



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ASSESSMENT OF THE HYPOGLYCAEMIC ACTION OF POLYPHENOLIC
EXTRACTS FROM HYPRODUCTS OF INDUSTRIAL PROCESS OF
POMEGRANATE



Λίγγη Παναγιώτα

Λάρισα, 2013

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- *Δρ. Λεωνίδα Δ. Δημήτριος*

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- *Δρ. Κοντού Μαρία*

Λέκτορας Κλινικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- *Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία*

Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
1 Εισαγωγή.....	9
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	9
1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ινσουλινο-εξαρτώμενος, IDDM).....	10
1.1.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (μη ινσουλινο-εξαρτώμενος, NIDDM).....	10
1.1.3 Κλινικά χαρακτηριστικά σακχαρώδη διαβήτη.....	11
1.2 Ομοιοστασία της γλυκόζης.....	11
1.2.1 Ινσουλίνη – Γλυκαγόνη.....	12
2 Βασικές γνώσεις.....	18
2.1 Γλυκόζη.....	18
2.2 Γλυκογόνο.....	19
2.2.1 Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	20
2.3 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP).....	24
2.3.1 Γενικά.....	24
2.3.2 Η PLP συμμετέχει στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου.....	25
2.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	27
2.4.1 Γενικά.....	27
2.4.2 Δομή.....	28
2.4.3 Μηχανισμός δράσης.....	29
2.4.4 Ρύθμιση.....	30
2.4.5 Κρυσταλλική δομή και κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	34
2.4.6 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	37
2.4.7 Φυσικά εκχυλίσματα ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα.....	39
2.4.8 Εκχυλίσματα ροδιού.....	39
2.5 Κινητική ενζύμων και ενζυμική αναστολή.....	40

2.6	Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	45
2.7	Επεξεργασία εκχυλίσματος ροδιού και παραλαβή.....	46
3	Αρχές κρυστάλλωσης πρωτεϊνών.....	47
3.1	Γενικά.....	47
3.2	Κρυστάλλωση.....	47
3.3	Ακτίνες-X/ Συνθήκη του Bragg.....	47
3.4	Επεξεργασία με μετασχηματισμό Fourier.....	49
3.5	Προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής.....	49
4	Πειραματικό μέρος.....	51
4.1	Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού.....	51
4.2	Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	55
4.2.1	Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου.....	55
4.2.2	Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (Km).....	56
4.2.3	Προσδιορισμός IC ₅₀ αναστολέα.....	57
4.3	Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b.....	59
4.4	Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης.....	59
4.5	Παρασκευή τυφλών.....	62
4.6	Προσδιορισμός φωσφόρου.....	62
4.7	Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Gfit.....	64
4.8	Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων της Grb.....	66
4.9	Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου- αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη.....	68
4.10	Έκθεση πρωτεϊνικού μονοκρυστάλλου σε ακτίνες X.....	69
4.11	Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	71
4.12	Κρυσταλλογραφική μελέτη του εκχυλίσματος 11 (ποικιλίας Wonderful).....	71
5	Σκοπός της εργασίας.....	75
6	Αποτελέσματα- Συζήτηση.....	76
6.1	Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου.....	76
6.2	Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων.....	78

6.2.1	Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου.....	78
6.2.2	Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού.....	78
6.3.	Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης.....	81
7	Βιβλιογραφία.....	91

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Λειτουργικής και Δομικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος – Ιούνιος 2013.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, που μου έδωσε την δυνατότητα να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία. Οι γνώσεις του αλλά και η καθοδήγησή του υπήρξαν σημαντικές. Ευχαριστώ επίσης την Δρ. Κοντού Μαρία και την Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία για τη συνεργασία τους.

Θα ήθελα να εκφράσω επίσης τις ευχαριστίες μου στον καθ. Σ. Χαρουτουνιάν και στο εργαστήριο του στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την προσφορά των εκχυλισμάτων των παραπροϊόντων της διαδικασίας παραγωγής χυμού από ρόδι.

Η παρούσα εργασία δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την πολύτιμη συνεργασία και βοήθεια της υποψήφιας διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Π.Θ., Αναστασία Καντσάδη. Η υπομονή και η βοήθειά της στο εργαστήριο ήταν κομβικές.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τον μεταπτυχιακό φοιτητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Γεώργιο Στραβοδήμο για την ψυχολογική υποστήριξη καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν.

Εύχομαι σε όλους επαγγελματική και προσωπική επιτυχία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης, μια από τις σοβαρότερες μεταβολικές διαταραχές του δυτικού κόσμου, χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης. 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 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 μυς κουνελιού και μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση εκχυλίσματος ενός παραπροϊόντος της διαδικασίας παραγωγής χυμού από ρόδι της ποικιλίας Wonderful, στην ενζυμική δραστηριότητα. Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι το εκχύλισμα εμφανίζει μια μέτρια ανασταλτική δράση στη δραστηριότητα του ενζύμου με σταθερά αναστολής, $IC_{50} 9.73 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$.

ABSTRACT

Diabetes mellitus, one of the most serious hormonal imbalance diseases, is characterized by elevated blood glucose levels (hyperglycemia) and glucose metabolism imbalance, 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 and substrates involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets in order to discover molecules, which activate or inactivate them. In this way, the enzyme glycogen phosphorylase is one of the most important molecular targets for designing new hypoglycemic drugs.

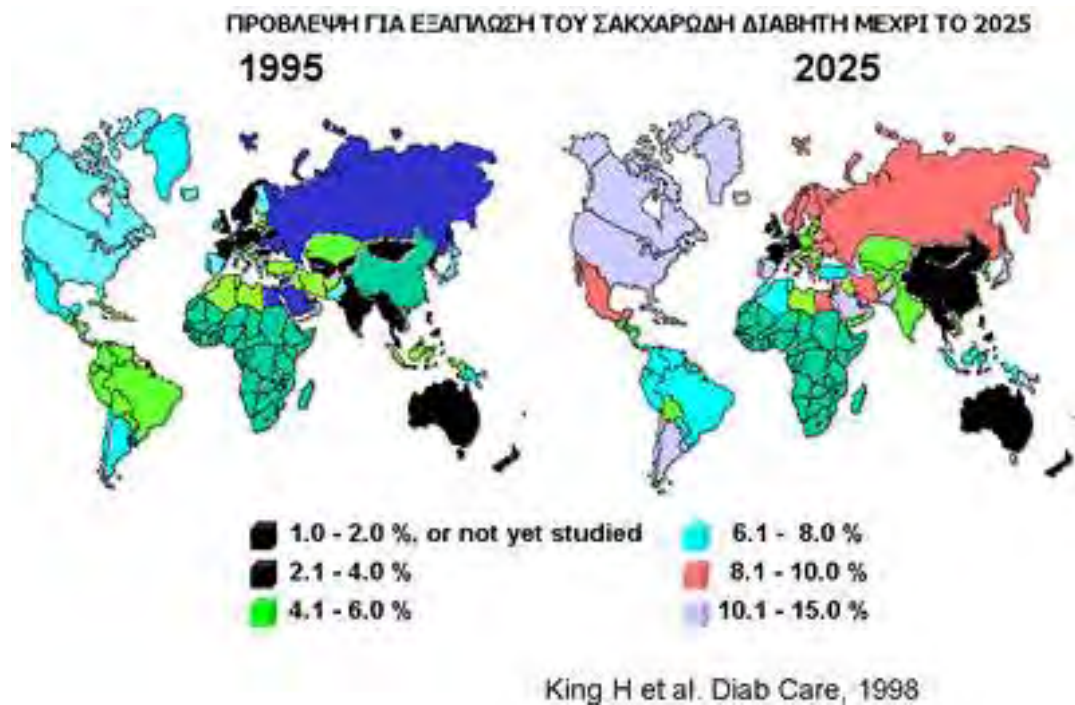
In the present study, we isolated the enzyme glycogen phosphorylase b from rabbit skeletal muscles and studied with kinetic experiments, the effect of a polyphenolic extract from the byproducts of the industrial productions of juice from pomegranates on its enzymatic activity. The kinetic experiments, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that the extract displays moderate inhibitory potency for GPb with IC_{50} value of $9.73 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια συνήθη πάθηση με επίπτωση περίπου 1-2% στο δυτικό κόσμο. Ο διαβήτης μπορεί να είναι δευτεροπαθής λόγω άλλων ασθενειών π.χ. χρόνια παγκρεατίτιδα, μετά από εγχείρηση παγκρέατος και σε καταστάσεις αυξημένης έκκρισης ορμονών ανταγωνιστικών προς την ινσουλίνη π.χ. σύνδρομο Cushing και ακρομεγαλία. Ο δευτεροπαθής διαβήτης πάντως δεν είναι συνήθης πάθηση. Οι περισσότερες περιπτώσεις σακχαρώδη διαβήτη είναι πρωτοπαθείς, δηλαδή δεν σχετίζονται με άλλες καταστάσεις.

Διακρίνονται δύο ξεχωριστοί τύποι διαβήτη: ο διαβήτης τύπου I και ο διαβήτης τύπου II. Στον διαβήτη τύπου I (IDDM, ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης) υπάρχει καταστροφή των παγκρεατικών κυττάρων και ουσιαστικά ουδεμία έκκριση ινσουλίνης. Στον διαβήτη τύπου II (NIDM, μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης) είτε η έκκριση της ινσουλίνης γίνεται σε ανεπαρκή ποσότητα για να αποφευχθεί η υπεργλυκαιμία είτε παρατηρείται έλλειψη ευαισθησίας στη δράση της ινσουλίνης. Το 20% περίπου των ασθενών είναι ινσουλινοεξαρτώμενοι. Στους περισσότερους ασθενείς με NIDDM γίνεται διαιτητική θεραπευτική αγωγή με ή χωρίς υπογλυκαιμικά φάρμακα χορηγούμενα από το στόμα.



Εικόνα 1: Πρόβλεψη για εξάπλωση του σακχαρώδη διαβήτη μέχρι το 2025

1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (IDDM)

Ο IDDM συνήθως εμφανίζεται σε οξεία μορφή σε νεαρά άτομα με συμπτώματα που εξελίσσονται σε περίοδο ημερών ή μόνο λίγων εβδομάδων. Παλιότερα ονομαζόταν «νεανικός διαβήτης». Υπάρχουν ενδείξεις ότι της εμφάνισης των συμπτωμάτων προηγείται μια προδιαβητική περίοδος πολλών μηνών, κατά την οποία διαπιστώνεται έλλειψη αύξησης του σώματος, πτώση στην ανταπόκριση της ινσουλίνης στη γλυκόζη, καθώς και διάφορες ανοσολογικές διαταραχές.

Αυτός ο τύπος διαβήτη, είναι σε πολύ μικρότερη συχνότητα οικογενής (σε μονοζυγωτικά δίδυμα ο ρυθμός συμφωνίας είναι περίπου 40%), όμως παρατηρείται ισχυρή συσχέτιση με μερικά αντιγόνα ιστοσυμβατότητας, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο IDDM είναι αυτοάνοση ασθένεια και ότι η επιρρέπεια σε αυτός οφείλεται εν μέρει σε γενετικούς παράγοντες. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι ιοί είναι αιτιολογικοί παράγοντες του IDDM. Φλεγμονή των νησίδων του παγκρέατος οδηγεί σε καταστροφή των κυττάρων των νησίδων και επομένως σε έλλειψη ινσουλίνης.

1.1.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II (NIDDM)

Ο NIDDM τείνει να εμφανίζεται σε πιο χρόνια μορφή στους μεσήλικες και γέρους, με συμπτώματα που εξελίσσονται κατά τη διάρκεια πολλών μηνών ή ακόμη

περισσότερο. Η επικράτησή του αυξάνεται καθώς αυξάνεται η ηλικία και φθάνει περισσότερο του 10% σε άτομα μεγαλύτερα των 75 ετών. Παλιότερα ονομαζόταν «διαβήτης της ωρίμου ηλικίας».

Η ακριβής παθογένεση του NIDDM δεν είναι γνωστή. Η πάθηση δείχνει ισχυρή οικογενή επίπτωση. Ο ρυθμός συμφωνίας σε ομοζυγωτικά δίδυμα είναι περισσότερο από 90%. Παρόλα αυτά η κληρονομικότητα είναι απρόβλεπτη. Έχουν αναγνωρισθεί πολλά γονίδια τα οποία συμβάλλουν στην αυξημένη επιρρέπεια (π.χ. το γονίδιο για την γλυκοκινάση). Επίσης, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Σε μερικούς ασθενείς με NIDDM, τα κύτταρα των παγκρεατικών νησίδων είναι ιστολογικά φυσιολογικά, ενώ σε άλλους παρατηρείται έλλειψη ευαισθησίας των συγκεκριμένων κυττάρων στη γλυκόζη. Ακόμα, σε παχύσαρκους κυρίως ασθενείς, σημειώνεται αύξηση των συγκεντρώσεων ινσουλίνης του πλάσματος και αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης.

1.1.3. Κλινικά χαρακτηριστικά σακχαρώδη διαβήτη

- Υπεργλυκαιμία: είναι κυρίως αποτέλεσμα αυξημένης παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό από μειωμένη απομάκρυνση της γλυκόζης από το αίμα.
- Γλυκοζουρία: η αύξηση των επιπέδων γλυκόζης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση γλυκόζης στα ούρα.
- Πολουουρία: η γλυκοζουρία καταλήγει σε οσμωτική διούρηση αυξάνοντας την απέκκριση νερού.
- Πολυδιψία: άμεσο αποτέλεσμα της πολουουρίας είναι η αύξηση της οσμωμοριακότητας του πλάσματος διεγείροντας έτσι το κέντρο δίψας.
- Απώλεια βάρους: η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης έχει ως αποτέλεσμα την επιβράδυνση αναβολικών διεργασιών και την επιτάχυνση καταβολικών με συνέπεια την απώλεια βάρους παρόλο που διεγείρεται το κέντρο πείνας.

1.2 Ομοιοστασία της γλυκόζης

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:

1. Την ικανότητα του παγκρέατος να εκκρίνει ινσουλίνη, τόσο οξέος, όσο και σε συνεχόμενο ρυθμό.
2. Την ικανότητα της ινσουλίνης να αναστέλλει την έξοδο της ηπατικής γλυκόζης και να προωθεί την εναπόθεση της γλυκόζης στο ήπαρ (ευαισθησία ινσουλίνης).
3. Την ικανότητα της γλυκόζης να εισέρχεται στα κύτταρα απουσία ινσουλίνης (ευαισθησία γλυκόζης ή αποτελεσματικότητα γλυκόζης. [Σωτήριος Α. Ράπτης, 1998]

1.2.1. Ινσουλίνη- Γλυκαγόνη

Η ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτιδίο μοριακού βάρους περίπου 6000. Παράγεται στα νησίδια Langerhans του παγκρέατος, συγκεκριμένα από τα β-κύτταρα, και εκκρίνεται απ' ευθείας στην κυκλοφορία του αίματος (ενδοκρινής ορμόνη). Αρχικά, παράγεται ένα πολυπεπτιδίο 11,5 kDa, η προ-προϊνσουλίνη, η οποία στο ενδοπλασματικό δύκτιο μετατρέπεται σε προ-ινσουλίνη (9 kDa). Στα κυστίδια του Golgi η προ-ινσουλίνη πέπτεται δίνοντας 2 μόρια: το πεπτιδίο C και την ώριμη πλέον, ενεργή, ινσουλίνη. Η ώριμη ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτιδίο περίπου 6 kDa, αποτελούμενη από 51 αμινοξέα, 21 αμινοξέα στην A αλυσίδα και 30 στη B.

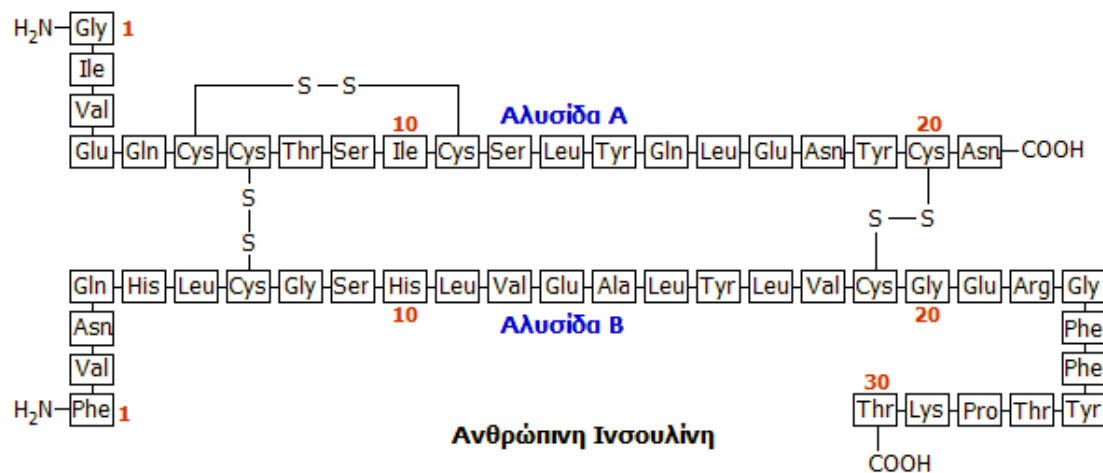
Φυσιολογικός ρόλος της ινσουλίνης είναι η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα, καθώς αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης από τους μυς και τον λιπώδη ιστό ενώ στο ήπαρ μειώνει το ρυθμό γλυκογονόλυσης, την γλυκονεογένεση και αυξάνει τη γλυκογονογένεση.

