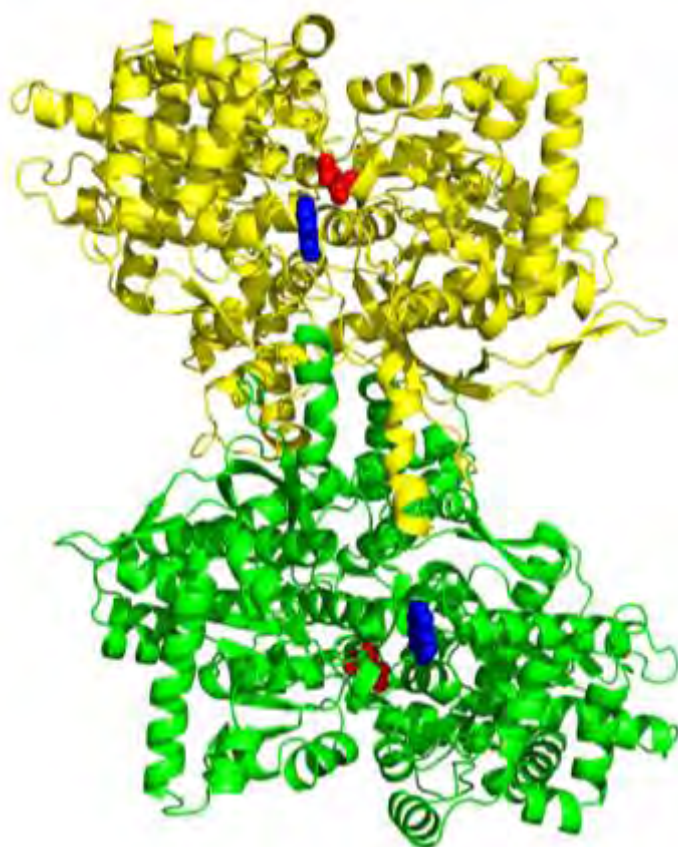


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



*Αξιολόγηση φυτικών εκχυλισμάτων ως προς την πιθανή τους
υπογλυκαιμική δράση*

*Assessment of various plant extracts for potential hypoglycaemic
effect*



Κοριάκης Ευθύμιος

Λάρισα, 2014

**Αξιολόγηση φυτικών εκχυλισμάτων ως προς την πιθανή τους
υπογλυκαιμική δράση**

Assessment of various plant extracts for potential hypoglycaemic effect

Τριμελής επιτροπή

- Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος (επιβλέπων)

Αναπληρωτής καθηγητής βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχολής επιστημών υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

- Δρ. Ψαρρά Άννα – Μαρία

Επίκουρος καθηγήτρια βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχολής επιστημών υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

- Δρ. Κοντού Μαρία

Επίκουρος καθηγήτρια πρωτεϊνικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχολής επιστημών υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφιερώνεται στην οικογένεια μου, στους φίλους μου και στη καλή μου φίλη Μαρία Κυρίτση†

Εξώφυλλο: Τρισδιάστατη δομή της βιολογικά ενεργής διμερούς μορφής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Με κόκκινο χρώμα αποτυπώνεται το μόριο της γλυκόζης το οποίο προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο ενώ με μπλέ χρώμα παρουσιάζεται το μόριο του γαλλικού οξέος το οποίο προσδένεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου.

