της [S] είναι χαμηλή. Αντίθετα, η αναστολή εξαφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι πολύ χαμηλή ή όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ ψηλή [9].

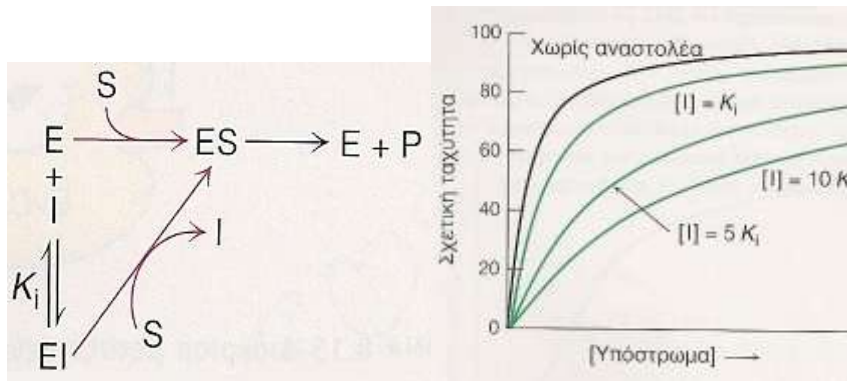
Εκτός από την συναγωνιστική αναστολή υπάρχουν:

1. **Συναγωνιστική αναστολή (non-competitive inhibition)** στην οποία αντί ο αναστολέας να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ένζυμου, δηλαδή το ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή.

2. **Μικτή αναστολή (mixed inhibition)** σε αυτούς τους αναστολείς οι σταθερές διαστάσεως του S από το ES διαφέρουν με εκείνη του S από το EIS. Έτσι οι K_m και η V_{max} μεταβάλλονται.

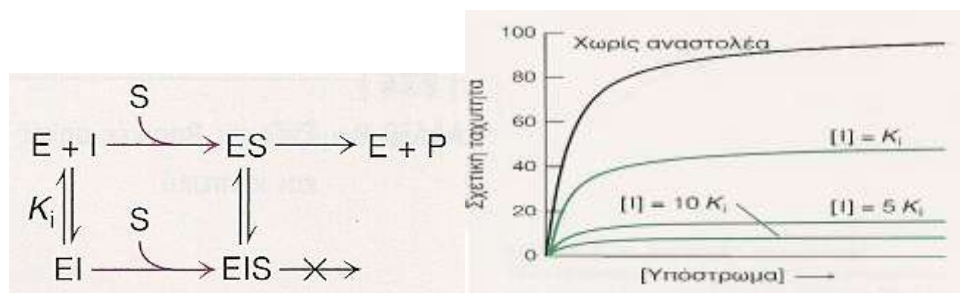
3. **Ανταγωνιστική αναστολή (uncompetitive inhibition)** σε αυτή την περίπτωση αναστολής η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος.

Συγκεκριμένα, στη **συναγωνιστική αναστολή** το ένζυμο (E) μπορεί να προσδένει το υπόστρωμα (ES) ή τον αναστολέα (EI), αλλά όχι και τα δύο μαζί (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η πρόσδεση του υποστρώματος (**Εικόνα 21**). Δηλαδή, ο συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Καθώς λοιπόν ο αναστολέας συναγωνίζεται το υπόστρωμα για πρόσδεση στο ενεργό κέντρο, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί αυξάνοντας τη συγκέντρωση του υποστρώματος. [2]



Εικόνα 21: Κινητική ενός συναγωνιστικού αναστολέα. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα, απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος για να επιτευχθεί η μέγιστη ενζυμική ταχύτητα. Η πορεία της αντίδρασης υποδηλώνει πόσο υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να υπερνικηθεί η συναγωνιστική αναστολή.

Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδεθούν ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου (ESI) σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης. Ο 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 (**Εικόνα 22**) Συνεπώς, η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. [2]



Εικόνα 22: Κινητική ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα. Η πορεία της αντίδρασης δείχνει ότι ο αναστολέας 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.

2.6 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II καθώς είναι ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Οι σημερινές προληπτικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του ΣΔ2, δεν επιτυγχάνουν ικανοποιητικό έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, γι' αυτό το λόγο, υπάρχει ένα συνεχές ενδιαφέρον τόσο από την ακαδημαϊκή κοινότητα όσο και από τις φαρμακοβιομηχανίες για την ανάπτυξη και παραγωγή νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων [30].

Μια μοριακή προσέγγιση στοχεύει στην μείωση παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ με αναστολή της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP). Καθώς η GP είναι ένα ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση της γλυκόζης, χρησιμοποιείται ως στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [29].