Επίσης, η ινσουλίνη επιδρά άμεσα και έμμεσα στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών. Όσον αφορά την άμεση επίδρασή της, η ινσουλίνη αυξάνει την δίοδο των περισσότερων αμινοξέων από την κυτταρική μεμβράνη, τη σύνθεση RNA και τη σύνθεση πρωτεϊνών στα ριβοσώματα. Η έμμεση επίδρασή της συνίσταται στο γεγονός ότι αυξάνει τη χρησιμοποίηση γλυκόζης από τα κύτταρα για παραγωγή ενέργειας, η οποία χρησιμοποιείται κατά προτίμηση πλέον από τα κύτταρα για το σκοπό αυτό και έτσι εξοικονομούνται πρωτεΐνες.

Η ουσιώδης επίδραση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών εξηγεί το σημαντικό της ρόλο στην ανάπτυξη του σώματος. Ακόμα, επηρεάζει και τον μεταβολισμό των λιπιδίων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση της αποθήκευσης του λίπους και η παρεμπόδιση τόσο της κινητοποίησης του όσο και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Τέλος, η ινσουλίνη μειώνει την συγκέντρωση καλίου, φωσφόρου και μαγνησίου στο πλάσμα του αίματος, επηρεάζει τη σύνθεση ορισμένων ενζύμων στο ήπαρ, προκαλεί αγγειοδιαστολή στα αιμοφόρα αγγεία των σκελετικών μυών κλπ.

Η έκκριση ινσουλίνης επηρεάζεται κατ' αρχήν, από την συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα. Αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης, της φρουκτόζης ή της μαννόζης, προκαλεί έκκριση της ινσουλίνης. Επίσης, η αύξηση της συγκέντρωσης αμινοξέων έχει το ίδιο αποτέλεσμα. Η έκκριση ινσουλίνης είναι μεγαλύτερη αμέσως μετά την πρόσληψη τροφής ενώ μειώνεται κατά τη νηστεία. Τα κετονικά σώματα επίσης, μπορούν να αυξήσουν την έκκρισή της, σε αρκετά μεγάλες, όμως, συγκεντρώσεις. Ορμόνες του γαστρεντερικού σωλήνα, η αυξητική ορμόνη και τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την ανταπόκριση των β-κυττάρων του παγκρέατος στην υπεργλυκαιμία. Η συγκέντρωση θυροξίνης και ασβεστίου επηρεάζει την έκκριση της ινσουλίνης. Τέλος, η διέγερση του παρασυμπαθητικού διεγείρει την έκκρισή της ενώ, η διέγερση του συμπαθητικού την αναστέλλει.

Η ινσουλίνη μετά την έκκρισή της από το πάγκρεας και πριν φτάσει στην περιφερική (συστηματική) κυκλοφορία διέρχεται αναγκαστικά από το ήπαρ, όπου μπορεί να αδρανοποιηθεί το 40% περίπου της ινσουλίνης.

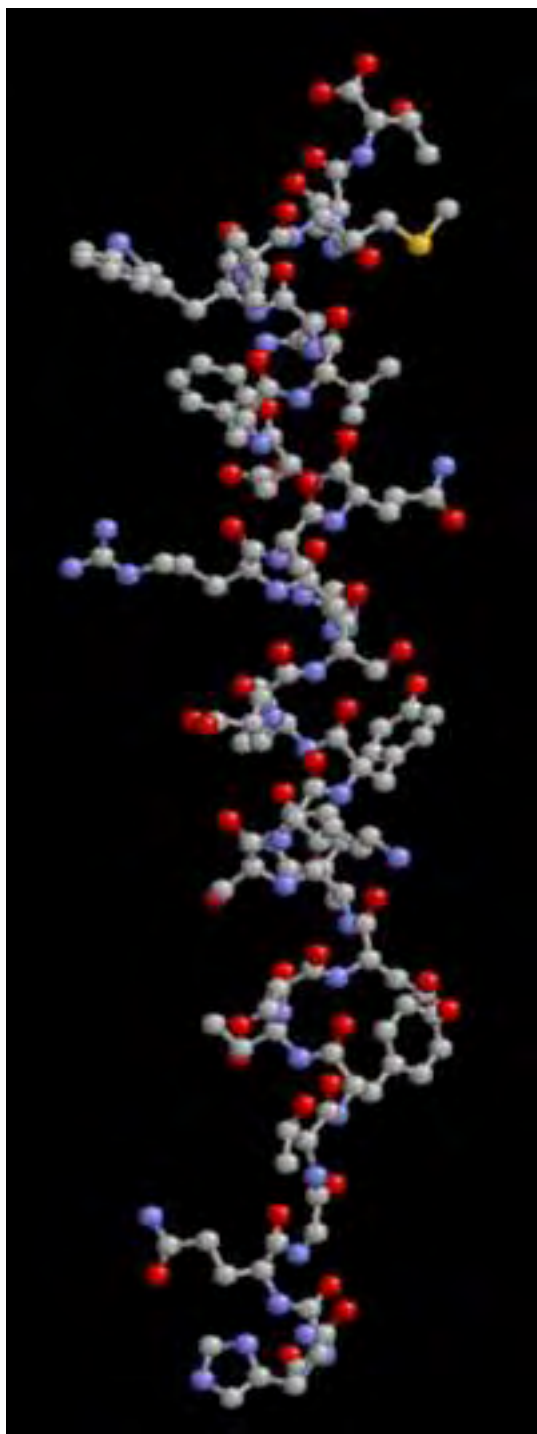


Εικόνα 2: Ανθρώπινη ινσουλίνη

Η γλυκαγόνη είναι ένα πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 3.500 που παράγεται στα α-κύτταρα των νησίδων Langerhans. Απαντάται στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς. Κυκλοφορεί ελεύθερη στο αίμα και έχει ημιπερίοδο ζωής 3-4 λεπτά. Η γλυκαγόνη καταστρέφεται κυρίως στο ήπαρ και το μεγαλύτερο μέρος της απεκκρίνεται στη χολή. Επίσης, γλυκαγόνη καταστρέφεται και στους νεφρούς και ένα μικρό μέρος στο αίμα.

Φυσιολογικός ρόλος της γλυκαγόνης είναι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Δρα κυρίως στο ήπαρ αυξάνοντας την αποδόμηση του γλυκογόνου σε γλυκόζη (γλυκογονόλυση) και αυξάνει και τη γλυκονεογένεση. Η γλυκαγόνη αυξάνει επίσης τη διαπερατότητα της μεμβράνης των ηπατικών κυττάρων στα αμινοξέα και επιταχύνει τον μεταβολισμό τους για την παραγωγή γλυκόζης (γλυκονεογένεση). Τέλος, αυξάνει την σύνθεση ορισμένων ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των αμινοξέων.

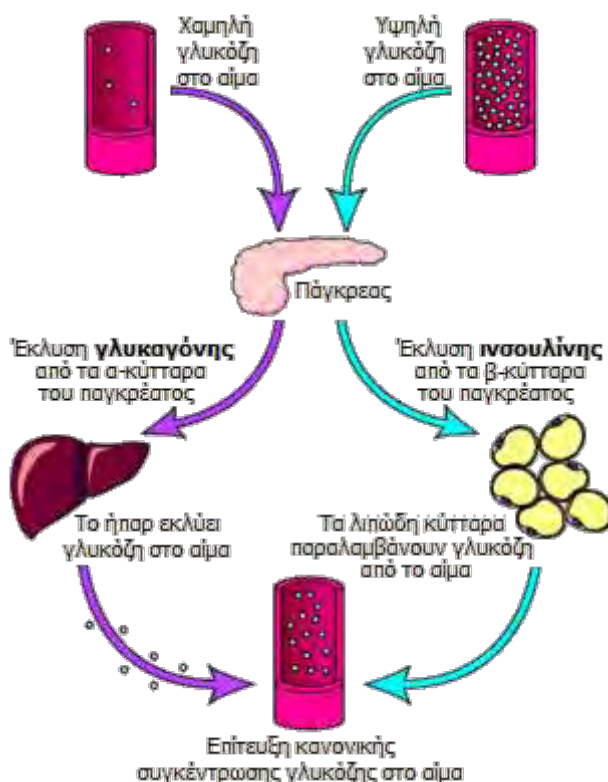
Η έκκριση της γλυκαγόνης επηρεάζεται κυρίως από την συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα. Αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκκρισης της γλυκαγόνης. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η ινσουλίνη είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία των α-κυττάρων.



Εικόνα 3: Δομή γλυκαγόνης

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.

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 μυικά 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.



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.

Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης πέσουν κάτω από 4 mmol/L, 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.

2.ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

2.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη ή δεξτρόζη, είναι το πιο γνωστό σάκχαρο. Πρόκειται 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 $C_6H_{12}O_6$ (**Εικόνα 5**). 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. [Stryer, 2007]



Εικόνα 5: Δομή γλυκόζης

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).

Αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τους περισσότερους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς. Στα θηλαστικά, η γλυκόζη είναι το μοναδικό καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος σε συνθήκες επάρκειας τροφής και το μοναδικό καύσιμο που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ερυθροκύτταρα σε οποιαδήποτε περίπτωση. 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. Η συγκέντρωση της 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 [Stryer, 2007].

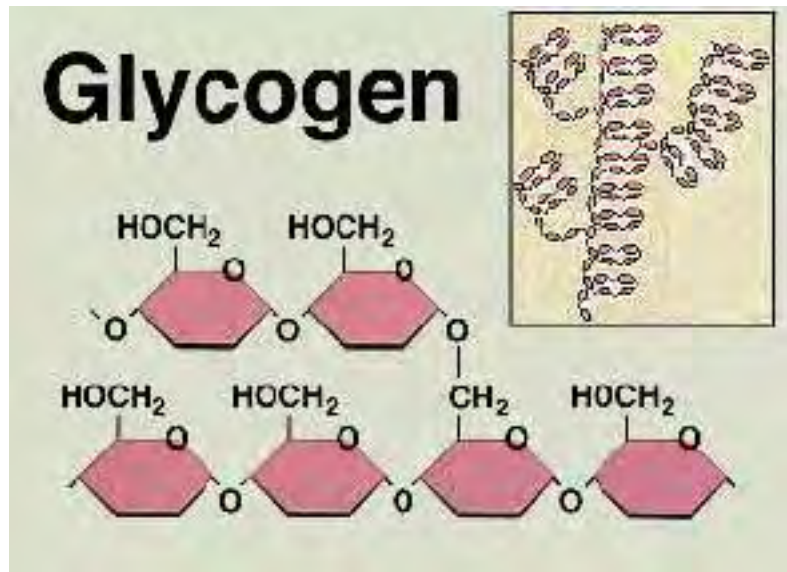
Συνηθέστερα όμως η γλυκόζη μετατρέπεται σε έναν πολυσακχαρίτη πολυσακχαρίτη, προκειμένου να αποθηκευτεί και να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, που στα φυτά είναι το άμυλο και στα θηλαστικά το γλυκογόνο.

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 [McArdle *et al.*, 2000].

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 [Martin *et al.*, 1998]. 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 [McArdle *et al.*, 2000].

2.2 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι η αποθηκεύσιμη μορφή της γλυκόζης στα ζωικά κύτταρα. 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 (**Εικόνα 6**)



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 σύνολο. 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 [Stryer, 2007].

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

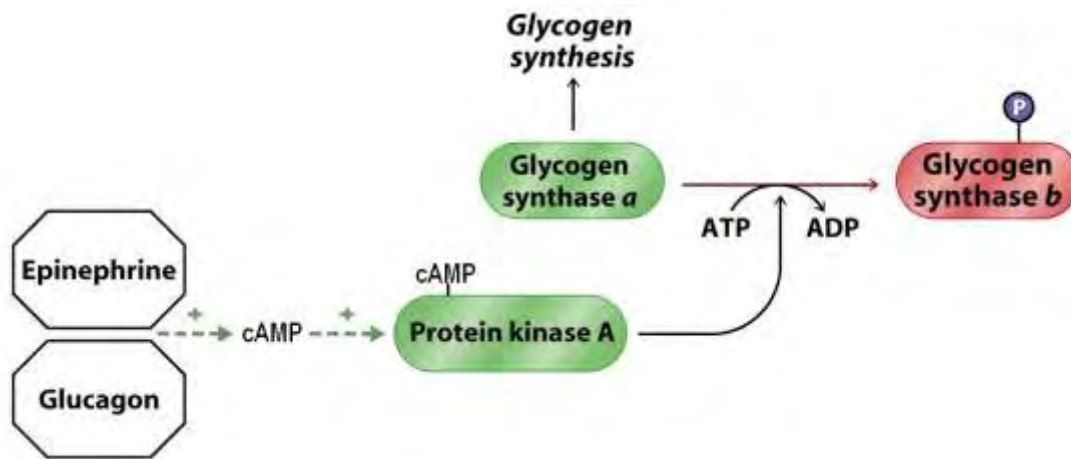
Η 6-φωσφορική γλυκόζη που προέρχεται από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου ακολουθεί 3 κατευθύνσεις. Μπορεί να αποτελέσει το υπόστρωμα για τη γλυκόλυση, να επεξεργαστεί με την πορεία των φωσφορικών πεντοζών προς απόδοση NADPH και παραγώγων της ριβόζης, ή τέλος, να μετατραπεί σε ελεύθερη γλυκόζη προς απελευθέρωση 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 [Stryer, 2007].

- 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 μια πρωτεΐνη (γλυκογονίνη) 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, περιέχει και πρωτεΐνες. Η αντίδραση της σύνθεσης του γλυκογόνου καταλύεται από τη GS σύμφωνα με την **Εικόνα 7**:



Εικόνα 7: Σύνθεση του γλυκογόνου

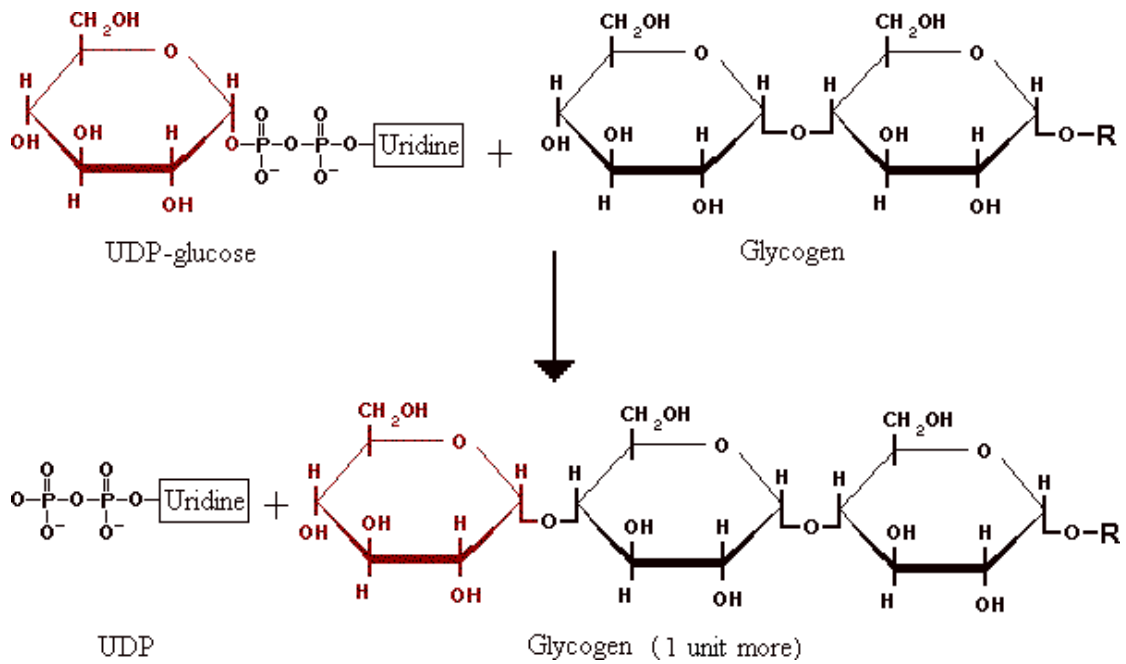
Η GS καταλύει τη μεταφορά της ενεργοποιημένης γλυκοζυλικής μονάδας από την UDP (ουριδινοφωσφορική) γλυκόζη στο υδροξύλιο του C-4 ενός άκρου του γλυκογόνου προς τον σχηματισμό ενός γλυκοζιτικού δεσμού α-1,4. Κατά την επιμήκυνση, η UDP αντικαθίσταται από την τελική υδροξυλική ομάδα του αυξανόμενου μορίου του γλυκογόνου. [Stryer, 2007]

- Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

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.