Περιεχόμενα

I. Περίληψη	7
II. Abstract	7
III. Ευχαριστίες.....	8
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης	10
1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ή ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης.....	10
1.1.2 Διαβητική Κετοξέωση και υπεργλυκαιμική υπερωσμωτική κατάσταση	12
1.1.3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2.....	14
1.1.4 Ανοχή στην ινσουλίνη	16
1.1.5 Γλυκαγόνη.....	19
1.1.6 Θεραπευτικοί στόχοι για ΣΔ2 (Ηπατικοί στόχοι).....	19
2. Βασικές γνώσεις.....	20
2.1 Γλυκόζη	20
2.2 Γλυκογόνο.....	21
2.3 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου	22
2.4 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης	23
3. Η Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	24
3.1 Γενικά	24
3.2 Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	25
3.3 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις	28
3.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	32
3.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών ενώσεων που προέρχονται από φυτά.....	33
3.5.1 <i>Vitis vinifera</i> (σταφύλι).....	33
3.5.2 <i>Punica granatum L.</i> (Ρόδι).....	34
4. Κρυσταλλογραφία.....	34
4.1 Γενικά	34
4.2 Η φύση των κρυστάλλων.....	35
4.3 Ανάπτυξη κρυστάλλων	37
4.4 Ακτίνες-X.....	39
4.5 Θεωρία περίθλασης ακτινών X από κρύσταλλο	40
4.5.1 Ο Νόμος του Bragg	42
4.5.2 Ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα και η σφαίρα του <i>Ewald</i>	43

4.6 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου	45
4.7 Έλεγχος του δομικού μοντέλου – Διάγραμμα Ramachandran.....	46
5. Σκοπός	48
6. Υλικά και μέθοδοι	49
6.1-6.2 Διαδικασία επεξεργασίας εκχυλισμάτων παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού και αμπελοκομίας.....	49
6.3 Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κουνελιών ποικιλίας <i>oryctolagus cuniculus</i>	50
6.4 Παρασκευή γλυκογόνου 10%	53
6.5 Κινητικές μελέτες έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b.....	54
6.5.1 Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος	55
6.5.2 Παρασκευή διαλυμάτων υπό μελέτη ουσιών.	55
6.5.3 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρώματος 1-φωσφορικής γλυκόζης.....	55
6.5.4 Πειραματική διαδικασία	57
6.5.4.1 Προσδιορισμός του φωσφόρου	58
6.5.5 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας	58
6.5.6 Προσδιορισμός σταθεράς <i>Michaelis-Menten</i> (K_M).....	58
6.5.7 Προσδιορισμός IC_{50}	60
6.5.7.1 Προσδιορισμός IC_{50} για τα φυτικά εκχυλίσματα.....	60
6.5.7.2 Προσδιορισμός IC_{50} γαλλικού οξέος	61
6.5.8 Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής ενός ενζύμου (K_i).....	62
6.5.8.1 Προσδιορισμός K_i γαλλικού οξέος.	62
6.5.8.2 Προσδιορισμός K_i καφεΐνης.....	62
6.5.9 Εύρεση του είδους της αναστολής αναστολής.....	62
6.5.9.1 Έλεγχος συναγωνισμού για το κέντρο αναστολής	62
6.5.9.2 Έλεγχος συναγωνισμού για το κέντρο σύνδεσης <i>AMP</i>	63
6.5.9.3 Έλεγχος συναγωνισμού για το καταλυτικό κέντρο	63
6.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα <i>GraFit</i>	63
6.7 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb.....	64
6.7.1 Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου-αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη. ..	66
6.7.2 Έκθεση πρωτεϊνικού μονοκρυστάλλου σε ακτίνες X.....	66
6.7.3 Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	68
6.7.4 Κρυσταλλογραφική μελέτη του εκχυλίσματος ροδιού No.6 και του γαλλικού οξέος	68
6.8. Ex vivo μελέτες	70
6.8.1 Απόψυξη κυττάρων	71