Μια άλλη προσέγγιση για τη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα είναι τα διάφορα φυσικά εκχυλίσματα (π.χ. εκχυλίσματα σταφυλιού). Ευρύτερος στόχος αυτής της προσέγγισης είναι η δημιουργία βιολειτουργικών προϊόντων, με φυσικά συστατικά, ώστε οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 να μπορούν να ελέγξουν τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματός τους με διάφορες τροφές, αποφεύγοντας την επίπονη διαδικασία της χορήγησης ενέσιμης ινσουλίνης.

Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP του οργανισμού (ηπατικής, μυϊκής, του εγκεφάλου), μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει

να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ. [10]

Ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κουνέλια (η οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP και 100% στο ενεργό κέντρο) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιοριστεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιοριστεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1)

2.7 Vitis vinifera

Vitis vinifera (ποικιλία σταφυλιού), μία από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες στον κόσμο. Το κρασί ανέκαθεν, από την αρχαιότητα αποτελούσε μέρος της ανθρώπινης διατροφής. Τα συνολικά ποσά της παραγωγής σταφυλιών εκτιμώνται σε πάνω από 60 εκατομμύρια τόνους. Τα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν σπόροι σταφυλιού, στέμφυλα και στελέχη που λήφθηκαν από μερικά από τα πιο αντιπροσωπευτικά κόκκινα σταφύλια (Μανδηλαριά, Voidomato, Μαυροτράγανο, Μοσχάτο Αμβούργου κ.α) και το λευκό (Ασσύρτικο), ποικιλίες *V. vinifera* ειδών που καλλιεργούνται στην Ελλάδα. Το *Vitis Vinifera* είναι ένα αναρριχώμενο φυτό, φυλλοβόλο, και ανήκει στην οικογένεια των αμπελοειδών. Ζει πολλά χρόνια. Ο κορμός του είναι γεμάτος ρόζους, τα δε φύλλα του είναι πλατιά και λεία σε σχήμα παλάμης. Τα άνθη μικρά, πρασινωπά, συγκεντρωμένα σε ομάδες, ο δε καρπός έχει διαφορετικά σχήματα, μέγανος - μικρός - στρογγυλός ή μακρόστενος, σε διάφορα χρώματα, κίτρινο, πράσινο, βιολετί, ή ακόμα και μπλε. Το 1984 υπολογίστηκαν 8.000 ποικιλίες σταφυλιών του *Vitis Vinifera* και έχουν μελετηθεί ευρέως για τις ευεργετικές επιδράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία.

Τα εκχυλίσματα σταφυλιών που προέρχονται από είδη *V. vinifera* έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Διαπιστώθηκε από μελέτες, για πρώτη φορά, ότι εκχυλίσματα από βλαστούς μπορούν να αποτρέψουν την ROS-επαγόμενη βλάβη του DNA, γεγονός που υποδηλώνει τη χρήση τους κατά

των ελευθέρων ριζών που προκαλείται σε παθολογικές συνθήκες. Ακόμα, η ανασταλτική δράση τους σε καρκινικά ήπατικά και καρκινικά κύτταρα του τραχήλου υποδηλώνει πιθανή χρήση τους ως πιθανούς χημειοπροφυλακτικούς φορείς.

Τελευταία, γίνονται ανάλυσεις μικροσυστοιχιών DNA σε κύτταρα του καρκίνου με σκοπό την εύρεση μοριακών μονοπατιών που εμπλέκονται στην αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων του στελέχους. Τα παρόντα αποτελέσματα δείχνουν ότι εκχυλίσματα σταφυλιών από βλαστούς θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων, για την παραγωγή τροφίμων υψηλής θρεπτικής αξίας ή ως συμπληρώματα διατροφής. [33],[34].

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού

Η απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού πραγματοποιείται με την κατά κάποιο τρόπο τροποποιημένη μέθοδο Fischer & Krebs (1962). Συγκεκριμένα, γίνεται χρήση της 2-μερκαπτο-αιθανόλης ως αναγωγικός παράγοντας αντί της L-κυστεΐνης καθ'όλη την πορεία καθαρισμού.

ΥΛΙΚΑ

- 3 κουνέλια
- Απιονισμένο H₂O
- Όξινο ανθρακικό κάλιο, 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- (υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο, MB. 121.1
- Οξικό μαγνήσιο, MB. 214.46
- Θειικό αμμώνιο, MB. 132.14
- C₃H₈O₃ - Γλυκερόλη 100%
- Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδωσης. Πριν από τη χρήση τους υφίστανται κατεργασία με 1% Na₂CO₃ και 10mM EDTA στους 100°C (30 min) και συνεχή έκπλυση με απεσταγμένο ύδωρ στους 100°C (30 min).