Το κύριο ένζυμο στη διαδικασία της αποικοδόμησης του γλυκογόνου είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP). Η 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 αντίδραση που πραγματοποιείται φαίνεται στην

Εικόνα 8:



Εικόνα 8: Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου. 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 και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται. [Stryer, 2007]

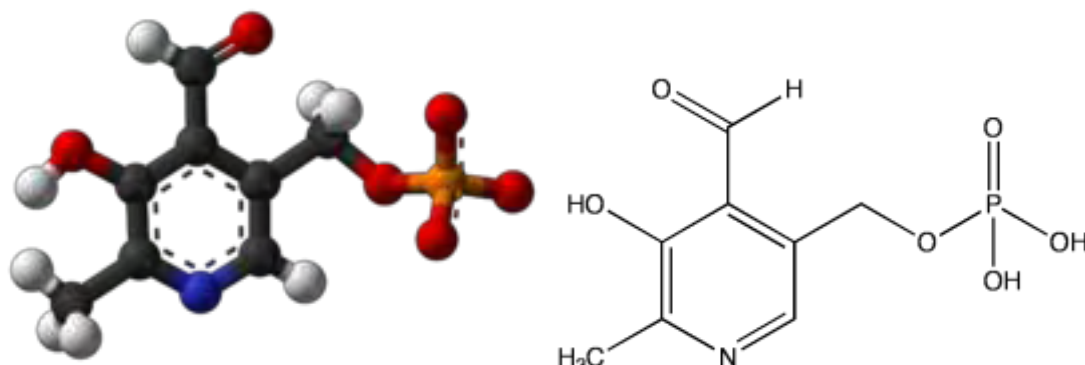
Όμως η GP μπορεί να φέρει εις πέρας την πορεία αυτή από μόνη της μόνο σε περιορισμένη έκταση. Συγκεκριμένα η GP σταματά τη διάσπαση των δεσμών α-1,4 όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο διακλάδωσης, και αυτό γιατί η GP δεν μπορεί να διασπάσει τους δεσμούς α-1,6 των διακλαδώσεων. 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. [Stryer, 2007]

2.3 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP)

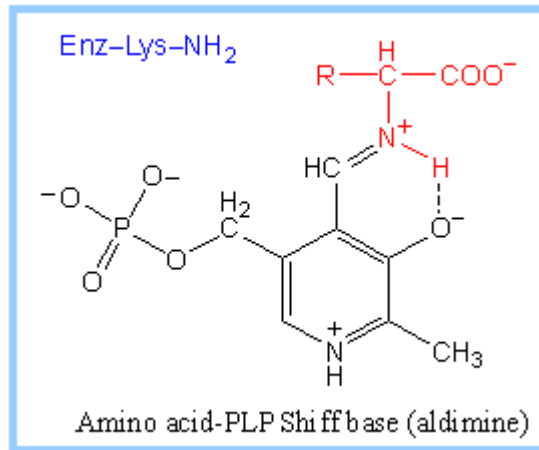
2.3.1 Γενικά

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 (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9: Τρισδιάστατη και συντακτική δομή της PLP

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 (**Εικόνα 10**).



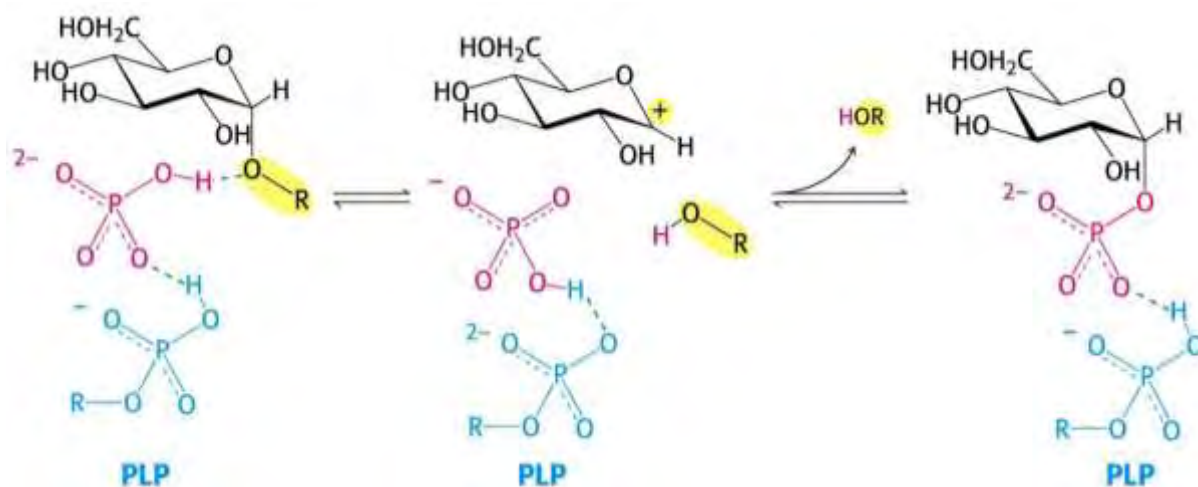
Εικόνα 10: Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Επιπλέον, η PLP χρησιμοποιείται από αμινοτρασφεράσες (ή τρανσαμινάσες) που δρουν σε ασυνήθιστα σάκχαρα, όπως η περοξαμίνη. 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 προπυλαμίνη, πρόδρομο μόριο των πολυαμινών.

2.3.2 Η PLP συμμετέχει στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση θα πρέπει να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά ώστε να εξοικονομήσει το ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση 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**).



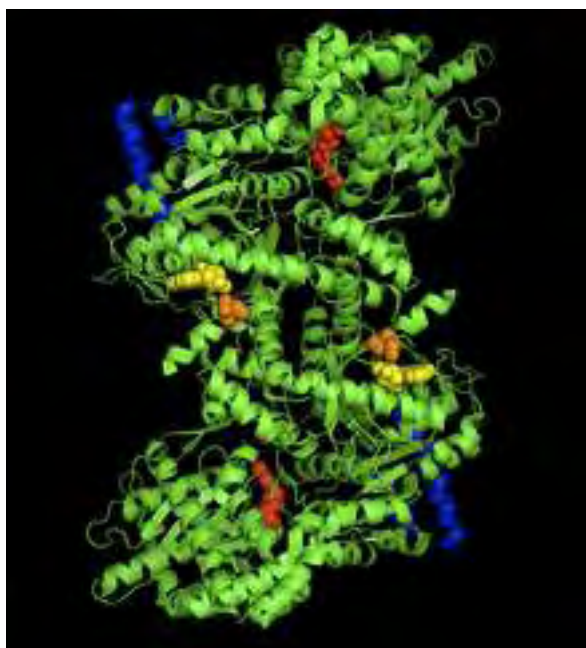
Εικόνα 11: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα HPO_4^{2-} (κόκκινο) εννοεί τη διάσπαση του γλυκοζυτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και εννοείται από τη μεταφορά 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 [Stryer, 2007].

2.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

2.4.1 Γενικά

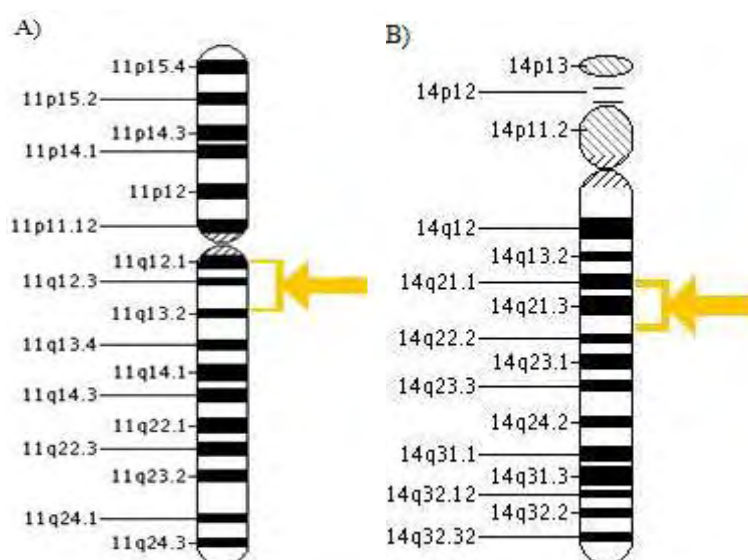
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα από τα κυριότερα φωσφορολυτικά ένζυμα. Ανήκει στην τάξη των τρανσφερασών στην υπόταξη των γλυκοζυλοτρανσφερασών και στην υπο-υποτάξη των εξοζυλοτρανσφερασών σύμφωνα με την IBU και IUPAC όσον αφορά την φύση της αντίδρασης που καταλύει και έχει συστηματική ονομασία 1,4- α -D-γλυκο:φωσφορικό α -D γλυκοτρανσφεράση. Ήταν το πρώτο αλλοστερικό ένζυμο που ανακαλύφθηκε από τους Carl & Gerty Cori. Το 1943, με τη βοήθεια του Arda Green, το ζευγάρι έδειξε πως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου 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.



Εικόνα 12: Φωσφορυλάση γλυκογόνου

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 μύς, 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 στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι 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 γλυκόζης. [Stryer, 2007] Το γονίδιο της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου εντοπίζεται στο **11q12-q13.2**, της ηπατικής στο **14q11.2-q24.3**, και του εγκεφάλου στο **20p11.2-11.1**. (Εικόνα 13)



Εικόνα 13: Οι γενετικοί τόποι των γονιδίων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.
A) ο γενετικός τόπος της μυϊκής ισομορφής, B) ο γενετικός τόπος της ηπατικής ισομορφής

Μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά οδηγούν σε διάφορες νόσους όπως η νόσος McArdle's που προκαλείται από πάνω από 65 μεταλλάξεις στο γονίδιο της μυϊκής φωσφορυλάσης με κύριο σύμπτωμα την αδυναμία των μυών και τη μυαλγία, και η νόσος του Her, που οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο της ηπατικής φωσφορυλάσης, με ήπια συμπτώματα όπως η υπογλυκαιμία. Η ισομορφή του εγκεφάλου έχει προταθεί σαν βιοδείκτης για τον καρκίνο του γαστρικού.

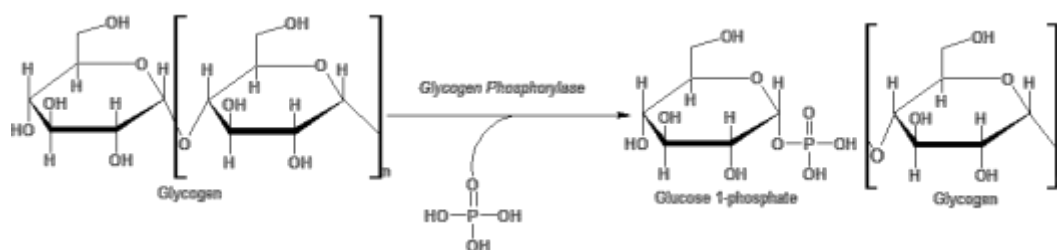
2.4.2. Δομή

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. [Stryer, 2007] Συνεπώς, κάθε υπομονάδα αποτελείται από χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, αλλοστερικές περιοχές και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

2.4.3 Μηχανισμός δράσης

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) 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 (Εικόνα 14). Εκεί, τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γειννίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H_2O . 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. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση.



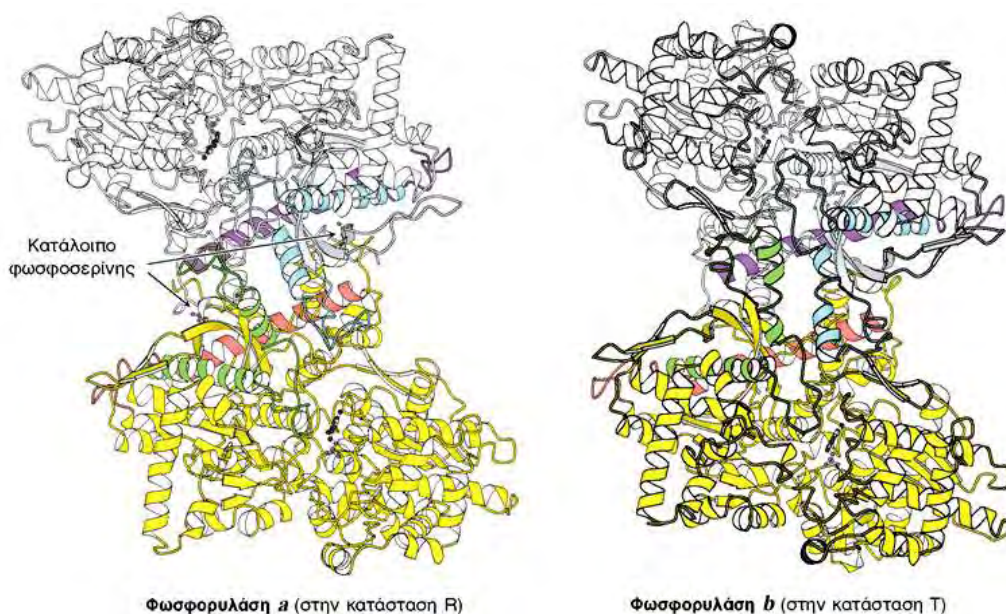
Εικόνα 14: Μηχανισμός δράσης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου: το γλυκογόνο, παρουσία ορθοφωσφορικού ανιόντος και μέσω της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, μετατρέπεται σε 1-φωσφορική α-D-γλυκόζη και HOR (η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερη)

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.

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπομενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. 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. [Stryer, 2007] 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). [Rath et al.2000]

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 15**). 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. [Stryer, 2007]

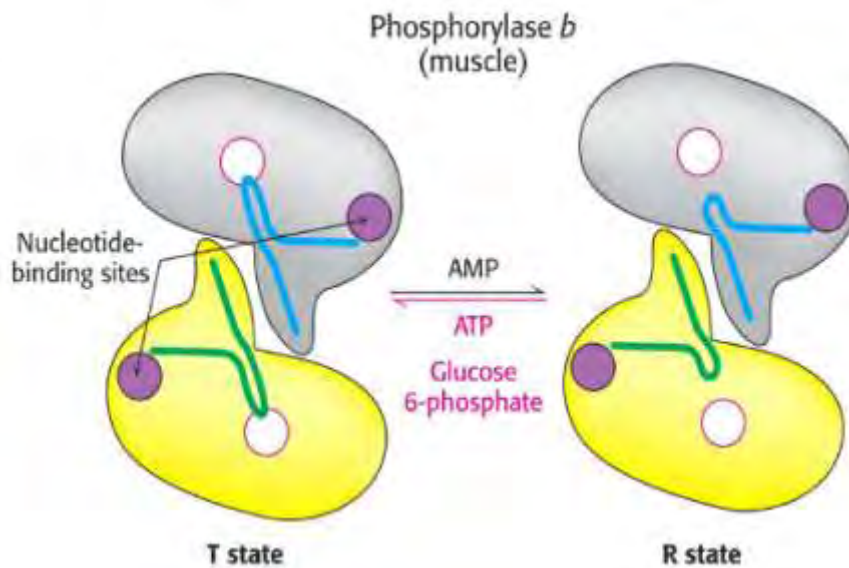


Εικόνα 15: Δομή της φωσφορυλάσης *a* και *b*. Η φωσφορυλάση *a* φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο Ser14 κάθε υπομονάδας. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη δομή της περισσότερο ενεργής R διαμόρφωσης. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στρόφες που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση φαίνονται 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.

http://www.chusa.jussieu.fr/disc/bio_cell/docs_Anim/P1%20Documents%20M%E9tabolisme/

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 *a* είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP, του ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης (**Εικόνα 16**). Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μυς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής

γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια. [Stryer, 2007]

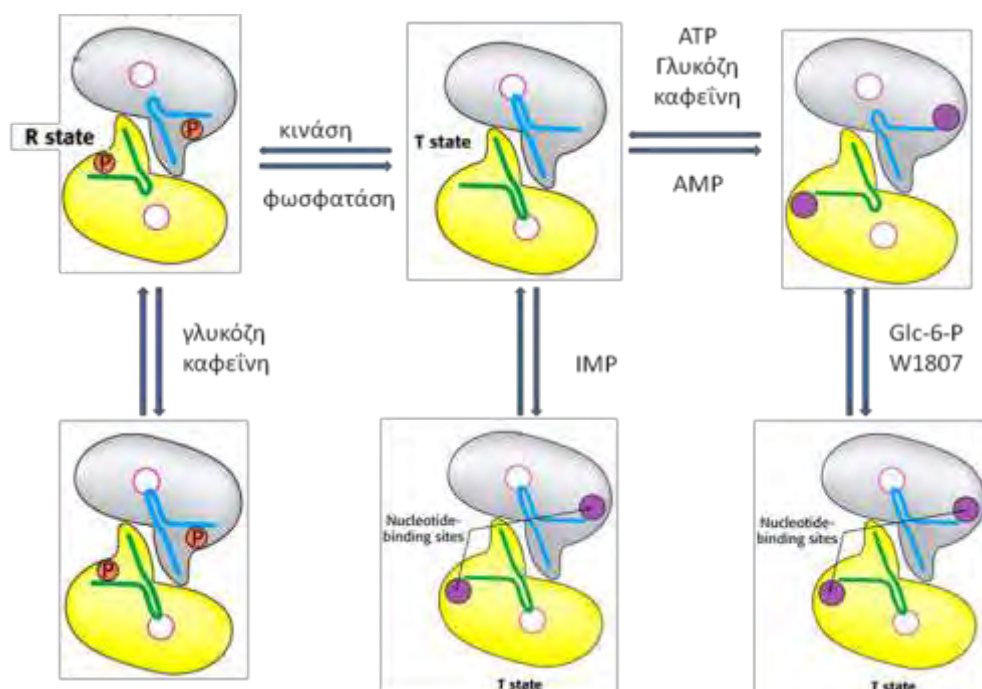


Εικόνα 16: Αλλοστερική ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης: Ένα χαμηλό ενεργειακό φορτίο που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP, ευνοεί την μετάβαση στη μορφή R

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 17).