6.8.2	θρυψινοποίηση κυττάρων	71
6.8.3	Ψύξη κυττάρων	72
6.8.4	Πειραματική διαδικασία	72
6.8.4.1	Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GPb.....	73
6.8.4.2	Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης σε κάθε κυτταρικό εκχύλισμα - Bradford.....	74
6.8.4.3	Επεξεργασία αποτελεσμάτων:.....	75
7.	Αποτελέσματα - Συζύτηση.....	76
7.1	Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b	76
7.2	Προσδιορισμός της σταθεράς <i>Michaelis-Menten</i>	76
7.3	Προσδιορισμός της <i>IC₅₀</i> των φυτικών εκχυλισμάτων και του γαλλικού οξέος.....	78
7.4	Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικών μελετών: <i>Punica granatum L.</i>	80
7.4.1	Γαλλικό οξύ.....	84
7.5	Προσδιορισμός της <i>IC₅₀</i> και της <i>K_i</i> του γαλλικού οξέος.....	85
7.6	Προσδιορισμός της <i>K_i</i> της καφεΐνης.....	88
7.7	Έλεγχος συναγωνισμού ως προς τα διάφορα κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου.....	90
7.7.1	Έλεγχος συναγωνισμού για το κέντρο αναστολής ως προς την καφεΐνη	92
7.7.2	Έλεγχος συναγωνισμού για το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης ως προς το <i>AMP</i>	92
7.7.3	Έλεγχος συναγωνισμού για το καταλυτικό κέντρο ως την 1-φωσφορική γλυκόζη και την καφεΐνη.....	93
7.8	Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικών μελετών από το γαλλικό οξύ.	94
7.9	Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν	97
7.10	Αποτελέσματα ex vivo μελετών.....	99
8.	Μελλοντικές μελέτες.....	99
	Βιβλιογραφία	104

I. Περίληψη

Στις μέρες μας, το ενδιαφέρον πολλών μελετών συγκεντρώνεται γύρω από τη μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων για την εύρεση νέων φαρμάκων και την παραγωγή βιολειτουργικών προϊόντων. Το ενδιαφέρον της ερευνητικής μας ομάδας στρέφεται γύρω από την παραγωγή προϊόντων με υπογλυκαιμική δράση. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η πιθανή υπογλυκαιμική δράση εκχυλισμάτων που προέρχονταν από παραπροϊόντα διαφόρων ελληνικών ποικιλιών - *Vitis vinifera* καθώς και *Punica granatum L.* ποικιλίας *Wonderful*. Η πιθανή δραστηριότητα των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε με τη διεξαγωγή κινητικών μελετών προσδιορίζοντας το ανασταλτικό τους δυναμικό έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) που απομονώθηκε και από κονίκλους ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus*. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου b αποτελεί ένα ένζυμο κλειδί που συμμετέχει στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Το εκχύλισμα με το μεγαλύτερο ανασταλτικό δυναμικό ήταν το *Assyrtiko Santorini 2008* και η τιμή της IC_{50} προσδιορίστηκε στα $4.1 \mu\text{g/ml}$. Η εφαρμογή κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X έναντι κρυστάλλων της GP, εμποτισμένους με το εκχύλισμα *Punica granatum L.* βοήθησε στην ταυτοποίηση της βιοδραστικής ένωσης που βρισκόταν στον συγκεκριμένο εκχύλισμα. Η ουσία αυτή, που προσδένεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου, ονομάζεται Γαλλικό Οξύ και η τιμή της σταθεράς αναστολής (K_i) προσδιορίστηκε στα 1.7 mM . Επιπλέον κινητικές μελέτες διεξήχθησαν για την εύρεση του είδους της αναστολής αναδεικνύοντας ότι το γαλλικό οξύ εμφανίζει συναγωνιστική αναστολή ως προς το AMP για το κέντρο πρόσδεσης του AMP στο ένζυμο, ενώ εμφανίζει μη συναγωνιστική αναστολή με την καφεΐνη και τη γλυκόζη ως προς το αλλοστερικό κέντρο και το καταλυτικό κέντρο αντίστοιχα. Νέες κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων-X έναντι κρυστάλλων της GP, εμποτισμένους με γαλλικό οξύ, επιβεβαίωσαν την πρόσδεση του γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής του ενζύμου.