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, (50:50:1) -> 50 mM β-φωσφογλυκερόλης, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA), pH6.8
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃),
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N (CH₃COOH)
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% (NH₄)₂SO₄
- Ρυθμιστικό διάλυμα 0.001M Tris (τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/ HCl, pH 7.5
- Διάλυμα Tris 2.0M, pH 7.5
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH7.0)
- Διάλυμα 0.1M EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος), pH7.0
- Διάλυμα 0.1M AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης), pH7.0
- Διάλυμα οξικού μαγνησίου 1.0M ((CH₃COO)₂Mg)

ΟΡΓΑΝΑ

- Φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο
- Χειροκίνητη κρεατομηχανή
- Πεχάμετρο
- Χρονόμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός
- Αντλία κενού Buchner
- Συσκευή Vortex
- Αυτόματες πιπέτες
- Υαλοβάμβακα
- Σωληνάκια

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Βήμα 1^ο : Παραλαβή μυϊκού εκχυλίσματος

Αρχικά, αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από 3 κουνέλια, αλέθονται με χειροκίνητη κρεατομηχανή και στη συνέχεια ζυγίζονται. Γίνεται εκχύλιση 3 φορές με απιονισμένο ύδωρ και συλλογή του κιμά 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^ο: Ώξινη καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH_3COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο, όπου παρατηρείται σταδιακή αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών. Ακολουθεί φυγοκέντριση (5000rpm) των πρωτεϊνών για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C με χρήση μεγάλης κεφαλής για την απομάκρυνση των υπολλειμάτων. Έπειτα, το υπερκείμενο συλλέγεται και διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού και τέλος το διάλυμα ογκομετρείται και ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κεκορεσμένο διάλυμα KHCO_3 .

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση του ενζύμου με θειϊκό αμμώνιο (90%)

Το ένζυμο (φωσφορυλάση του γλυογόνου) 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 προσεκτικά με χρήση αντλίας και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C, με χρήση μεγάλης κεφαλής, για συλλογή του ίζηματος. Έπειτα, το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 0.001M, pH 7.5 για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Μετά τη διαπίδυση, πραγματοποιείται συλλογή του πρωτεϊνικού διαλύματος από τα σακουλάκια διαπίδυσης σε ογκομετρικό κύλινδρο (115ml) και ακολουθεί διαύγαση με φυγοκέντρηση στις 17000 rpm για 10 min στους 20-25°C με χρήση μικρής κεφαλής (SS-34,code 0.5). 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 CH₃COOH 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 το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετράται.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: το EDTA και η μερκαπτοαιθανόλη προστίθενται για να προστατέψουν την πρωτεΐνη από μετουσίωση.

Βήμα 5°: 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 φυγοκέντρισης και αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης b 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 (β -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 $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: το AMP και το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ διευκολύνουν την κρυστάλλωση

Βήμα 6°: 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. Τέλος, η ενζυμική συγκέντρωση προσδιορίζεται με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και υπολογίζεται από τον τύπο: $C_{\text{ενζύμου}} = \text{OD}_{280} / 1,32$, και προσθήκη ίσου όγκου γλυκερόλης 100%. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20 °C.

3.2 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

3.2.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου GPb

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 μmol 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 (**Glycogen(n)**), προς **Glycogen (n-1)** και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**) :



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η αντίθετη αντίδραση .Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (P_i) τα οποία μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά.

• Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα 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 25 μg ενζύμου ανά mL, γλυκογόνο 1 % (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου 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 200 μL υποστρώματος α -D- Glc -1-P 9.0mM, 18 μL AMP 50mM και 502 μL H_2O .

Έπειτα, το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C για 15 λεπτά. Μετά την επώαση, προστίθενται 180 μL από το ενζυμικό μείγμα στον σωλήνα του υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες: 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υποστρώματα α -D-Glc-1-P από 2 mM

έως 20 mM , η θερμοκρασία είναι 30° C και το pH 6.8. Ανά τακτά και καθορισμένα χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού), και για 5 λεπτά, 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 αποδιάταξη και αδρανοποίηση του ενζύμου. Τέλος, 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 (Km)

Η σταθερά **Michaelis-Menten** (K_m , mol) 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 (α-D- Glc-1-P).

Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (**GPb**) βασίζεται στην παρακάτω αντίδραση:



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 (α-D-1-φωσφορικής γλυκόζης), και ελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi) . 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 μείγμα της αντίδρασης.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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 α-D- Glc-1-P 2.0 έως 20 mM, με προσθήκη 200 μL από το αντίστοιχο υπόστρωμα α-D- Glc-1-P, 18 μL AMP 50 mM και 502 μL H₂O.