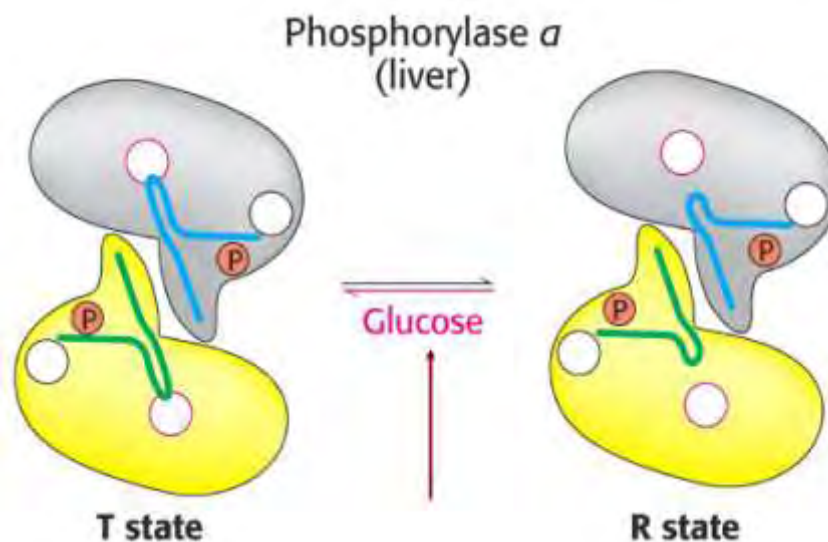


Εικόνα 17

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 ομοίωση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. 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 18). 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. [Stryer, 2007]



Εικόνα 18: 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

Οι κρυσταλλικές δομές της GP α και της GP β (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.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου περιέχει 6 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 άλλα αμινοξέα και των 2 υπομονάδων. [Stryer, 2007]

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 $\alpha 2$ και $\alpha 8$ και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

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. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

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. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

E) Το κέντρο αναστολής

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. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

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. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

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. [Oikonomakos *et al.*, 2002]

2.4.6 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 [Oikonomakos 2001]. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών

σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν 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 [Oikonomakos, 2002].

Ωστόσο η ύπαρξη των τριών ισομορφών (της ηπατικής, της μυϊκής και του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Συγκεκριμένα για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο άλλες ισομορφές [Somsak et al., 2008]. Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, 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 [Oikonomakos et al., 2008].

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) που μελετήθηκε με ακτίνες X, έχει προσδιορισθεί σε υψηλή ευκρίνεια. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιορισθεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων [Blundell et al., 2002].

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με $K_i \approx 1 \mu\text{M}$, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης [Witters & Avruch, 1978] στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο υπολογισμός υποθέτει πως το σύνολο του φαρμάκου φτάνει στο στόχο του. Αν όμως ληφθεί υπ' όψη η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου τότε απαιτείται αναστολέας με $K_i \approx 0.1 \mu\text{M}$.

2.4.7 Φυτικά εκχυλίσματα ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά σκευάσματα

Τα εκχυλίσματα σταφυλιών, το κρασί, το ρόδι και τα παράγωγά του (χυμός) έχουν μελετηθεί στο παρελθόν ως προς τις ευεργετικές τους δράσεις στην ανθρώπινη υγεία [Haroutanian et al., 2013]. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τις πιθανές ευεργετικές πολυφαινολικών εκχυλισμάτων υποπροϊόντων οινοποιίας σταφυλιού και προϊόντα και παραπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής χυμού από το φυτό ροδιά στην αντιμετώπιση του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2.

2.4.8 Εκχυλίσματα ροδιού

Η Ροδιά παρουσιάζεται ως το παλαιότερο, καλλιεργημένο καρποφόρο δέντρο από το 3000 π.χ και οι καρποί της χρησιμοποιούνταν στην αρχαιότητα για τις θεραπευτικές ιδιότητες που διαθέτουν. Αυτό το φρούτο αναφέρεται ως σύμβολο της καλοτυχίας, της ευημερίας, της αφθονίας, της γονιμότητας και ως θεραπευτικό σε διάφορους πολιτισμούς και θρησκείες. Η ονομασία ρόδι προέρχεται από τη βοτανική ονομασία *PUNICA GRANATUM* που μεταφράζεται ως 'Μήλο με πολλούς καρπούς – σπόρια' [Gatsios., 2010].

Το φυτό είναι θάμνος και ανήκει στην οικογένεια *Punicaceae*. Προέρχεται από την Ασία (Ιράν και Βόρεια Ινδία) αλλά έχει καλλιεργηθεί χιλιάδες χρόνια και στη Μεσόγειο. Η πιο εμπορική ποικιλία στην Ελλάδα είναι η Wonderful η οποία προέρχεται από τη Φλόριντα των Η.Π.Α. Σύμφωνα με εκτιμήσεις το σύνολο της παγκόσμιας παραγωγής τα τελευταία χρόνια ανέρχεται σε 2.250.000 τόνους. Τα τελευταία χρόνια, αν και δεν υπάρχουν ακριβή στατιστικά στοιχεία φαίνεται ότι οι καλλιεργούμενες εκτάσεις ροδιάς έχουν αυξηθεί σημαντικά [Pradeepkumar et al., 2008]. Σύμφωνα με κλινικές και επιστημονικές μελέτες, έχει αποδειχτεί ότι η

κατανάλωση ροδιού έχει σημαντική ευεργετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό. Το ρόδι λόγω των συστατικών του προστατεύει τον ανθρώπινο οργανισμό και συμβάλει στην προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος, στην μείωση των συμπτωμάτων κατάθλιψης και απώλειας οστικής μάζας κατά την εμμηνόπαυση, την καταπολέμηση της υπέρτασης και την προστασία από εγκεφαλικές βλάβες, την αποτροπή της ανάπτυξης καρκινικών όγκων, της οξείδωσης της LDL και της αρτηριοσκλήρωσης, την καλή υγεία, ευεξία και προστασία του δέρματος (αντιγηραντικές ιδιότητες), αλλά έχει και αντιδιαβητική, αντιϊκή και αντιμυκοτοκτόνο δράση. Επίσης έχει παρατηρηθεί πως ο χυμός του ροδιού καθώς και τα έλαια των σπόρων έχουν αντιμικροβιακές δράσεις και βοηθούν στην καταπολέμηση φλεγμονών. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η περιεκτικότητα του χυμού του ροδιού σε αντιοξειδωτικά είναι τρεις φορές υψηλότερη από το πράσινο τσάι και το κόκκινο κρασί.



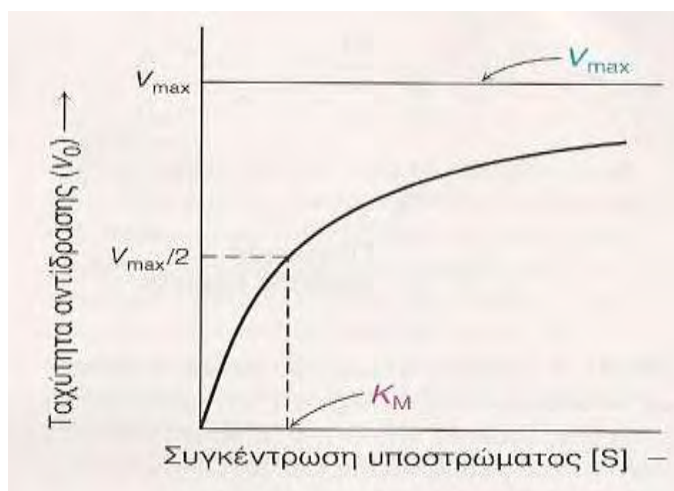
Εικόνα 19: Ρόδια ποικιλίας *wonderful*

Βιταμίνες A,C,E, σίδηρο, κάλιο, φυτικές ίνες, υδατάνθρακες αλλά και αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως τανίνες, πολυφαινόλες, ανθοκυανίνες και τόσα ακόμα πολύτιμα συστατικά χαρακτηρίζουν τη σύσταση του ροδιού.

2.5 Κινητική ενζύμων και ενζυμική αναστολή

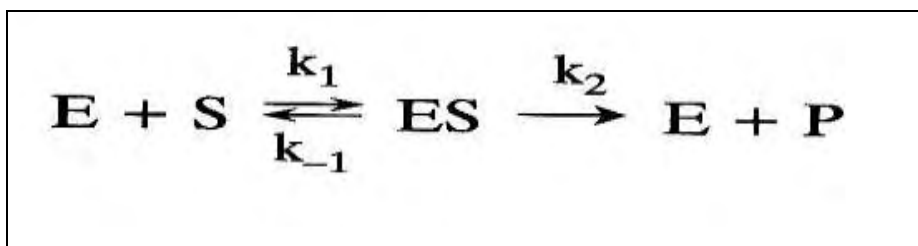
Η πρωταρχική λειτουργία των ενζύμων είναι να αυξάνουν τις ταχύτητες των αντιδράσεων έτσι ώστε να είναι συμβατές με τις ανάγκες του οργανισμού. Για πολλά

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, $[S]$, με τον τρόπο που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 20**. 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. [Stryer, 2007]



Εικόνα 20: 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:



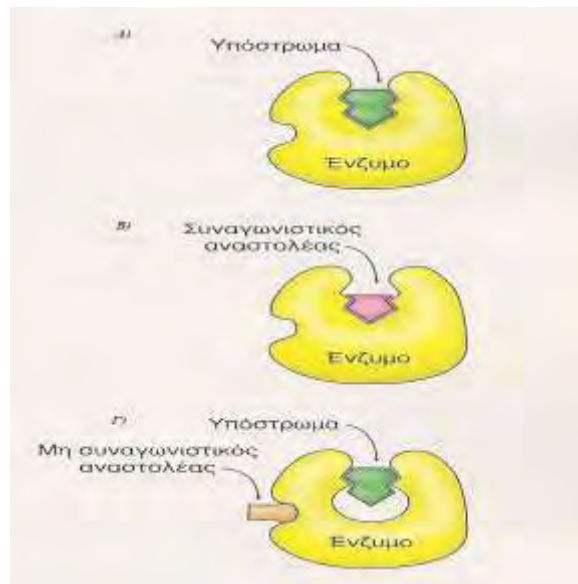
Από την παραπάνω σχέση προκύπτει μια σταθερά, η σταθερά Michaelis-Menten, η οποία ορίζεται ως εξής:

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

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}). [Stryer, 2007] Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α -D- Glc-1-P).

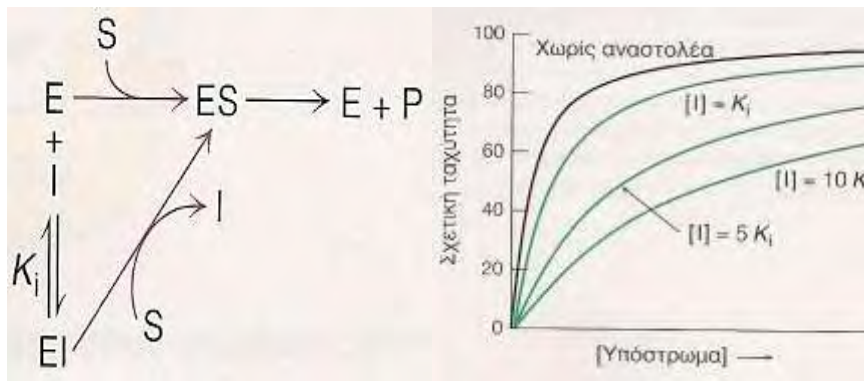
Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Αυτός ο τρόπος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας παίζει τον ρόλο του κύριου μηχανισμού ελέγχου στα βιολογικά συστήματα.

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 21**).



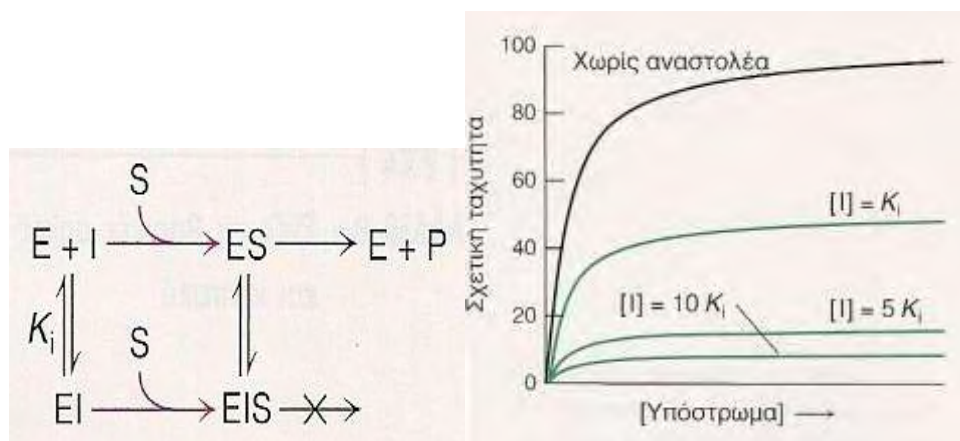
Εικόνα 21: Διάκριση μεταξύ ενός συναγωνιστικού και ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα. Α) Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος απουσία αναστολέα. Β) Συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το υπόστρωμα δεν συνδέεται. Γ) Μη συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται σε σημείο διαφορετικό με το ενεργό κέντρο. Το υπόστρωμα συνεχίζει να συνδέεται, αλλά το ένζυμο δεν καταλύει την αντίδραση λόγω της παρουσίας του αναστολέα.

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 22**). 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. [Stryer, 2007]



Εικόνα 22: Κινητική ενός συναγωνιστικού αναστολέα. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα, απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος για να επιτευχθεί μια ιδιαίτερη ενζυμική ταχύτητα. Η πορεία της αντίδρασης υποδηλώνει πόσο υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να υπερνικηθεί η συναγωνιστική αναστολή.

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 23**) Συνεπώς, η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. [Stryer, 2007]



Εικόνα 23: Κινητική ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα. Η πορεία της αντίδρασης δείχνει ότι ο αναστολέας προσδένεται και στο ελεύθερο ένζυμο και στο σύμπλοκο ενζυμου-

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 (Somsak *et al*, 2008).

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 [Oikonomakos, 2002].

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. [Oikonomakos *et al.*, 2008]

2.7 Επεξεργασία εκχυλίσματος παραπροϊόντων βιομηχανικής παραγωγής γυμού ροδιού και παραλαβή

Η διαδικασία της επεξεργασίας του δείγματος έγινε από την ερευνητική ομάδα του καθ. Σ. Χαρουτουνιάν στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Εν συντομίας η διαδικασία ήταν η εξής: πενήντα γραμμάρια αποξηραμένου δείγματος εκχυλίζεται σε ένα μίγμα 200 mL μεθανόλης (MeOH) / H₂O/1.0 N HCl (90:9.5:0.5 v / v) και επεξεργάστηκε στη συνέχεια για 10 λεπτά με υπερήχους (μπανάκι υπερήχων). Ο διαλύτης διαχωρίστηκε με διήθηση, και το υπόλοιπο στερεό επανα-εκχυλίστηκε τρεις φορές, χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη. Τα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν υπό κενό, το εναιώρημα διαλύθηκε σε 30 mL MeOH/H₂O (1:1) και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά (7000 rpm). Το υπερκείμενο εκχυλίστηκε με πετρελαϊκό αιθέρα (3X30 mL) με σκοπό την απομάκρυνση των λιπιδίων και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το διάλυμα που απέμεινε χύθηκε σε 30 ml άλμης και επανεκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc, 4X30 mL). Έτσι, όλα τα σάκχαρα παρέμειναν στην υδατική φάση. Στη συνέχεια, τα συνθετικά οργανικά στρώματα (οργανικές φάσεις) ξηράθηκαν πάνω από άνυδρο θειικό μαγνήσιο και εξατμίστηκαν υπό κενό [Apostolou Anna *et al.*, 2013]. Τέλος, το στερεό διαλύθηκε σε DMSO 100% (το κάθε 1mg διαλύθηκε σε 1000μl DMSO 100%) και στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH 6,8 (πεχαμετρικό χαρτί) με διάλυμα 0,1M NaOH. (Για να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των πολυφαινολών, όλες οι προαναφερθείσες διαδικασίες εκτελέστηκαν απουσία ηλιακού φωτός και σε θερμοκρασίες κάτω των 35 °C).

3 ΑΡΧΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

3.1 Γενικά

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X είναι το πρωταρχικό εργαλείο για τον προσδιορισμό των ατομικών θέσεων των μορίων. Η εφαρμογή της κρυσταλλογραφίας απαιτεί τη δημιουργία κρυστάλλου υψηλής ποιότητας του μοριακού συστήματος του οποίου η δομή μελετάται. Ένας υψηλής ποιότητας κρύσταλλος περιέχει μόρια διατεταγμένα κανονικά στη βάση ενός πλέγματος. Υπάρχουν 14 διαφορετικά είδη πλεγμάτων (Hammes G. G., 2005).