II. Abstract

Efforts to discover new medicine from natural products with the prospect of producing biofunctional products has been of interest for many research studies lately. Of special interest to our research team lies the production of products with hypoglycaemic effect. For this reason we studied the potential hypoglycaemic effect of plant extracts derived from byproducts of numerous varieties of *Vitis vinifera* and "wonderful", which is a variety of *Punica granatum L.* The potential effect of these extracts was assessed by kinetic studies against glycogen phosphorylase (GP), which was isolated and purified from *Oryctolagus cuniculus*. GP is a key enzyme involved in glycogen metabolism. Our results showed that the highest inhibition capacity was of *Assyrtiko Santorini 2008* with an IC_{50} value of $4.1129 \mu\text{g/ml}$. X-ray crystallography analysis of GP crystals soaked with *Punica granatum L.* extract led to the identification of a bioactive compound present in that particular extract. The substance, that binds to the allosteric site of GP, is called *Gallic Acid* and its inhibitor constant (K_i) value was 1.7330 mM . After detailed kinetic studies, aiming at the determination of the nature of the inhibition this compound had, we concluded that gallic acid appears to act as a competitive inhibitor against AMP for the binding site of AMP on GP but shows non-competitive inhibition against caffeine and α -D-glucose for the inhibitory and catalytic site on GP, respectively. X-ray crystallography of GP crystals, soaked with gallic acid, verified that gallic acid, indeed, binds to the inhibition site of glycogen phosphorylase b.

III. Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή βιοχημείας Δρ. Δημήτριου Δ. Λεωνίδα στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχολής επιστημών υγείας από τον Φεβρουάριο του 2013 έως τον Φεβρουάριο του 2014. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Λεωνίδα Δ. Δημήτριο για την απλόχερη προσφορά της συνεργασίας του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Η ψυχολογική ενθάρυνση, η υπομονή του και η καθοδήγηση του παράλληλα με την προσφορά των επιστημονικών του γνώσεων κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας αποτέλεσαν κύριο παράγοντα για την πυροδότηση του ενδιαφέροντος μου και του ενθουσιασμού μου ως προς τις βιοεπιστήμες.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω και προς την επίκουρο καθηγήτρια βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχολής επιστημών υγείας Δρ. Ψαρρά Άννα – Μαρία για την βοήθεια της και τις συμβουλές της σε ότι αφορά τον τομέα των κυτταροκαλλιιεργειών. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την υπομονή της, την πρόθεση της να απαντήσει σε κάθε μου ερώτηση καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την αναπληρώτρια καθηγήτρια Δρ. Κοντού Μαρία του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχολής επιστημών υγείας για την προσφορά της συνεργασίας της.

Η εναρμόνιση μου με τις απαιτητικές συνθήκες του εργαστηρίου δεν θα μπορούσε να γίνει πιο εύκολη, κάτι το οποίο οφείλεται στο φιλικό και επαγγελματικό περιβάλλον που δημιούργησαν οι υποψήφιοι διδάκτορες μαζί με τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας τους οποίους ευχαριστώ για την υπέροχη συνεργασία τους. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω προς την υποψήφια διδάκτορα Καντσάδη Αναστασία για την αμέριστη συμπαράσταση της, την ευγένεια της και την βοήθεια παντός τύπου που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας καθώς μου μεταλαμπάδευσε τις απαραίτητες γνώσεις και τεχνικές δεξιότητες για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Επίσης πολύ σημαντική ήταν η εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου έτσι το κίνητρο να ολοκληρώσω την διπλωματική μου εργασία υπο τις καλύτερες δυνατές συνθήκες. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η συνηγορία του υποψήφιου διδάκτορα Γοργογέτα Βύρωνα, τον οποίο ευχαριστώ θερμά, καθώς με βοήθησε να κατανοήσω, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο, τις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο εργαστήριο των κυτταροκαλλιιεργειών. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για την αποδοχή μου στο εργαστήριο των κυτταροκαλλιιεργειών ως απλώς παρατηρητής ώστε να παρακολουθήσω και να μάθω από τον τρόπο με τον οποίο χειρίζεται τις κυτταρικές σειρές. Πάνω στον ίδιο τομέα θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σταυρούλα Θεοφάνους για την βοήθεια της κατά την διεξαγωγή των κινητικών μελετών στα κύτταρα καθώς επίσης και τον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Στραβοδήμο για την βοήθεια του στα *in vitro* πειράματα. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω και προς την υποψήφια διδάκτορα Χατζηλεοντιάδου Δήμητρα

καθώς ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει και να απαντήσει σε κάθε μου ερώτηση. Την ευχαριστώ επίσης για την άψογη συμπεριφορά της και τον επαγγελματισμό που επέδειξε κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο

Τέλος, τις θερμότερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να τις αποδώσω στους γονείς μου οι οποίοι μου έδειξαν απεριόριστη εμπιστοσύνη και στήριξη καθ' όλα τα χρόνια των προπτυχιακών σπουδών μου.