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 μL ενζυμικού μίγματος. Στις συνθήκες αυτές, στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, έχουμε: 5.0 μg ένζυμο/mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2% w/v, υπόστρωμα α-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 μL από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL 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 α-D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών

3.2.3 Προσδιορισμός IC₅₀ 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 IC₅₀ 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 IC₅₀ 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 του ερευνητή είναι να μπορέσει να προσεγγίσει όσο το δυνατό καλύτερα τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50%.

ΥΛΙΚΑ

- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (α -D- Glc-1-P) 9mM
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β -φωσφογλυκερόλης (β - GP), 50 mM β -μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Γλυκογόνο 1 % (w/v)
- Διάλυμα SDS 1%

- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8
- Διάλυμα του αναστολέα
- DMSO 2% (v/v)

ΟΡΓΑΝΑ

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

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

3.3 Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης γλυκογόνου b (GPb-γλυκογόνου)

Το ένζυμο φυλάσσεται σε εναιώρημα γλυκερόλης στους -20 °C. Από το εναιώρημα του διαλύματος παίρνουμε 10 μL και το αραιώνουμε σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 (50 mM β-γλυκερινοφωσφορικού νατρίου 50 mM 2-μερκαπτοαιθανολης, 1mM EDTA). Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου (GPb), με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm.

Στη συνέχεια, σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα που περιέχει το ένζυμο σε συγκέντρωση 25 μg/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 μg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2% w/v γλυκογόνο, σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος α-D-Glc-1-P και

μεταβαλλόμενης αναστολέα. Τέλος, το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 30 °C, για επώαση, 15 λεπτά.

3.4 Παρασκευή διαλυμάτων για τα υποστρώματα για τις διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης (Glc-1-P)

Παρασκευάζονται 2 ρυθμιστικά διαλύματα (assay buffer 1 και 2) και φυλάσσονται στους 4 °C :

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)

Το πυκνό διάλυμα της Glc-1-P (400mM) σε pH 6,8, το ρυθμιστικό διάλυμα 1 και νερό αναμιγνύονται σε κατάλληλους όγκους ώστε να προκύψει διάλυμα Glc-1-P (90mM), ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) 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 με αποτέλεσμα να προκύπτουν συνολικά 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 IC50, 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. Καθώς τα εκχυλίσματα ήταν δυσδιάλυτα σε υδατικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκε για την διαλυτοποίησή τους ο οργανικός διαλύτης DMSO (Dimethyl Sulfoxide). Τα εκχυλίσματα διαλυτοποιήθηκαν σε 100% (v/v) DMSO ενώ η τελική συγκέντρωση του διαλύτη στην αντίδραση τελικά ήταν 2%. 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	200 μL	200 μL
AMP (50mM)	18 μL	18 μL
Αναστολέας	-	X μL
H ₂ O	484μL	720-(200+18+X) μL
DMSO	18μL	-
Τελικός όγκος	720 μL	720 μL

Παράλληλα, ετοιμάζονται και οι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1% (πέντε 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 μL 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 0,1, 2, 3, και 4 λεπτών λαμβάνονται και μεταφέρονται 200 μL από το διάλυμα της αντίδρασης στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν το SDS 1% και η αντίδραση σταματά, λόγω της αδρανοποιητικής δράσης του SDS (απορρυπαντικό με αποδιατακτική δράση). 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ (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_{50} .

Ακολουθεί η περιγραφή των συνθηκών των κινητικών πειραμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της IC_{50}

- G1P: 4 mM
- AMP: 1 mM
- Γλυκογόνο: 0.2% w/v
- DMSO: 2% v/v

Ακολουθεί λίστα με τα εκχυλίσματα και τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν για τον προσδιορισμό της IC₅₀.

Εκχύλισμα	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (μg/ml)
Ασύρτικο γίγαρτα 2011	2, 5, 8, 10, 20
Βοηδόματο βόστρυχοι	2, 5, 8, 10, 20
Μανδηλάρια βόστρυχοι	2, 4, 6, 10, 15
Μανδηλάρια γίγαρτα	2, 5, 8, 10, 20
Μοσχάτο βόστρυχοι	2, 4, 5, 6, 8, 20

3.5 Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC₅₀ του ενζύμου βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb. Συνεπώς, 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 σε 7 δοκιμαστικούς σωλήνες,

- Τυφλό νερού για την ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται στην IC₅₀ 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 μmol Pi.

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 φωσφορυλάσης 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 P_i 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 φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως γιατί είναι φωτοευαίσθητο). 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.

(Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Στη συνέχεια αναμιγνύουμε τα διαλύματα με αναλογία όγκων 4:1 (4 όγκους αντιδραστήριου 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 'simple weighting'). 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 δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηριότητες 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: $s.a._{control}$: η ειδική δραστηριότητα 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 $\% \text{αναστολή}=f([I])$. 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 υπόστρωμα 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 απομάκρυνσή του.