3.2 Κρυστάλλωση

Η κρυσταλλογραφική μελέτη ξεκινά με την διαδικασία της κρυστάλλωσης. Η κρυστάλλωση απαιτεί συγκεκριμένες συνθήκες, καθώς είναι εξαιρετικά ευαίσθητη τόσο στο pH, τη θερμοκρασία, τους διαλύτες και τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας. Η κρυστάλλωση είναι μια σχετικά αργή διαδικασία, που συνήθως απαιτεί αρκετές μέρες και στηρίζεται στην αρχή της βαθμιαίας αύξησης της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας σε κατάλληλο διαλύτη μέχρι ένα σημείο πέραν του κορεσμού. Η συγκέντρωση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους, όπως της βραδείας εξάτμισης, της βραδείας ψύξης ή διάχυσης. Οι πυρήνες κρυστάλλωσης που θα προκύψουν, ανάλογα με την συγκέντρωση και την θερμοκρασία του διαλύματος, θα πρέπει να έχουν ορισμένο μέγεθος για να προχωρήσει η διαδικασία της κρυστάλλωσης.

3.3 Ακτίνες X- Συνθήκη του Bragg

Η κρυσταλλογραφική μελέτη συνεχίζεται με τη διαδικασία της περίθλασης των ακτίνων-X από τον κρύσταλλο. Ο κρύσταλλος τοποθετείται σε έναν τριχοειδή σωλήνα ή σε θηλεία και παίρνει έναν συγκεκριμένο προσανατολισμό σε σχέση με τις ακτίνες-X και το φιλμ (Stryer L,1997). Η δέσμη ακτίνων-X, παράγεται από ηλεκτρόνια που επιταχύνονται προς ένα στόχο χαλκού. Οι ακτίνες-X είναι οι καταλληλότερες ακτίνες, καθώς το μήκος κύματός τους βρίσκεται στην περιοχή των Angstroms (0,1nm) και προσεγγίζει το μήκος των ενδομοριακών δεσμών (Hammes G. G.,2005). Όταν λεπτή δέσμη ακτίνων-X προσπίπτει στον κρύσταλλο, ένα μέρος της τον διαπερνά, ενώ η υπόλοιπη σκεδάζεται ή περιθλάται σε διάφορες κατευθύνσεις υπό συνθήκες. Η δέσμη που σκεδάζεται/περιθλάται μπορεί να ανιχνευθεί σε φιλμ

ακτίνων-X ή από ένα ηλεκτρονικό ανιχνευτή στερεάς κατάστασης, όπου η ένταση των κηλίδων είναι ανάλογη προς την ένταση των ακτίνων (Stryer L. 1997).

Ο W.L.Bragg έδειξε ότι η περίθλαση των ακτίνων-X από έναν κρύσταλλο μπορεί να περιγραφεί ως η σκέδαση από παράλληλα επίπεδα μορίων, που έχει ως αποτέλεσμα ένα πρότυπο (rat tern) περίθλασης ακτίνων-X που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες σειρές σημείων που λέγονται ανακλάσεις και αποτυπώνεται σε μια φωτογραφική ή σε μια ισοδύναμη ψηφιακή «πλάκα». Εάν η προσπίπτουσα ακτινοβολία σχηματίζει γωνία θ με ένα ατομικό επίπεδο, τότε θα σκεδαστεί επίσης με γωνία θ . Αυτή καλείται ελαστική σκέδαση και γίνεται η παραδοχή ότι η σκεδαζόμενη ακτινοβολία δεν χάνει ούτε απορροφά ενέργεια (Hammes G. G., 2005).

Για ένα επιλεγμένο κύμα η ακτινοβολία μπορεί να σκεδαστεί από καθένα από τα επίπεδα, με διαφορετική όμως φάση για την σκεδαζόμενη δέσμη, καθώς κάθε κύμα θα έχει διανύσει μια διαφορετική απόσταση ανάλογα με την μεταξύ των επιπέδων απόσταση d . Εάν η διαφορά στο μήκος της διαδρομής που έχει διανυθεί από τις σκεδαζόμενες από διαφορετικά επίπεδα ακτινοβολίες ($d' = 2d \cdot \sin\theta$) είναι ίση με το μήκος κύματος ή με ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος, τότε τα δύο κύματα θα βρίσκονται σε φάση και θα συμβεί μια συμβολή ενίσχυσης με αποτέλεσμα την ενίσχυση της έντασης της ακτινοβολίας που θα είναι μέγιστη. Αυτή είναι η συνθήκη του Bragg, δηλαδή

Η φωτογραφία ακτίνων-X είναι μια τομή δυο διαστάσεων μέσα από ένα τρισδιάστατο πλέγμα 25.000 σημείων. Οι εντάσεις είναι τα βασικά πειραματικά δεδομένα μιας κρυσταλλογραφικής ανάλυσης ακτίνων-X. από τις πειραματικώς παρατηρούμενες εντάσεις και τις υπολογισμένες φάσεις, λαμβάνουμε μέσω ενός μετασχηματισμού Fourier τη συνάρτηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην επαναλαμβανόμενη μοναδιαία κυψελίδα του κρυστάλλου. Το τελικό επομένως αποτέλεσμα ενός κρυσταλλογραφικού πειράματος, δεν είναι πραγματικά μια εικόνα των ατόμων, αλλά ένας χάρτης της κατανομής των ηλεκτρονίων στο χώρο, δηλαδή ένας χάρτης πυκνότητας ηλεκτρονίων. Εντούτοις, δεδομένου ότι τα ηλεκτρόνια είναι συνήθως στενά εντοπισμένα γύρω από τους πυρήνες, ο χάρτης πυκνότητας ηλεκτρονίων μας δίνει μια αρκετά καλή εικόνα του μορίου. Αυτό συμβαίνει επειδή η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλληλεπιδρά με το υλικό μέσω του μεταβαλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου της, το οποίο επιταχύνει φορτισμένα τα πρωτόνια των ατομικών πυρήνων, είναι αποδοτικότερα σε αυτή τη διαδικασία (Stryer L.1997).

3.4 Επεξεργασία με μετασχηματισμό Fourier

Για τις ακτίνες-X δεν υπάρχουν φακοί για την εστίασή τους. Η εικόνα σχηματίζεται από μια μαθηματική ανάλυση που ονομάζεται μετασχηματισμός Fourier. Αναλυτικότερα, η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από τη σκεδαστική ικανότητα των ξεχωριστών ατόμων (ατομικός παράγοντας f) και τη φάση των κυμάτων από κάθε πηγή σκέδασης. Ο παράγοντας δομής, F , για κάθε επίπεδο μπορεί να οριστεί ως το άθροισμα των ατομικών παραγόντων σκέδασης f_i , πολλαπλασιασμένων με έναν παράγοντα φάσης a_i , για το κάθε άτομο: $F = \sum f_i a_i$

Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας είναι ανάλογη με την τιμή του πλάτους του παράγοντα δομής. Ο παράγοντας δομής F_{hkl} , που αντιστοιχεί στο ανακλώμενο κύμα από το επίπεδο hkl (hkl : δείκτες Miller που προσδιορίζουν ένα επίπεδο του κρυσταλλικού πλέγματος), εκφράζεται με ένα μιγαδικό αριθμό πλάτους. $|F_{hkl}|$ και φάσης ϕ_{hkl} , δηλ. $F_{hkl} = |F_{hkl}| \exp(i \phi_{hkl})$ (τα ατομικά ζεύγη συντεταγμένων είναι γνωστά).

Η μετατροπή των παραγόντων δομής σε ατομικές συντεταγμένες γίνεται με χρήση του μετασχηματισμού Fourier, $\rho(r) = (1/V) \sum |F_{hkl}| \exp(-2\pi i \phi_{hkl})$ (1).

Υπολογίζεται έτσι, η συνάρτηση κατανομής της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $\rho(r)$ και οι ατομικές θέσεις αντιστοιχούν στα μέγιστα της $\rho(r)$. Τα πειράματα περίθλασης ακτίνων-X μπορούν να δώσουν πληροφορίες μόνο για την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας, που είναι ανάλογη του τετραγώνου του πλάτους του παράγοντα δομής, ενώ δεν μπορούν να δώσουν καμία πληροφορία για την φάση του παράγοντα δομής. Αυτό είναι ένα πρόβλημα που ονομάζεται «πρόβλημα των φάσεων» και είναι κεντρικό στον κρυσταλλογραφικό προσδιορισμό των δομών (Taylor W., 2003).

Για τη λύση του προβλήματος των φάσεων, δεν υπάρχει μια γενική λύση αλλά έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι, που βασίζονται αποκλειστικά στην πληροφορία της έντασης της περιθλώμενης ακτινοβολίας, και δεν απαιτούν προηγούμενη γνώση καμίας από τις ατομικές θέσεις (Hauptman H. A., 1991).

3.5 Προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής

Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής, εξαρτάται από την εύρεση των φάσεων των περιθλώμενων ακτίνων-X από τον μονοκρύσταλλο. Η επεξεργασία των δεδομένων, αρχικά απαιτεί τη διεκτοδότηση των ανακλάσεων που καταγράφηκαν

στις πολλαπλές καταγεγραμμένες εικόνες περίθλασης. Αυτό σημαίνει αρχικά αναγνώριση των διαστάσεων της μοναδιαίας κυψελίδας και αντιστοίχιση των κηλίδων των εικόνων περίθλασης, με θέσεις του αντίστροφου χώρου. Ένα προϊόν της διεκτοδότησης, είναι ο προσδιορισμός της συμμετρίας του κρυστάλλου, δηλαδή της ομάδας χώρου αυτού, μέσω των δεδομένων που συνενώνονται σε ένα ενιαίο σύνολο. Κηλίδες που εμφανίζονται σε δυο ή περισσότερες εικόνες πρέπει να συγχωνευτούν και τελικά να αναχθούν σε κοινή κλίμακα, έτσι ώστε να έχουν μια συνεχή κλίμακα έντασης. Η βελτιστοποίηση της κλίμακας εντάσεων είναι κρίσιμη, γιατί η σχετική ένταση των κηλίδων είναι η πληροφορία κλειδί από την οποία η δομή προσδιορίζεται.

4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού

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

✓ Υλικά

- 3 κουνέλια
- Απιονισμένο 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)-αμινομεθένιο, MB. 121.1
- Οξικό μαγνήσιο, MB. 214.46
- Θεϊκό αμμώνιο, MB. 132.14
- C₃H₈O₃ - Γλυκερόλη 100%
- Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης. Πριν από τη χρήση τους υφίστανται κατεργασία με 1% Na₂CO₃ και 10mM EDTA στους 100°C (30 min) και στη συνέχεια έκπλυση με απεσταγμένο ύδωρ 100°C (30 min).

✓ Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃),

- Διάλυμα οξικού οξέος 1N (CH₃COOH)
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% (NH₄)₂SO₄
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα οξικού μαγνησίου 1.0M ((CH₃COO)₂Mg)

✓ Όργανα

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

Διαδικασία

Βήμα 1^ο : Παραλαβή μυϊκού εκχυλίσματος

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

υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2^ο: Όξινη καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

Στη συνέχεια, ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH₃COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Παρατηρείται αύξηση της θολερότητας του εκχυλίσματος λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C με χρήση μεγάλης κεφαλής. Το υπερκείμενο συλλέγεται και διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Το διάλυμα ογκομετρείται και ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κεκορεσμένο KHCO₃.

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

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

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

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

ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου όπου προστίθεται διάλυμα CH_3COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 17000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20-25°C με μικρή κεφαλή και ογκομετρείται το υπερκείμενο.

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

Βήμα 5^ο: 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 σωλίνες φυγοκέντρησης και αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Ακολούθως, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ($\beta\text{-GP/Merc/EDTA}$, 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^ο: Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C σε ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 Η ενζυμική συγκέντρωση προσδιορίζεται με

φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και υπολογίζεται από τον τύπο:
 $C_{\text{ενζύμου}} = \text{OD}_{280} / 1,32.$

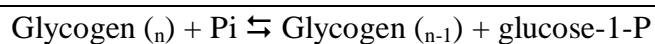
Τέλος, προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20 °C.

4.2 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

4.2.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου. Ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

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



Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η *αντίθετη αντίδραση*. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται φωσφορικά ιόντα (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-μερκαπτοαιθανόλης, 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 αραιώσεως 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 .

Στη συνέχεια, 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 %

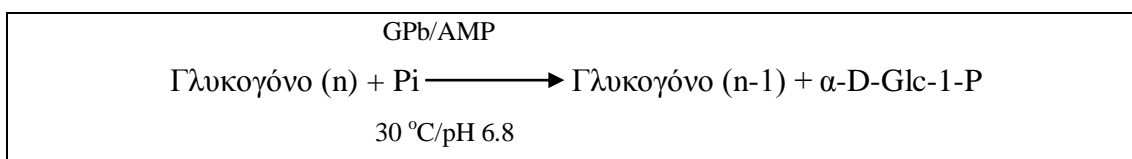
w/v γλυκογόνο, υποστρώματα α-D-Glc-1-P από 2 mM έως 20 mM , η θερμοκρασία είναι 30° C και το pH 6.8. Ανά τακτά και καθορισμένα χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού), λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το διάλυμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1%. Το SDS, είναι απορρυπαντικό και προκαλεί την αποδιάταξη και την αδρανοποίηση του ενζύμου.

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

4.2.2. Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

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 ακόλουθη 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 καταλύομενη αντίδραση σε συνθήκες κορεσμού σε AMP 1.0 mM και γλυκογόνο 0.2% w/v, ακολουθεί μία κινητική κατά Michaelis-Menten, σύμφωνα με την οποία η καμπύλη της ταχύτητας ως προς το υπόστρωμα, την 1-φωσφορική γλυκόζη, αποτελεί τμήμα υπερβολής. Σε μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση του υποστρώματος όσο και την ποσότητα του ενζύμου. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, όπου επέρχεται

κορεσμός, η ταχύτητα εξαρτάται αποκλειστικά από την ποσότητα του ενζύμου στο μίγμα της αντίδρασης.

Διαδικασία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 1% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων 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).

4.2.3. Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέα

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Η σταθερά IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση Glc-1-P (1-φωσφορικής γλυκόζης). Συνήθως οι ποσότητες των προς εξέταση ουσιών δεν είναι μεγάλες και αυτό περιορίζει την δυνατότητα για μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να καλύψουν

την πιθανότητα για την εξαγωγή τόσο των κινητικών παραμέτρων για την ανίχνευση της επίδρασης του αναστολέα στο ένζυμο, όσο και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Σκοπός του ερευνητή είναι να μπορέσει να προσεγγίσει όσο το δυνατό καλύτερα τη συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία παρατηρείται μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50%.

✓ Υλικά

- Απιονισμένο ύδωρ
- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης (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

✓ Όργανα

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

Διαδικασία:

4.3 Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b

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

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

Το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, για επώαση, 15 λεπτά.

4.4 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης

Παρασκευάζονται 2 ρυθμιστικά διαλύματα:

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

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

Φυλάσσονται στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

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

Συνολικά προκύπτουν τα παρακάτω διαλύματα:

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

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

Διαδικασία

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

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
$\alpha\text{-D-Glc-1-P}$	200 μL	200 μL
AMP (50mM)	18 μL	18 μL
Αναστολέας	-	X μL
H_2O	502 μL	720-(200+18+X) μL
Τελικός όγκος	720 μL	720 μL

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

Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος καθώς και των διαλυμάτων του υποστρώματος, μεταφέρονται 180 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 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. Στη συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις αναστολέα. Στα δείγματα που έχουν ληφθεί, προστίθενται από 2.5 mL διάλυμα ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά στους 30 °C και μετά ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των φωσφορικών ιόντων (Pi), που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση.

Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου και σε τυφλά, όπως $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ (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 έγιναν για την ένωση που περιλαμβάνεται στην παρούσα εργασία:

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

Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν:

- 0,005 mg/mL
- 0,006 mg/mL
- 0,009 mg/mL
- 0,011 mg/mL
- 0,015 mg/mL
- 0,025 mg/mL

4.5 Παρασκευή τυφλών

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

- Τυφλό νερού για την ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α -D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται στην IC_{50} 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 $\mu\text{mol Pi}$.

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

4.6 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 Pi πρέπει να είναι μεταξύ 0,05-0,4 μM , προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

✓ Υλικά

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

Στη συνέχεια αναμιγνύουμε τα διαλύματα με αναλογία όγκων 4:1 (4 όγκους 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.

4.7 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 1 μmol 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 δραστηρότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηρότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηρότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

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

όπου: $s.a._{\text{control}}$: η ειδική δραστηρότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

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

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

4.8 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων της Gpb

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

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

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T state) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο batch. Η μέθοδος αυτή αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση

υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων GPb (T state), η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου P43212) εντός γυάλινων σωλήνων.