1. Εισαγωγή

1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Η πρώτη ξεκάθαρη και ολοκληρωμένη περιγραφή του σακχαρώδους διαβήτη (Diabetes mellitus) δόθηκε από τον Αρεταίο της Καππαδοκίας, ο οποίος ήταν φημισμένος γιατρός της ύστερης Ελληνιστικής περιόδου και το όνομα του έχει συνδεθεί με τον σακχαρώδη διαβήτη όσο κανενός άλλου γιατρού της αρχαιότητας. Τα κείμενα του Αρεταίου σχετικά με τον σακχαρώδη διαβήτη ξεχωρίζουν για το μεγάλο εύρος γνώσεων, την ευθυκρισία και την ακρίβεια της συγγραφής (Laios K. et al., 2012).

Η γλυκόζη, αποτελεί το κύριο μεταβολικό καύσιμο των θηλαστικών και η διατήρηση των επιπέδων της σε κατάλληλα επίπεδα είναι κρίσιμη για την φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Διαταραχές στη ρύθμιση της γλυκόζης μπορούν να οδηγήσουν σε ασθένειες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, η γαλακτοζαιμία και ασθένειες που σχετίζονται με την αποθήκευση του γλυκογόνου. Το γλυκογόνο αποτελεί είναι διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης που χρησιμεύει ως αποθήκη ενέργειας σε περιόδους όπου υπάρχει περίσσεια τροφής ώστε να χρησιμοποιηθεί όταν είναι απαραίτητο. Έτσι λοιπόν, είναι κατανοητό ότι χρειάζεται ένα σύστημα ελέγχου και ρύθμισης των απαραίτητων διαδικασιών, με υψηλή πιστότητα το οποίο θα μπορεί να ανταποκρίνεται γρήγορα σε αλλαγές του περιβάλλοντος αλλά και σε αλλαγές που σχετίζονται με την διατροφή (Xu K., 2011). Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) και η υπεργλυκαιμία είναι σημαντικοί παράγοντες θνησιμότητας και νοσηρότητας σε όλο τον κόσμο λόγω των άμεσων κλινικών συνεπειών αλλά και λόγω της θνησιμότητας από καρδιαγγειακές και νεφρικές παθήσεις που ενδέχεται να προκαλέσουν. Ο αριθμός των ανθρώπων με σακχαρώδη διαβήτη αυξήθηκε από 153 (127-182) εκατομμύρια το 1980 σε 347 (314-383) εκατομμύρια το 2008 (Danaei G. et al., 2011). Τα παραπάνω δεδομένα είναι άκρως ανησυχητικά γιατί αποτυπώνεται ο καλπάζων ρυθμός αύξησης των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη. Η παγκόσμια επιδημία του διαβήτη, ιδίως στην αναπτυσσόμενη χώρα, οφείλεται κυρίως στην ραγδαία αύξηση της παχυσαρκίας και στην έλλειψη της σωματικής δραστηριότητας. Ο σακχαρώδης διαβήτης έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας των β-κυττάρων του παγκρέατος να παράγουν ινσουλίνη και κατά κύριο λόγο διαχωρίζεται σε τρεις τύπους: Τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και τον διαβήτη της κύησης (Yan W. et al., 2012).