Το διάλυμα του ενζύμου υφίσταται διαπίδωση 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 NaN₃, 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), C₁₀H₁₁N₄O₈PNa₂, 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 P₄₃2₁2) 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, 1mM IMP, 10 mM BES/NaOH (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN₃ 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

4.1 Αποτελέσματα απομόνωσης της GPb

Η φωσφορυλάση b του γλυκογόνου απομονώθηκε από σκελετικούς μύες κουνελιού σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος (σελ. 54 , παράγραφος 3.1)).



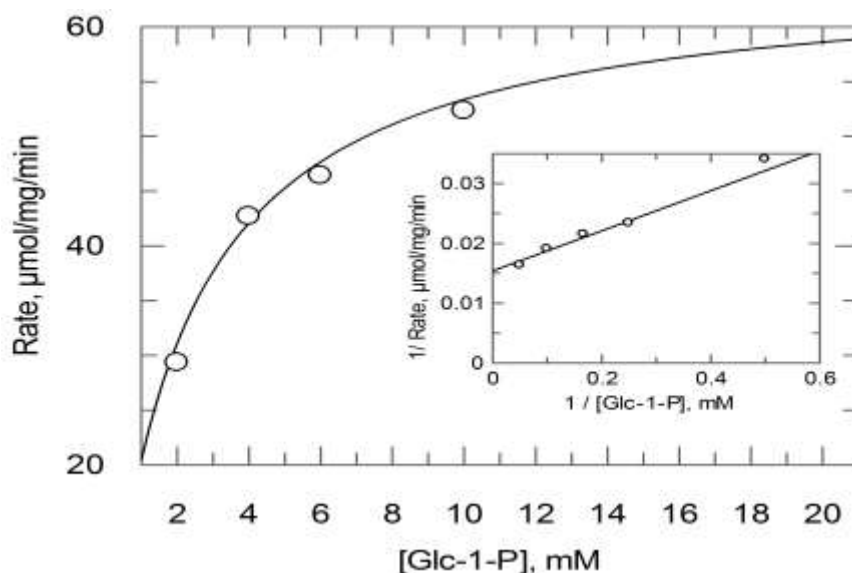
Εικόνα 24: Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την παραλαβή του μυικού εκχυλίσματος. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην έκτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

4.2 Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (G-1-P 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 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m .

Οι κινητικές παράμετροι του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m = 2.18 \pm 0.32 \text{ mM}$, και $V_{max} = 64.97 \pm 3.27 \text{ } \mu\text{mol Pi/mg/min}$.

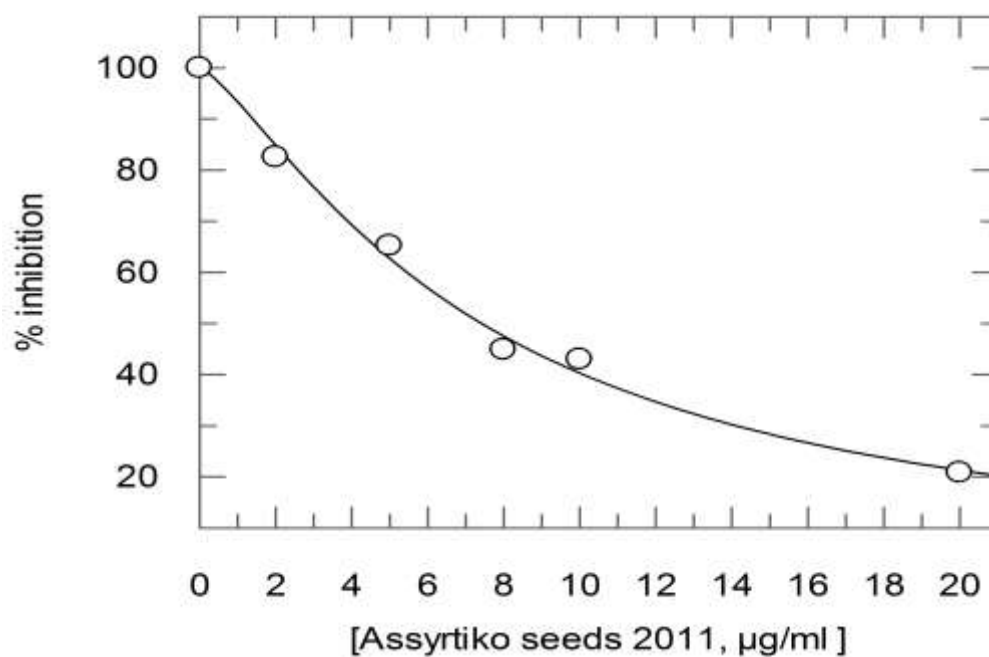


Εικόνα 25: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος G-1-P (2.0, 5.0, 8.0, 10.0, 20.0mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση AMP (1.0mM) και γλυκογόνου (0.2%w/v).

Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο ένθετο είναι το αντίστροφο διάγραμμα *Lineweaver-Burk* που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max} .

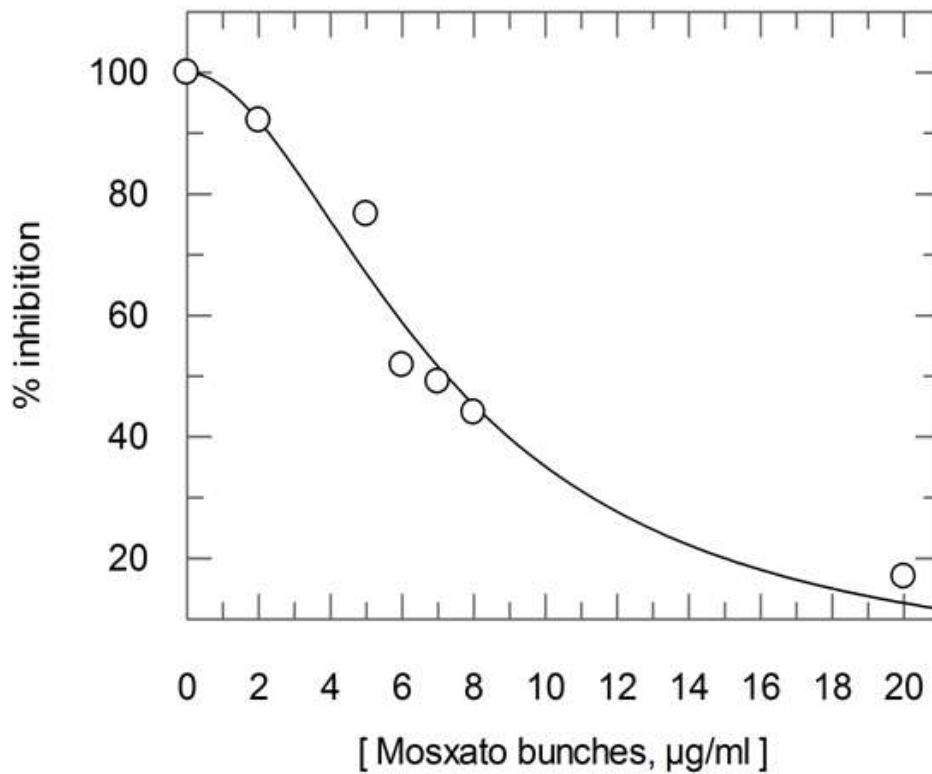
4.3 Κινητική μελέτη εκχυλίσματος σταφυλιών

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η ανασταλτική επίδραση φυσικών εκχυλισμάτων υποπροϊόντων οινοποίησης. Ακολουθεί η γραφική παράσταση που προέκυψε από το πρόγραμμα *Grafit* για τον υπολογισμό της IC_{50} .



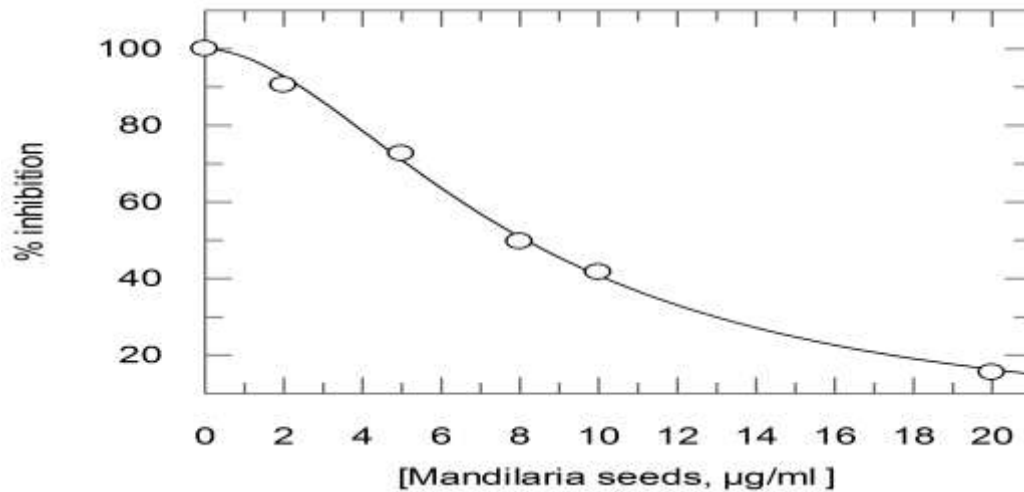
$IC_{50} = 7.4 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$

Εικόνα 26: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος.