✓ Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM BES/NaOH (σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-Αμινοαιθανίου), pH 6.7, 1mM EDTA 2% w/v 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 X. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι: $I = I_0 * e^{-\mu t}$

4.9 Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου- αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη

ΥΛΙΚΑ:

Διάλυμα αναστολέα

Κρύσταλλοι GPb

Ρυθμιστικό διάλυμα BES (10mM BES, 1mM EDTA 2% NaN₃, 2 mM DTT pH 6.7)

Τριχοειδείς σωλήνες (διαμέτρου 1.0, 2.0 mm)

Κερί

Σύριγγες

ΟΡΓΑΝΑ:

Στερεοσκόπιο

Πιπέτες Pasteur

Η κρυσταλλογραφική μελέτη των εν δυνάμει αναστολέων έχει σαν σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου δράσης των ενώσεων που υπέδειξαν τα κινητικά πειράματα.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου ένζυμο-αναστολέας πραγματοποιείται είτε με τη μέθοδο της συγκρυστάλλωσης είτε με τη μέθοδο του εμποτισμού προσχηματισμένων κρυστάλλων του ενζύμου με διάλυμα αναστολέα, όπου η ουσία διαχέεται εντός των καναλιών του κρυστάλλου και συνδέεται στην πρωτεΐνη, στο κέντρο σύνδεσης για το οποίο παρουσιάζει συγγένεια. Στην περίπτωση όπου το σύμπλοκο σχηματίζεται με τη μέθοδο του εμποτισμού ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες θα γίνει η συλλογή δεδομένων (κρυογενείς συνθήκες ή σε θερμοκρασία δωματίου) ακολουθείται διαφορετική διαδικασία. Οι κρύσταλλοι αρχικά μεταφέρονται σε διάλυμα BES εντός τριβλίου Petri. Στη συνέχεια, επιλέγονται μεμονωμένοι κρύσταλλοι οι οποίοι δεν φέρουν ορατές προσμίξεις ή άλλες εναποθέσεις μικροκρυστάλλων στην επιφάνειά

τους οι οποίοι θα χρησιμοποιηθούν για τη συλλογή δεδομένων.

Στην περίπτωση συλλογής σε θερμοκρασία δωματίου οι κρύσταλλοι μεταφέρονται με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur μέσα σε μικρούς τριχοειδείς σωλήνες και το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο τον περιβάλλει απομακρύνεται με χρήση μικρών λωρίδων απορροφητικού χαρτιού για να αντικατασταθεί από το διάλυμα του αναστολέα που θα μελετηθεί. Το διάλυμα του αναστολέα προστίθεται στον σωλήνα και αφήνεται για ικανό χρονικό διάστημα ώστε να εμποτίσει τον κρύσταλλο (π.χ. ~2-3 hrs). Στη συνέχεια το διάλυμα απομακρύνεται από το σωλήνα και στα δύο του άκρα τοποθετείται μικρή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος BES (για την αποφυγή αφυδάτωσης του κρυστάλλου). Τέλος ο τριχοειδής σωλήνας σφραγίζεται και στα δύο του άκρα με τη χρήση μικρής ποσότητας κεριού και τοποθετείται στο γωνιόμετρο για την έκθεση του στη δέσμη ακτίνων X.

4.10 Έκθεση πρωτεϊνικού μονοκρυστάλλου σε ακτίνες X

Η έκθεση μονοκρυστάλλου πρωτεΐνης σε ακτίνες-X έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων των ατόμων, που αποτελούν την πρωτεΐνη, με την ακτινοβολία και την ελευθέρωση δευτερογενούς ακτινοβολίας. Η ένταση της περιθλώμενης αυτής ακτινοβολίας μπορεί να μετρηθεί με ειδικούς ανιχνευτές και να γίνει συλλογή περιθλασιγραμμάτων. Τα περιθλασιγράμματα αυτά αποτελούν τα πειραματικά δεδομένα, από τα οποία, μετά από κατάλληλη επεξεργασία και συγχώνευσή αυτών με ειδικό λογισμικό για κρυσταλλογραφικές μελέτες, υπολογίζεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου.

Υλικά:

Μονοκρύσταλλος

Όργανα:

Πηγή ακτίνων-X

Ανιχνευτής πεδιάς

Γωνιόμετρο

Πορεία:

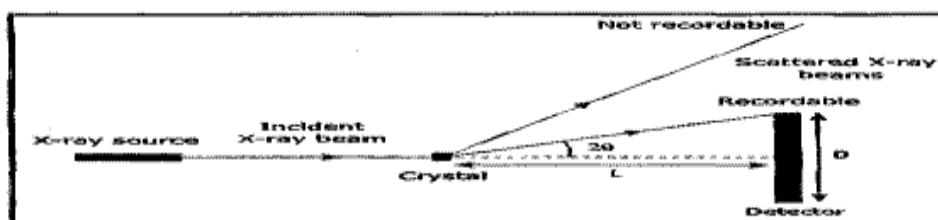
Ο κρύσταλλος που βρίσκεται στον τριχοειδή σωλήνα τοποθετείται στο γωνιόμετρο και στη συνέχεια το όλο σύστημα τοποθετείται στην κατάλληλη υποδοχή ανάμεσα

στον ανιχνευτή και την έξοδο της ακτινοβολίας. Ο κρύσταλλος ευθυγραμμίζεται ως προς την διεύθυνση της δέσμης της ακτινοβολίας με ρυθμίσεις του γωνιομέτρου.



Εικόνα 24. Τριχοειδής σωλήνας τοποθετημένος στο γωνιόμετρο.

Με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού καταχωρούνται όλα τα χαρακτηριστικά του πειράματος: μήκος κύματος ακτινοβολίας (λ), απόσταση ανιχνευτή-κρυστάλλου (d), χρόνος έκθεσης (t), γωνία περιστροφής και αριθμός εικόνων. Ο καθορισμός της απόστασης κρυστάλλου-ανιχνευτή γίνεται σύμφωνα με το νόμο του Bragg και δεδομένων της διαμέτρου του ανιχνευτή, του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της επιθυμητής μέγιστης ευκρίνειας. Στην εικόνα 32 παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της διάταξης του πειράματος περίθλασης ακτίνων X.



Εικόνα 25. Γεωμετρικά χαρακτηριστικά πειραματικής διάταξης περίθλασης ακτίνων-X: Η πηγή ακτίνων X εκπέμπει ακτινοβολία η οποία και προσπίπτει στον κρύσταλλο. Σύμφωνα με το νόμο του Bragg, η ακτινοβολία περιθλάται υπό γωνία 2θ και μετράται από ανιχνευτή που βρίσκεται σε απόσταση L από το κρύσταλλο. Σύμφωνα με τη διάταξη γίνεται καταγραφή μόνο των ανακλάσεων που πληρούν τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά του τριγώνου: κρύσταλλος-κέντρο ανιχνευτή-άκρο ανιχνευτή. Από τον νόμο του Bragg καθορίζεται η γωνία θ (2θ αποτελεί η γωνία μεταξύ του επιπέδου διάδοσης της ακτίνας και της ανακλώμενης ακτίνας), από τη διάταξη η απόσταση L , έτσι ώστε να έχουμε την επιθυμητή ευκρίνεια [Rhodes, 1993].

Στη συνέχεια ακολουθεί η έκθεση του κρυστάλλου και η λήψη των περιθλασιγραμμάτων. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο Max-Lab του Lund University στην Σουηδία. Ταυτόχρονα γίνεται και η αρχική επεξεργασία τους με το πρόγραμμα HKL, όπου η κάθε εικόνα επεξεργάζεται ξεχωριστά (ταξινόμηση κηλίδων) και στη συνέχεια οι εικόνες συγχωνεύονται. Η συγχώνευση μας δίνει την πληρότητα αλλά και τη ποιότητα των δεδομένων.

4.11 Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων αποτελεί κυρίως τον υπολογισμό των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, 2Fo-Fc, Fo-Fc (Fo: ηλεκτρονιακή πυκνότητα που προκύπτει από πειραματικούς δομικούς παράγοντες, Fc: ηλεκτρονιακή πυκνότητα που προκύπτει από θεωρητικούς δομικούς παράγοντες του μοντέλου), την βελτιστοποίηση του αρχικού μοντέλου της δομής της πρωτεΐνης με κύκλους βελτιστοποίησης (ακολουθώντας το πρωτόκολλο που υπαγορεύεται από το REFMAC)

4.12 Κρυσταλλογραφική μελέτη του εκχυλίσματος 11 (ποικιλίας Wonderful)

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφική μελέτη της σύνδεσης στη φωσφορυλάση b του πολυφαινολικού εκχυλίσματος 7 από παραπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής χυμού από το φυτό ροδιά (*Punica Granatum*) της ποικιλίας Wonderful. Τα επί μέρους στάδια της μελέτης είναι τα εξής:

Εμποτισμός μονοκρυστάλλου GPb (διαμόρφωση T) με διάλυμα του αναστολέα και συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων X

Κρύσταλλος φωσφορυλάσης γλυκογόνου b, που είχε αναπτυχθεί με τη μέθοδο batch εμβαπτίστηκε σε διάλυμα αναστολέα που είχε αραιωθεί σε τελική συγκέντρωση 10mg/ml, 15% DMSO με 10 mM BES pH 6.7 και έπειτα επώαστηκε για 18h. Ακολούθησε η τοποθέτηση του κρυστάλλου στη διάταξη του με τέτοιο τρόπο ώστε κατά την περιστροφή του να παραμένει στη δέσμη της ακτινοβολίας.

Βελτιστοποίηση του μοντέλου

Η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο τη δομή της T διαμόρφωσης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου όπως παρουσιάζεται στο σύμπλοκο του ενζύμου με την α-D-γλυκόζη με τη βοήθεια του προγράμματος REFMAC (CCP4, 1994). Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται είναι οι ατομικές συντεταγμένες, οι συντελεστές θερμοκρασίας και οι συντελεστές κατάληψης (occupancies). Οι στερεοχημικοί περιορισμοί που λαμβάνονται υπόψη για την ελαχιστοποίηση της τιμής της ελεύθερης ενέργειας αυξάνουν το λόγο των παρατηρήσεων προς τον αριθμό των παραμέτρων. Τα επιπρόσθετα αυτά δεδομένα προέρχονται από τη γνώση της στερεοχημείας των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα τα μήκη και οι γωνίες των δεσμών μεταξύ των ατόμων, πληροφορίες που είναι γνωστές από τις ακριβείς δομές των αμινοξέων.

Ένα μέρος των δεδομένων περιθλάσης (5-10%) επιλέγεται τυχαία πριν από τη διαδικασία βελτιστοποίησης με σκοπό να υπολογιστεί ο αρχικός δείκτης αξιοπιστίας R , ο οποίος στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί ως ανεξάρτητο κριτήριο της προόδου της βελτιστοποίησης [Brunger, 1992].

Στατιστικά στοιχεία συλλογής κρυσταλλογραφικών δεδομένων του συμπλόκου GPb-Εκχυλίσματος ροδιού

Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης διαποτίζονται με διάλυμα 10mg/ml του εκχυλίσματος στο διάλυμα ανάπτυξης των κρυστάλλων με 15% v/v DMSO για 25h
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας MAX-Lab, Lund, Σουηδία	ID911-2
Μήκος κύματος, λ (Å)	1.0402
Εύρος ταλάντωσης ($^{\circ}$)	0.8
Αριθμός περιθλασιγραμμάτων	67
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4₃2₁2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας a, b, c (Å)	128.9, 128.9, 116.6
Αριθμός μορίων/Ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	1.95
Αριθμός περιθλάσεων	320994
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (Εξώτ. στοιβάδα)	69839 (9984)
R_{merge} (Εξωτερική στοιβάδα)*	0.069 (0.473)
Πληρότητα (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	97.7 (96.9)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.06-1.95
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ (Εξωτερική στοιβάδα)**	13.6 (3.5)
Πολλαπλότητα (Εξωτερική στοιβάδα)	4.6 (4.6)
Τιμή συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Wilson plot)	28.9

Πίνακας 1

*Ο συντελεστής R_{merge} ορίζεται ως $R_m = \sum_i \sum_h |(I_h) - I_{ih}| / \sum_i \sum_h I_{ih}$, όπου (I_h) και I_{ih} είναι η μέση και η i -οστή μέτρηση της έντασης για την περιθλαση h , αντίστοιχα R_{iso} είναι η μέση κλασματική ισόμορφος διαφορά των ευρών των δομικών παραγόντων από τη φυσική GPb, T διαμόρφωσης.

**σ(I) είναι η τυπική απόκλιση του I.

Ακολούθησαν πολλαπλοί κύκλοι διόρθωσης του μοντέλου με το πρόγραμμα COOT [Paul Emsley & Kevin Cowtan, 2004] και βελτιστοποίησης με το REFMAC. Τα μόρια του ύδατος προστέθηκαν στο μοντέλο εφόσον είχαν αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη ή με άλλα μόρια ύδατος, και εντοπιζόνταν στον ηλεκτρονικό χάρτη 2Fo-Fc. Τα μόρια των αναστολέων συμπεριλήφθηκαν επίσης στα τελικά στάδια της διαδικασίας της βελτιστοποίησης (refinement) και τα αρχικά τους μοντέλα προήλθαν από την βιβλιοθήκη του COOT. Τέλος, η βελτιστοποίηση των ισοτροπικών παραγόντων θερμοκρασίας των ατόμων βελτίωσε αισθητά το τελικό μοντέλο.

Υπολογισμός του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας διαφοράς Fo-Fc και 2Fo-Fc, στο πρώτο στάδιο της βελτιστοποίησης έδειξε πρόσθετη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Ακολούθησε διαδοχική βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε (συμπεριλαμβανομένου και του αναστολέα) στους νέους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, διέδρες γωνίες, κ.ά.) με το πακέτο προγραμμάτων CCP4. Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση ατομικών συντεταγμένων (positional refinement) και ακολούθησε βελτιστοποίηση του ατομικού ισοτροπικού συντελεστή θερμοκρασίας B (B factor). Μόρια ύδατος προστέθηκαν στη δομή στα τελευταία στάδια της βελτιστοποίησης λαμβάνοντας υπόψη τους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας Fo-Fc και 2Fo-Fc. Το τελικό μοντέλο περιείχε τα αμινοξέα 12-836, 86 μόρια νερού, τον αναστολέα και την φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Οι δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Παρουσίαση στατιστικών χαρακτηριστικών του τελικού μοντέλου GPb-εκχυλίσματος ροδιού

Βελτιστοποίηση (Ευκρίνεια) (Å)

23.9 – 1.95

Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (3542) (παραλείπονται) κατά την βελτιστοποίηση

66278

Αμινοξέα που περιελήφθησαν

12-254, 262-314, 324-836

Αριθμός πρωτεϊνικών ατόμων	6561
Αριθμός μορίων ύδατος	235
Αριθμός ατόμων υποκαταστατών	46
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας $R (R_{\text{free}})^*$ (%)	16.5 (19.7)
$R (R_{\text{free}})$ (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	23.0 (25.6)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) του μήκους δεσμών (Å)	0.008
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) της γωνίας των δεσμών (°)	1.3
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Πρωτεϊνικά άτομα)	
Όλα τα άτομα	31.3
Ca, C, N, O	28.7
Πλευρική αλυσίδα	33.7
Μόρια ύδατος	33.6
Γαλλικό οξύ	34.4
Προτοκατεχικό οξύ	34.7

Πίνακας 2

* Ο δείκτης αξιοπιστίας R ορίζεται ως $R = \frac{\sum (|F_o| - |F_c|)}{\sum F_o}$, όπου F_o και F_c είναι τα παρατηρούμενα και τα υπολογιζόμενα εύρη των δομικών παραγόντων, αντίστοιχα.

Ποσοστό 5% επί του συνόλου των περιθλάσεων που χρησιμοποιείται κατά τη βελτιστοποίηση. Χρησιμεύει για την πιστοποίηση της ορθής εξέλιξης της βελτιστοποίησης.

Η δομή του συμπλόκου GPb – εκχυλίσματος ροδιού χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των εν δυνάμει δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων van der Waals που μπορεί να σχηματίζει ο αναστολέας με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο προγραμμάτων CCP4 με όριο απόστασης 3.3 Å για τους δεσμούς υδρογόνου και 4.0 Å για τις αλληλεπιδράσεις van der Waals. Τέλος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα γραφικών Rymol για την μοριακή απεικόνιση τρισδιάστατων μακρομοριακών μορίων.

5.ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η αύξηση αριθμού των ασθενών που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2 έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με στόχο το σχεδιασμό νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών σκευασμάτων. Τα σκευάσματα αυτά έχουν στόχο ένζυμα και υποδοχείς που συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και αποσκοπούν σε μία πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 [Kurukulasuriya et al, 2003].

Το ήπαρ είναι ένα όργανο που έχει ως σκοπό να αποκαθιστά της ενεργειακές ανάγκες των άλλων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP, Liver GP), ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, αποτελεί έναν από τους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η αναστολή του ενζύμου αυτού έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου και τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών. Η φωσφορυλάση και η γλυκοκινάση αποτελούν δύο ένζυμα που φαίνεται να έχουν κατά κύριο λόγο τον έλεγχο της ρύθμισης της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τα ηπατικά κύτταρα [Agius et al., 2001].

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης \leftrightarrow σύνθεσης γλυκογόνου στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Ο σχεδιασμός με βάση τη μακρομοριακή δομή, η σύνθεση, η βιοχημική και βιολογική μελέτη της ουσίας αποτελεί σήμερα μία πορεία εργασιών με στόχο την ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και μεγάλη συγγένεια για την πρωτεΐνη-στόχο.