1.1.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 ή ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ΣΔ1) χαρακτηρίζεται από τη μόνιμη καταστροφή των β-κυττάρων των παγκρεατικών νησίδων του Langerhans, που οποία έχουν την δυνατότητα να εκκρίνουν την ινσουλίνη. Ο διαβήτης τύπου 1 θεωρούταν μια διαταραχή που εμφανιζόταν μόνο σε παιδιά και σε εφήβους, αλλά αυτή η άποψη έχει αλλάξει την τελευταία δεκαετία και η ηλικία να δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου. Ο ΣΔ1 φαίνεται να παρουσιάζει οικογενή εμφάνιση, με τα μέλη της οικογένειας να διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο

για την εκδήλωση της ασθένειας σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό (Pugliese A., 2012).

Κατά την εξέλιξη του ΣΔ τύπου 1 η αυτοδιαχείριση είναι ιδιαίτερα σημαντική. Οι ασθενείς θα πρέπει να γνωρίζουν πως να παρακολουθούν τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος τους. Η δοκιμή της γλυκοσυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1C) είναι ένας από τους καλύτερους μακροχρόνιους δείκτες για την αυτοδιαχείριση της ασθένειας και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του μέσου όρου της γλυκόζης στο αίμα. Η γλυκοσυλιωμένη αιμοσφαιρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την διάγνωση του διαβήτη. Άτομα με A1C > 6% αλλά μικρότερο του 6,5% διατρέχουν υψηλό κίνδυνο για εκδήλωση διαβήτη ενώ άτομα με A1C > 6,5% φαίνεται να έχουν εκδηλώσει ήδη την ασθένεια (The International Expert Committee, 2009). Σε ασθενείς με ΣΔ1 αν παρατηρηθεί κάποια απόκλιση από τον εξατομικευμένο στόχο για την γλυκοσυλιωμένη αιμοσφαιρίνη δίνεται η προτροπή στους γιατρούς να τροποποιήσουν την στρατηγική θεραπείας επεμβαίνοντας στον τρόπο ζωής ή στη χορήγηση των φαρμάκων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μπορούν να προληφθούν μια ποικιλία από επιπλοκές όπως είναι οι ακρωτηριασμοί των διαβητικών ασθενών (Mansour-Ghanaei R., 2013; Bonora E., et al., 2011).

Η πολυδιψία, η πολυφαγία, η πολουρία και η έκδηλη υπεργλυκαιμία παραμένουν σημαντικά εργαλεία για την διάγνωση της ασθένειας σε παιδιά, εφήβους και σε μικρότερο βαθμό σε ενήλικες (Atkinson M. A. et al., 2013). Στα άτομα που φέρουν τα συμπτώματα έχει καταστραφεί, τυπικά, περισσότερο από το 80% του πληθυσμού των β-κυττάρων τους, κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα να μην υπάρχει ουσιαστικά καμία παραγωγή ινσουλίνης. Έτσι, είναι φανερή η ανικανότητα του οργανισμού να ρυθμίσει τα επίπεδα της γλυκόζης. Στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 η καταστροφή των β-κυττάρων φαίνεται να γίνεται συνήθως με αυτοάνοσο μηχανισμό (Godfrey K. J. et al., 2012), όπου φαίνεται να μεσολαβούν T- κύτταρα, οδηγώντας έτσι σε σχεδόν πλήρη απώλεια των β-κυττάρων του παγκρέατος. Η κυτταρική και χυμική ανοσολογική απόκριση έναντι αρκετών αυτοαντιγόνων για τις κυτταρικές νησίδες, εντοπίζεται κοντά στη στιγμή που θα γίνει η διάγνωση. Τα καλύτερα μελετημένα αυτοαντισώματα περιλαμβάνουν την ινσουλίνη/προϊνσουλίνη, αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού οξέος (GAD65), πρωτεΐνη με δράση όμοια με τυροσινική φωσφατάση IA-2, IGRP (Islet-specific Glucose-6- phosphatase catalytic subunit-Related Protein), και τον κατιοντικό μεταφορέα ZnT8 (Pugliese A. 2012). Όπως αναφέρθηκε οι περισσότερες περιπτώσεις ασθενών με διαβήτη τύπου 1 φαίνεται να σχετίζονται με κάποια διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος, αν και δεν έχουν όλοι οι ασθενείς αυτά τα χαρακτηριστικά. Αυτό οδηγεί στην προτεινόμενη ταξινόμηση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 σε δύο (υπό)-τύπους: τον 1A και τον 1B. Ο τύπος 1A (αυτοάνοσος), περιλαμβάνει το 70% - 90% των ασθενών με διαβήτη τύπου 1 που έχουν ανοσολογικά, αυτό-δραστικά αυτο-αντισώματα. Ο τύπος 1B (ιδιοπαθής) αντιπροσωπεύει το υπόλοιπο των ασθενών για τους οποίους οι προδιαγραφές της παθογένειας της ασθένειας μένουν ασαφής (Atkinson M. A. et al., 2013).