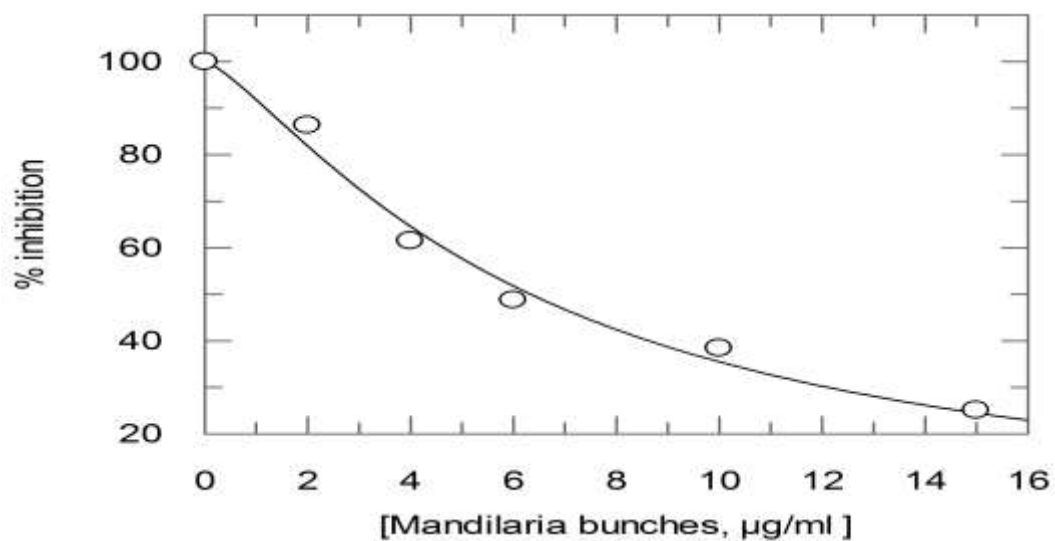
IC₅₀ = 6.2 ± 0.2 µg/mL

Εικόνα 27: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηρότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος.



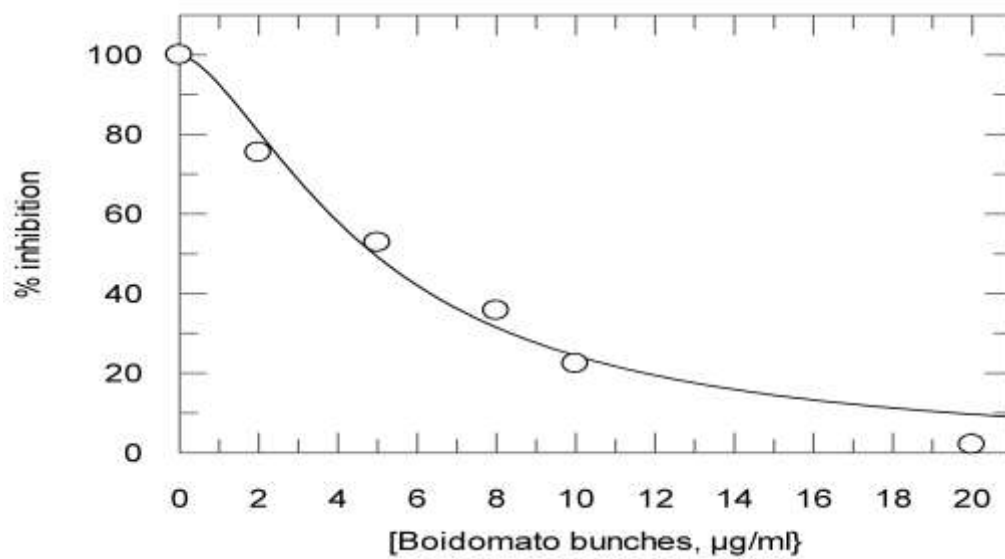
$IC_{50} = 8.2 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$

Εικόνα 28: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος.



$IC_{50} = 6.3 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$

Εικόνα 29: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος.



$IC_{50} = 4.9 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$

Εικόνα 30: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη εκχυλισμάτων από υποπροϊόντα οινοποίησης διαφόρων ελληνικών ποικιλιών του *Vitis Vinifera*. Ειδικότερα, η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας ως προς την ανασταλτική επίδραση φυσικών εκχυλισμάτων από βόστρυχους, στέμφυλα και γίγαρτα διαφόρων ελληνικών ποικιλιών του *Vitis Vinifera*. έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ένα ένζυμο που αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II.

Τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων έδειξαν ότι αυτά τα εκχυλίσματα έχουν μέτρια ανασταλτική επίδραση με την τιμή της IC50 να κυμαίνεται μεταξύ 4.9-8.2 μg/ml. Ωστόσο βρίσκεται σε εξέλιξη η κρυσταλλογραφική μελέτη των υπό μελέτη εκχυλισμάτων, έτσι ώστε να ταυτοποιηθεί η δραστική ουσία που προκαλεί την αναστολή του ενζύμου σε κάθε εκχύλισμα, σε ποιο από τα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου προσδένεται, καθώς και το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσεται μεταξύ της πρωτεΐνης και της ουσίας έτσι ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής.

Επίσης, βρίσκονται σε εξέλιξη ex vivo πειράματα σε HepG2 κύτταρα ηπατοκαρκινώματος για να μελετηθεί η ανασταλτική ισχύς των εκχυλισμάτων και σε κυτταρικό επίπεδο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ❖ McMurry J. (2001). Οργανική Χημεία, Τόμοι I & II, Έκδοση 2η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο ^[1]
- ❖ Stryer L., 2007, Βιοχημεία, Τόμος I, Έκδοση 3^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο ^[2]
- ❖ Σωτήριος Α. Ράπτης, 1998, Εσωτερική Παθολογία, Τόμος IV, Επιστημονικές Εκδόσεις «Γρηγόριος Παρισιανός» Μαρία Γρ. Παρισιανού, Αθήνα ^[3]
- ❖ McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., 2000, Essentials of Exercise Physiology, Τόμος I, Έκδοση 2^η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ. ^[4]
- ❖ *Eικονες google* ^[5]
- ❖ Σμοκοβίτης Α., 2004, Φυσιολογία, Έκδοση 4η, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη. ^[6]
- ❖ Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase, Nature 340, 609-616. ^[7]
- ❖ Monod J., Wyman J. & Changeux J-P., 1965, On the nature of allosteric transitions: a plausible model, J. Mol. Biol., 12, 88-118. ^[8]
- ❖ Τσαγκάρης Γ., 1999, Εργαστηριακές ασκήσεις φυσικοχημείας, Σειρά 1, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα. ^[9]
- ❖ Oikonomakos, N.G.; Somsak, L.Curr. Opin. Invest. Drugs 2008, 9, 379 ^[10]
- ❖ *estia.hua.gr* ^[11]
- ❖ *www.google.gr* ^[12]
- ❖ *www.iatronet.gr* ^[13]
- ❖ *panacea.med.uoa.gr* ^[14]
- ❖ *www.scribd.com* ^[15]
- ❖ *www.eie.gr* ^[16]
- ❖ *el.wikipedia.org* ^[17]
- ❖ *www.neahygeia.gr* ^[18]
- ❖ *www.diabetes-med.gr* ^[19]

- ❖ www.endo.gr ^[20]
- ❖ www.ifet.gr ^[21]
- ❖ www.medlook.net.cy ^[22]
- ❖ www.ncbi.nlm.nih.gov ^[23]
- ❖ Martin J. L., Johnson L. N. & Withers S. G., 1990, Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b, *Biochemistry*, 29, 10745-10757. ^[24]
- ❖ Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., 1963, Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, *J. Mol. Biol.*, 6, 306-329 ^[25]
- ❖ McLaughlin, P.J., Stuart, D.I., Klein, H.W., Oikonomakos, N.G., and Johnson, L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry* 23, 5862-5873. ^[26]
- ❖ www.chusa.jussieu.fr ^[27]
- ❖ Oikonomakos, Costas Tiriadis, Kyra-Melinda Alexacou, Spyros E. Zographos, Demetres D. Leonidas , Thanasis Gimisis, NG., A potential anti-hyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase ^[28]
- ❖ Oikonomakos, N.G. 2002, Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586 ^[29]
- ❖ Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. 2008, New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983 ^[30]
- ❖ Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák L, Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B. and Gergely, P., 2002, The binding of N'-acetyl- and Benzoyl-N'-β-D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696 ^[31]
- ❖ Tsirkone G.V, Tsoukala E. , Lamprakis C. , Manta S. , Hayes M. J., Skamnaki T. V., Drakou C., Zographos E. S., Komiotis D, Leonidas D.D., 2010, 1-(3-Deoxy-3-fluoro-b-D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 3413–3425. ^[32]

- ❖ <http://www.iama.gr> ^[33]
- ❖ Anna Apostolou , Dimitrios Stagos , Elissavet Galitsiou , Argiris Spyrou , Serko Haroutounian , Nikolaos Portesis , Ioanna Trizoglou , A. Wallace Hayes , Aristides M. Tsatsakis , Dimitrios Kouretas , Food and Chemical Toxicology (2013), Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts. ^[34]