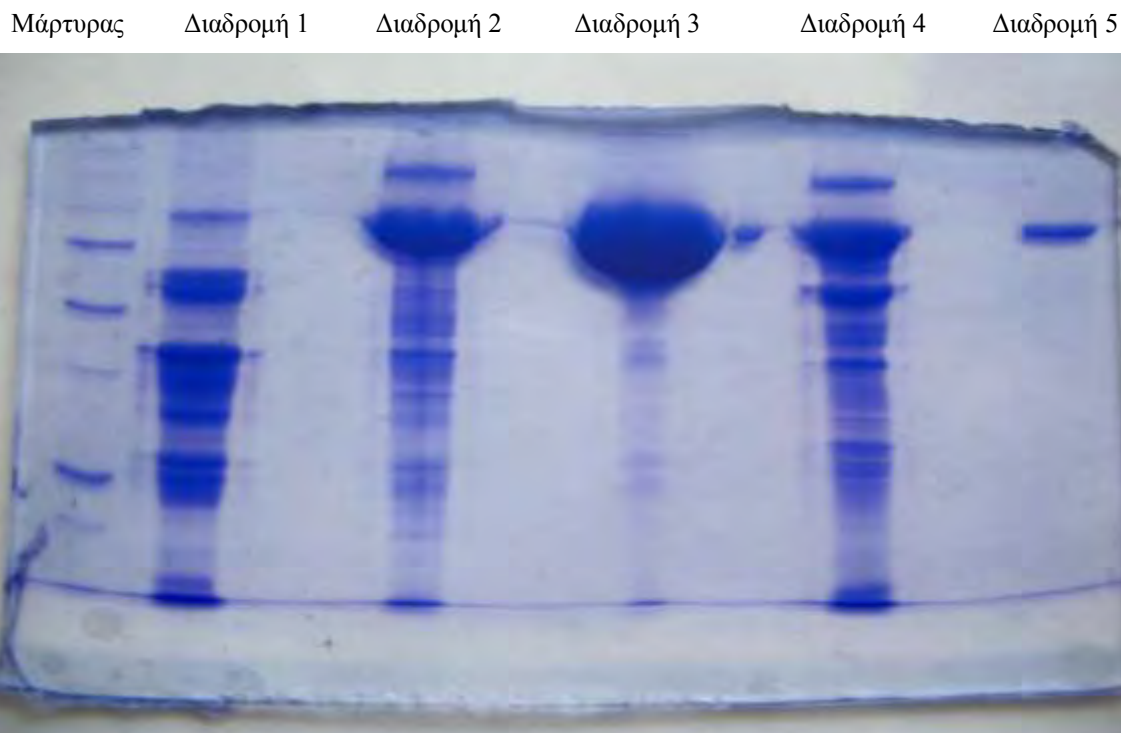
Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά η κινητική μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού για τον προσδιορισμό της IC_{50} έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου και στη συνέχεια προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά η δομή του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα (εκχυλίσματος ροδιού) προκειμένου να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής του ενζύμου

Παρόλο που ο πρωταρχικός στόχος είναι η ηπατική GP, το κρυσταλλογραφικό πρότυπο στο οποίο στηρίζεται ο σχεδιασμός ενώσεων στην παρούσα διατριβή είναι η μυϊκή GP. Η ηπατική GP είναι 80 % ομόλογη (ως προς την αμινοξική ακολουθία) με την μυϊκή GP, όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων είναι 100% στην περιοχή του ενεργού κέντρου.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

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



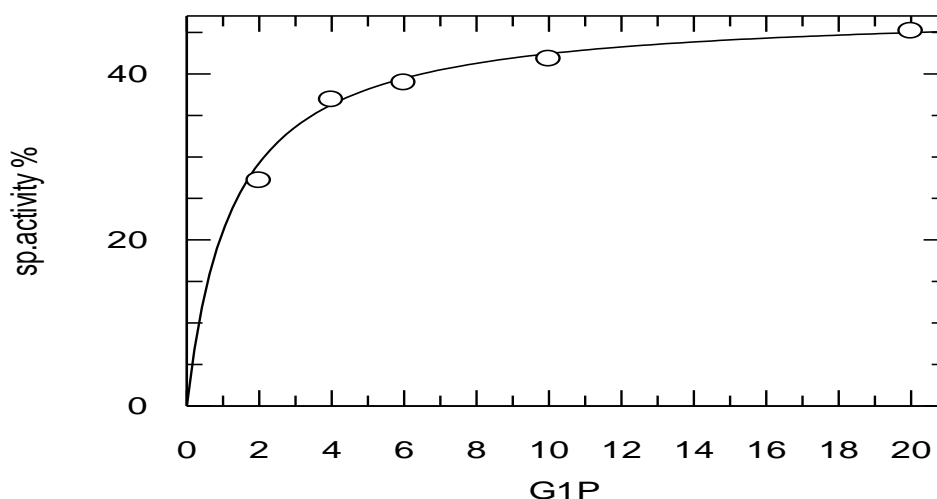
Εικόνα 26. Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH . Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

6.2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

6.2.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-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 .

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=1.27 \pm 0.12$ mM και $V_{max}=47,83 \pm 0,64$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Στην εικόνα παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, μmol φωσφορικών / min/mg ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G-1-P).



Εικόνα 27. Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

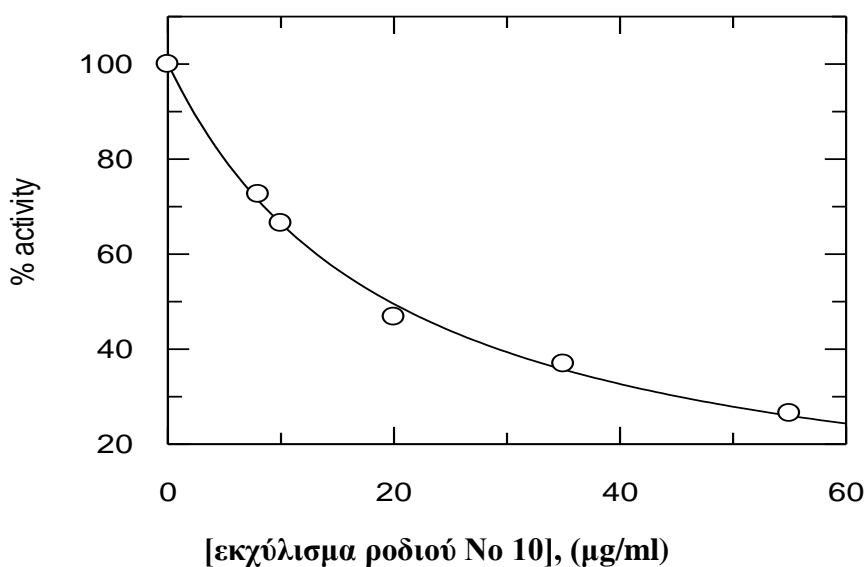
6.2.2 Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού.

Για το σκοπό της εργασίας, μετά την απομόνωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου μελετήθηκαν πολυφαινολικά εκχυλίσματα παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και οι γραφικές

παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Graffit (Πίνακας 3) [Leatherberrow,1997].

Όνομα	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν	IC ₅₀ (μg/mL)
Εκχύλισμα χυμοποίησης ροδιού No 10	8μM, 10μM, 20μM, 35μM, 50μM	19,59 ± 0,64
Εκχύλισμα χυμοποίησης ροδιού No 11	2μM, 5μM, 8μM, 10μM, 15 μM	7,92 ± 0,14

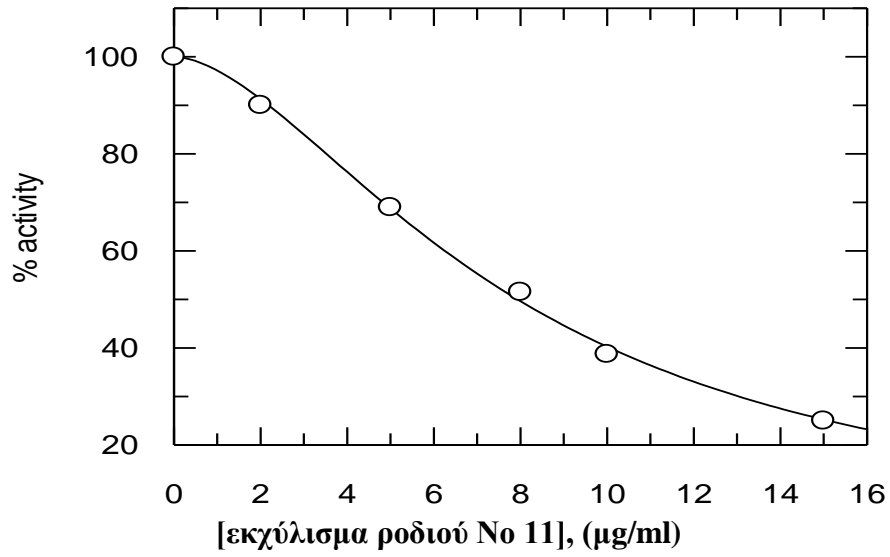
• Εκχύλισμα χυμοποίησης ροδιού No 10



Εικόνα 28. Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της IC₅₀.

Parameter	Value	Std. Error
IC 50	19,59	0,64

- Εκχύλισμα χυμοποίησης ροδιού No 11



Εικόνα 29. Καμπύλη της δραστηρότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της IC_{50} .

Parameter	Value	Std. Error
IC 50	7,92	0,14

6.3. Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικής μελέτης

Η κρυσταλλογραφική μελέτη αποτέλεσε το επόμενο στάδιο της έρευνάς μας και είχε ως στόχο την ταυτοποίηση της βιοδραστικής ένωσης των εκχυλισμάτων, για την ερμηνεία των κινητικών αποτελεσμάτων. Η σύσταση των εκχυλισμάτων σε πολυφαινολικές ενώσεις παρουσιάζεται στον Πίνακα 4 για το εκχύλισμα παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού.

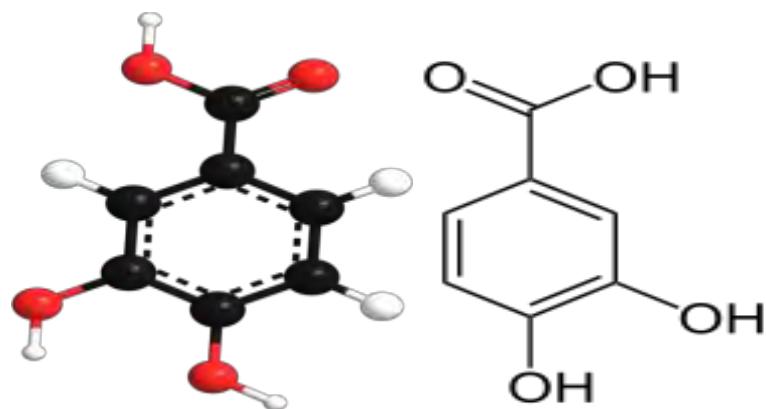
Μονομερείς Πολυφαινόλες	Συγκέντρωση Μονομερών Πολυφαινολίων (mg/g ξηρού βάρους εκχυλίσματος)								
	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 5	Δείγμα 6	Δείγμα 7	Δείγμα 8	Δείγμα 9
Π-κουμαρικό οξύ - Ελλαγικό οξύ	98,37	298,98	167,74	253,08	238,52	434,90	189,82	269,04	494,12
Χλωρογενικό οξύ	48,99	49,25	48,76	47,69	48,43	48,11	47,73	47,86	47,67
Κατεχίνη	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΕ								
Κερκετίνη	33,61	37,25	35,76	34,42	40,53	36,91	34,24	35,58	34,67
Επικατεχίνη	65,41	38,21	36,38	47,99	58,42	66,65	58,24	40,74	42,96
Trans-ρεσβερατρόλη	44,94	44,99	44,76	44,77	44,79	45,47	44,94	45,15	45,77
Φλοριζίν (phloridzin)	36,94	40,78	33,59	32,98	33,84	34,19	33,30	32,58	33,32
Προτοκατεχικό οξύ	75,84	62,18	52,40	66,05	47,28	48,65	40,42	64,29	44,04
Γαλλικό οξύ	181,76	149,47	150,02	143,76	135,47	148,80	134,52	136,96	138,79
Καφεϊκό οξύ	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΕ								
Φερούλικό οξύ	45,96	46,93	45,89	45,84	48,63	46,15	45,91	45,61	46,20
Ρουτίνη	93,78	101,76	117,54	91,33	124,29	97,016	93,12	88,92	95,05

Πίνακας 4: Σύσταση σε πολυφαινολικές ενώσεις για τα εκχυλίσματα παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού.

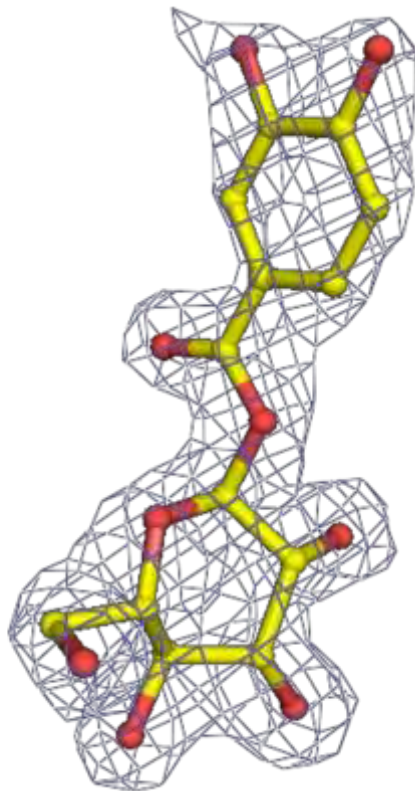
Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε την κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (διαμόρφωση T), τον εμποτισμό κρυστάλλου με διάλυμα της υπό μελέτη ουσίας (εκχυλίσματος χυμοποίησης ροδιού), τη συλλογή και την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Στη συνέχεια η δομή της GPb χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό μοντέλο το οποίο υποβλήθηκε σε βελτιστοποίηση έναντι των πειραματικών δεδομένων για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του νέου συμπλόκου. Η ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων απεκάλυψε πως υπήρχαν μικρά μόρια συνδεδεμένα στο καταλυτικό κέντρο και στο κέντρο αναστολής του ενζύμου.

Μελέτες μοντελοποίησης απεκάλυψαν πως η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο καταλυτικό κέντρο αντιστοιχεί σε ένα μόριο προτοκατεχικού οξέος, (Εικόνα 30), ενώ η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο κέντρο αναστολής σε δυο μόρια γαλλικού οξέος (Εικόνα 31). Στη συνέχεια αναλύθηκαν οι μοριακές αλληλεπιδράσεις των μορίων με την πρωτεΐνη.

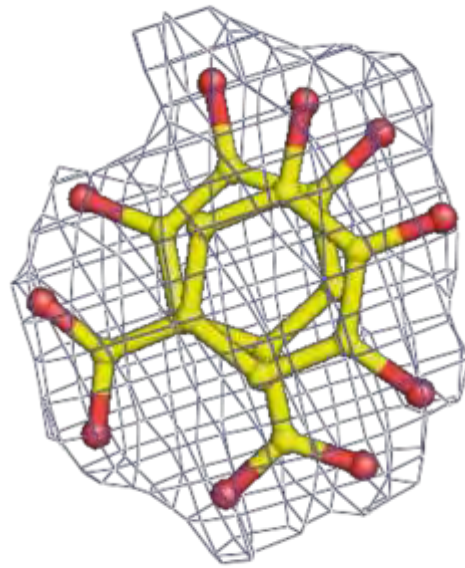
A)



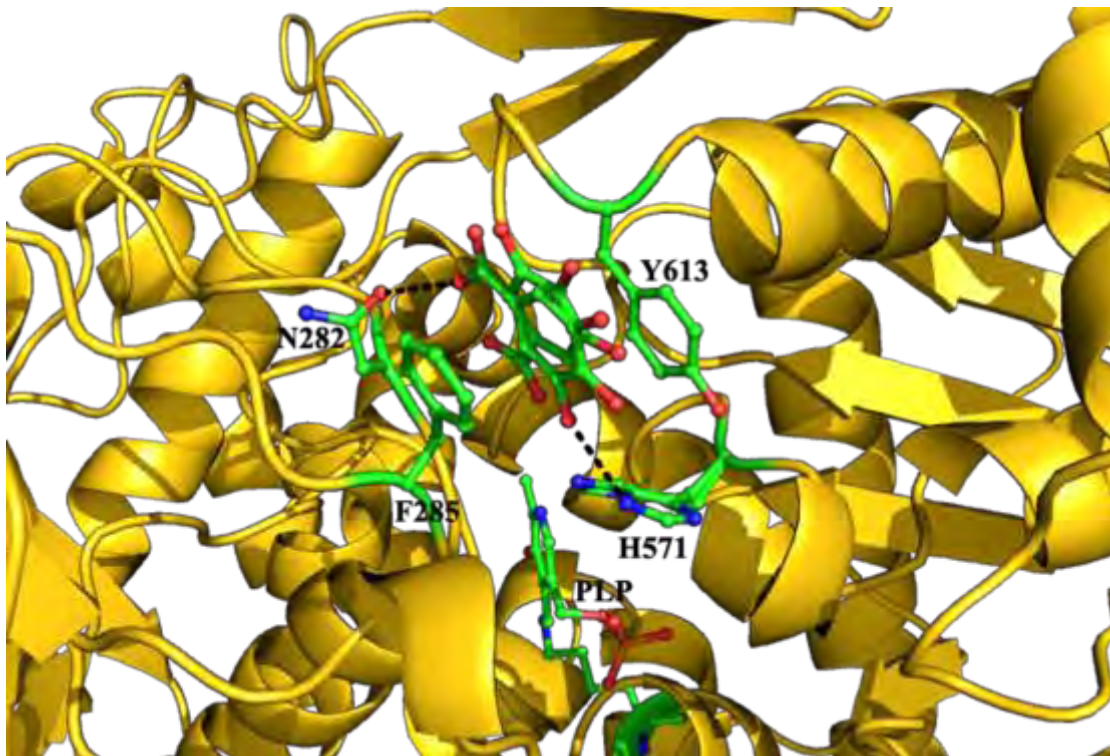
B)



Εικόνα 30: A) Χημική δομή του προτοκατεχικού οξέος B) Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας του μορίου του εστέρα προτοκατεχικού οξέος στο καταλυτικό κέντρο.



Εικόνα 31: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας των μορίων γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής.



Εικόνα 32: Σύνδεση γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής. Με διακεκομμένες γραμμές αναπαριστάται οι δεσμοί υδρογόνου, ενώ επίσης εμφανίζονται και οι πλευρικές αλυσίδες

των Phe285 και Tyr613 με τις οποίες τα άτομα του γαλλικού συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις van der Waals.

Άτομο γαλλικού οξέος	Άτομο πρωτεΐνης
OAA	Asn282 (OD1)
OAD	His571 (NE2)
OAE	W203

Πίνακας 5: Δεσμοί υδρογόνου του γαλλικού οξέος με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb στο κέντρο αναστολής.

Άτομα πρωτεΐνης	Άτομα γαλλικού οξέος
CE1 613 (TYR)	OAE A
C2 613 (TYR)	OAE A
CD1 613 (TYR)	CAL A
CE1 613 (TYR)	CAL A
CD1 285 (PHE)	CAL A
CE1 285 (PHE)	CAL A CAL B
C2 285 (PHE)	CAL B
CD1 613 (TYR)	CAI A
CE1 285 (PHE)	CAI A
C2 285 (PHE)	CAI A
CA 613 (TYR)	CAI B
C2 285 (PHE)	CAI B
CE2 285 (PHE)	CAI B
C 612 (GLY)	OAC B
CE1 285 (PHE)	CAF A
C2 285 (PHE)	CAF A
CE2 285 (PHE)	CAF A
CA 613 (TYR)	CAF B
CB 613 (TYR)	CAF B
CG 285 (PHE)	CAF B
C2 285 (PHE)	CAF B
CE2 285 (PHE)	CAF B

CD2 285 (PHE)	CAF B
CB 613 (TYR)	CAK A
CG 285 (PHE)	CAK A
CD1 285 (PHE)	CAK A
CE1 285 (PHE)	CAK A
C2 285 (PHE)	CAK A
CE2 285 (PHE)	CAK A
CD2 285 (PHE)	CAK A
CG 613 (TYR)	CAK B
CD1 613 (TYR)	CAK B
CD2 613 (TYR)	CAK B
CB 613 (TYR)	CAK B
CB 285 (PHE)	CAK B
CG 285 (PHE)	CAK B
CD1 285 (PHE)	CAK B
CD2 285 (PHE)	CAK B
CE2 285 (PHE)	CAH A
CD2 285 (PHE)	CAH A
CG 613 (TYR)	CAH B
CD2 613 (TYR)	CAH B
CB 613 (TYR)	CAH B
CB 285 (PHE)	CAH B
CG 285 (PHE)	CAH B
CD2 285 (PHE)	CAH B
C 612 (GLY)	OAB A
CE2 285 (PHE)	OAB A
CB 610 (ALA)	OAB B
CB 285 (PHE)	OAB B
CG 285 (PHE)	OAB B
CD2 285 (PHE)	OAB B
CB 610 (ALA)	OAA A
CG 285 (ASN)	OAA A
CE2 285 (PHE)	OAA A
CD2 285 (PHE)	OAA A
CD2 571 (HIS)	OAA B
CE2 613 (TYR)	OAA B
CD2 613 (TYR)	OAA B
CB 285 (PHE)	OAA B
CG 285 (PHE)	OAA B
CG 613 (TYR)	CAG A
CD2 613 (TYR)	CAG A
CB 613 (TYR)	CAG A
CB 285 (PHE)	CAG A
CG 285 (PHE)	CAG A
CD1 285 (PHE)	CAG A
CE1 285 (PHE)	CAG A
CD2 285 (PHE)	CAG A

CG 613 (TYR)	CAG B
CD1 613 (TYR)	CAG B
CE1 613 (TYR)	CAG B
C2 613 (TYR)	CAG B
CE2 613 (TYR)	CAG B
CD2 613 (TYR)	CAG B
CG 285 (PHE)	CAG B
CD1 285 (PHE)	CAG B
CE1 285 (PHE)	CAG B
CG 613 (TYR)	CAJ A
CE2 613 (TYR)	CAJ A
CD2 613 (TYR)	CAJ A
CB 285 (PHE)	CAJ A
CG 285 (PHE)	CAJ A
CD1 285 (PHE)	CAJ A
CE1 285 (PHE)	CAJ A
CG 613 (TYR)	CAJ B
CD1 613 (TYR)	CAJ B
CE1 613 (TYR)	CAJ B
CE1 285 (PHE)	CAJ B
CD2 571 (HIS)	OAD A
C2 613 (TYR)	OAD A
CE2 613 (TYR)	OAD A
CD2 613 (TYR)	OAD A
CB 285 (PHE)	OAD A
CG 285 (PHE)	OAD A
CD1 285 (PHE)	OAD A
CD1 613 (TYR)	OAD B
CE1 613 (TYR)	OAD B

Πίνακας 6: Αλληλεπιδράσεις Van der Waals των μορίων γαλλικού οξέος με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb στο κέντρο αναστολής του ενζύμου.

Άτομα πρωτεΐνης	Άτομα εστέρα του προτοκατεχικού
NE2 341 (HIS)	OAC
N 136 (LEU)	OAA
ND2 284 (ASN)	O1
OD1 484 (ASN)	O6
ND1 377 (HIS)	O6
N 675 (GLY)	O4
N 674 (SER)	O3
N 675 (GLY)	O3

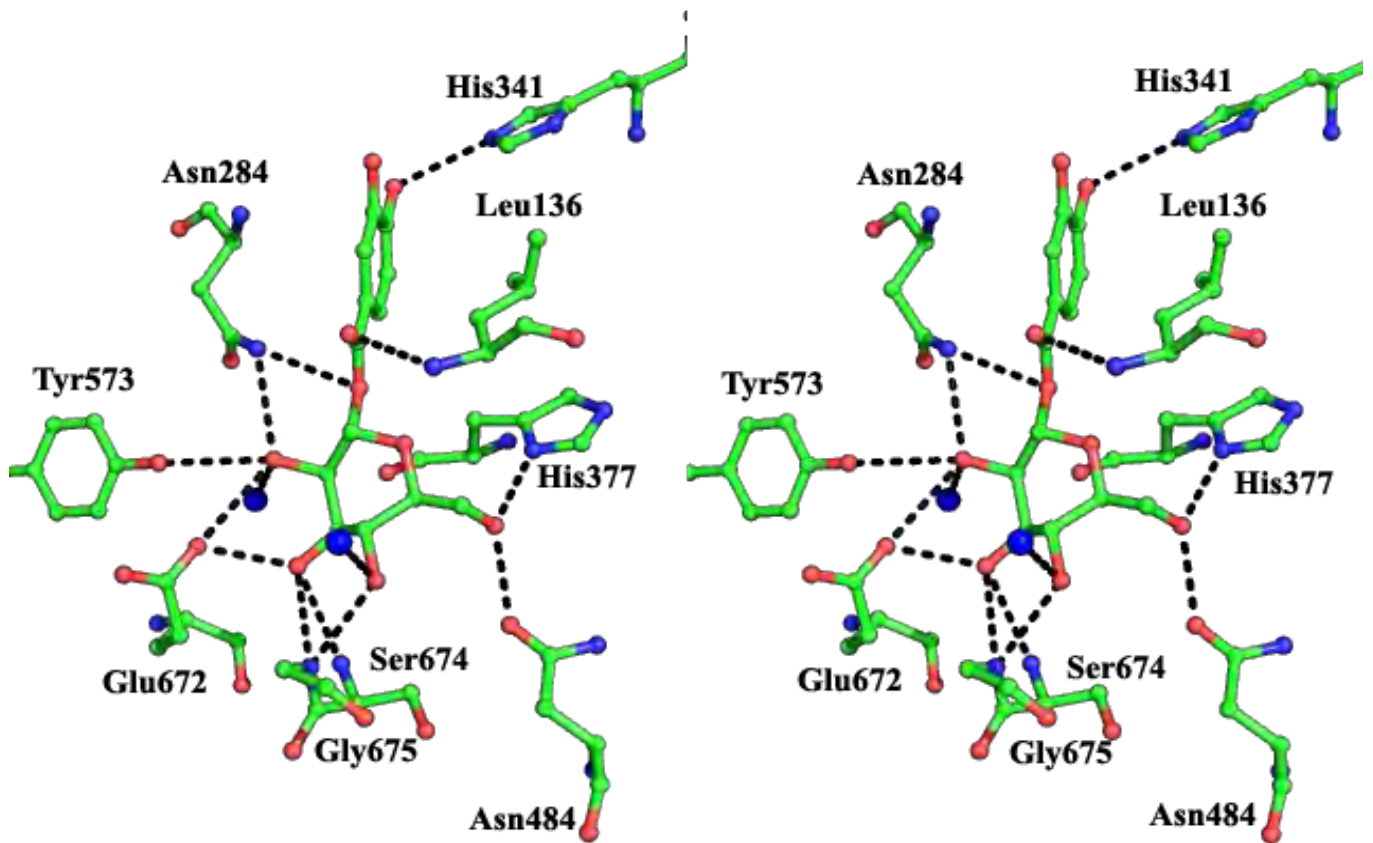
OE1 672 (GLU)	O3
OH 573 (TYR)	O2
OE1 672 (GLU)	O2
ND2 284 (ASN)	O2
W115	O4
W224	O2

Πίνακας 7 : Δεσμοί υδρογόνου του εστέρα του προτοκατεχικού με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb στο καταλυτικό κέντρο.

Άτομα πρωτεΐνης	Άτομα εστέρα του προτοκατεχικού
CD1 136 (LEU)	CAJ
N 284 (ASN)	CAJ CAP
CE1 341 (HIS)	CAP
CE1 341 (HIS)	OAD
N 284 (ASN)	CAD
CE1 341 (HIS)	CAD
NE2 341 (HIS)	CAD
CE1 341 (HIS)	OAC
NE2 341 (HIS)	OAC
CG2 378 (THR)	CAH
ND2 284 (ASN)	CAI
CB 377 (HIS)	CAI
CD1 284 (ASN)	CAI
CB 136 (LEU)	CAQ
CD1 136 (LEU)	CAQ
ND2 284 (ASN)	CAQ
CB 136 (LEU)	CAN
ND2 284 (ASN)	CAN
CA 136 (LEU)	OAA
CB 136 (LEU)	OAA
CB 377 (HIS)	O1
ND2 284 (ASN)	C1
C 135 (GLY)	O5
CA 136 (LEU)	O5
CB 136 (LEU)	O5
CB 377 (HIS)	O5
ND1 377 (HIS)	O5
C 135 (GLY)	C6
O 135 (GLY)	C6
ND1 377 (HIS)	C6
OD1 484 (ASN)	C6
CD2 139 (LEU)	O6
CG2 455 (VAL)	O6

CE1 377 (HIS)	O6
CG1 455 (VAL)	O6
CG 484 (ASN)	O6
CG 377 (HIS)	O6
N 675 (GLY)	C4
C 675 (GLY)	O4
CA 675 (GLY)	O4
CB 674 (SER)	O4
C 674 (SER)	O4
N 674 (SER)	C3
N 675 (GLY)	C3
O31 672 (GLU)	C3
CB 673 (ALA)	C3
O 377 (HIS)	C3
CA 675 (GLY)	O3
CA 673 (ALA)	O3
CA 674 (SER)	O3
C 674 (SER)	O3
CG 672 (GLU)	O3
CD 672 (GLU)	O3
C 672 (GLU)	O3
CB 673 (ALA)	O3
OE1 672 (GLU)	C2
ND2 284 (ASN)	C2
O 377 (HIS)	C2
CG 284 (ASN)	O2

Πίνακας 8: Αλληλεπιδράσεις van der Waals του εστέρα του προτοκατεχικού με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.



Εικόνα 33: Στερεοσκοπική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του εστέρα του προτοκατεχικού με τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου και τα μόρια ύδατος. Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές και τα μόρια ύδατος με μπλε σφαίρες.

Συμπερασματικά, στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε αρχικά η κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων της διαδικασίας παραγωγής χυμού από ρόδι της ποικιλίας Wonderful, για τον προσδιορισμό της IC₅₀. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά η δομή του συμπλόκου του ενζύμου με ένα από τα εκχύλιμα, προκειμένου να προσδιοριστεί η δραστική ουσία που περιέχεται στο εκχύλιμα και προκαλεί μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου και να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής. Από την κινητική μελέτη αποδείχτηκε πως τα εκχυλίσματα ροδιού (δείγμα 10 και 11) παρουσιάζουν μέτρια ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Σύμφωνα με την κρυσταλλογραφική μελέτη του δείγματος 11, στο κέντρο αναστολής του ενζύμου προσδένεται το γαλλικό οξύ και στο καταλυτικό κέντρο προσδένεται το προτοκατεχικό οξύ και γλυκόζη, τα οποία σχηματίζουν τον εστέρα του προτοκατεχικού. Η

σύνδεση του γαλλικού οξέος γίνεται μέσω τριών δεσμών υδρογόνου (δύο με αμινοξικά κατάλοιπα του κέντρου αναστολής και έναν με ένα μόριο ύδατος), αλλά κυρίως μέσω πολλαπλών αλληλεπιδράσεων Van der Waals των μορίων γαλλικού οξέως με τα αμινοξικά κατάλοιπα του ενζύμου και ιδιαίτερα με τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Phe285 και Tyr613. Επίσης η σύνδεση του εστέρα του προτοκατεχικού οξέος στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου σταθεροποιείται τόσο από δεσμούς υδρογόνου με αμινοξικά κατάλοιπα του ενζύμου όσο και με μόρια ύδατος αλλά και μέσω αλληλεπιδράσεων Van der Waals. Τέλος εκκρεμούν ex vivo μελέτες των εκχυλισμάτων σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος, για μελετηθεί η ανασταλτική ισχύς του εκχυλίσματος και σε κυτταρικό επίπεδο, καθώς και η κρυσταλλογραφική μελέτη του δείγματος 10 ώστε να μπορέσουμε να ταυτοποιήσουμε την δραστική ουσία που προκαλεί την αναστολή, 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.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ :

- Σμοκοβίτης Α., (2004), Φυσιολογία, Έκδοση 4^η, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
- Stryer L., (1997), Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

ΞΕΝΗ:

- Apostolou A., Stagos D., Galitsiou E., Spyrou A., Haroutounian A., Portesis N., Trizoglou I., A. Wallace Hayes, Tsatsakis A. M., Kouretas D., (2013), Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts, Food and Chemical Toxicology.
- Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature* 340, 609-616.
- Blundell T. L., Jhoti H. & Abell C., (2002), High-throughput crystallography for lead discovery in drug design, Nature Reviews, Drug Discovery, Volume 1.
- CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4), (1994), The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography, Acta Crystallogr., D50, 760-763.
- Fletterick R. J. & Madsen N. B., (1980), The structures and related functions of phosphorylase α , Annu. Rev. Biochem., 49, 31-61.
- Hammes G.G. (2005) Spectroscopy for the Biological Sciences, Wiley Interscience Publication, 17-25
- Hauptman H.A. (1991) The phase problem of X-ray crystallography Rep. Prog. Phys. 1427-1454
- Johnson L. N. & Hajdu J., (1989), Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals, Biophysics & Synchrotron Radiation, Hasnain S. ed, 142-155, Ellis Horwood, Chichester.
- Leatherbarrow, R. J., (1997), Using linear and non-linear regression to fit biochemical data, TIBS, 15, 455-458. .
- Oikonomakos N. G., Acharya K. R. & Johnson L. N., (1992), Post-Translational Modifications of Proteins, Harding J. J. & Crabbe M. J. C. eds, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-127.
- Oikonomakos, N.G. (2002), Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. Curr. Protein Pept. Sci. 3: 561–586
- 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 N⁷-acetyl- and Benzoyl-N⁷- β -D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. Eur. J. Biochem. 269, 1684-1696.
- Oikonomakos, N. G.; Somsak, L. Curr. Opin. Invest. Drugs (2008), 9, 379.
- Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinowetz A.M., McPherson R.K., Olson T.V., Treadway J.L. and Hoover D.J., (2000), Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at new allosteric site. Chemistry and Biology, 7, No 9, 677-682.

- 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
- Taylor, G. (2003), The phase problem *Acta Crystallogr.*, D59, 1881-1890.
- Witters L. A. & Avruch J., (1978), Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase, *Biochemistry*, 17, 406-410.