Στο επίκεντρο για την θεραπεία του διαβήτη τύπου 1 βρίσκεται η έγχυση εξωγενούς ινσουλίνης, που παρέχει κάποιο επίπεδο ελέγχου των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και έχει συμβάλει σημαντικά στη μείωση της νοσηρότητας του διαβήτη. Όμως, ακόμα και στις καλύτερες περιπτώσεις ο έλεγχος της γλυκόζης και οι εγχύσεις ινσουλίνης δεν μπορούν να αντισταθμίσουν πλήρως την απώλεια των β-κυττάρων του παγκρέατος. Παρόλο που υπάρχει τεχνολογική εξέλιξη στους μετρητές γλυκόζης (*glucose monitors*) και στις αντλίες ινσουλίνης (*insulin pumps*), κάτι το οποίο βελτιώνει τις προσπάθειες για την παροχή εξωγενούς ινσουλίνης, φαίνεται ότι μια πιο **φυσιολογική** προσέγγιση θα είναι η αντικατάσταση των β-κυττάρων από ολόκληρο πάγκρεας ή η μεταμόσχευση των νησίδων του Langerhans (*Mayhew C. N. et al., 2010*). Ο διαβήτης τύπου 1 είναι μια ασθένεια περίπλοκη που εμπλέκει γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επομένως, εφόσον οι αιτίες εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη μπορούν να ποικίλουν ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα, θα ήταν ιδανικό να βρεθεί μια θεραπεία συγκεκριμένη για κάθε ασθενή. Το 2006 οι Shinya Yamanaka και Kazutoshi Takahashi κατάφεραν να παράγουν επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPS cells) από ινοβλάστες εμβρύων και ενήλικων ποντικών χρησιμοποιώντας καθορισμένους παράγοντες (defined factors) (*Takahashi K. and Yamanaka S., 2006*). Ο Shinya Yamanaka βραβεύτηκε για αυτή την έρευνα με το βραβείο νόμπελ φυσιολογίας το 2012 (<http://www.cell.com/cellpress/nobelprize2012> διαθέσιμο στις 11/8/2013). Το 2009 οι Rene Maehr et al., προχώρησαν ένα βήμα παραπέρα. Έλεβαν ινοβλάστες με βιοψία από το δέρμα ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1. Οι ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν και επιμολύνθηκαν με ρετροϊούς που κωδικοποιούσαν μεταγραφικούς παράγοντες αποδιαφοροποίησης κάτι το οποίο είχε ως αποτέλεσμα οι ερευνητές να λάβουν τα iPS κύτταρα. Στη συνέχεια με την χρήση κατάλληλων παραγόντων επέτυχαν να κατευθύνουν την διαφοροποίηση των iPS κυττάρων προς κύτταρα που είχαν τη δυνατότητα να παράγουν ινσουλίνη και ανταποκρίνονται στη γλυκόζη. Η επέκταση της προσέγγισης αυτής για όλους τους τύπους των κυττάρων που εμπλέκονται στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 θα μπορούσε να οδηγήσει στην κατανόηση των αιτιών της νόσου αλλά και στην ανάπτυξη αποτελεσματικών και προληπτικών και θεραπευτικών στρατηγικών (*Maehra R. et al., 2009*).

1.1.2 Διαβητική Κετοξέωση και υπεργλυκαιμική υπερωσμωτική κατάσταση

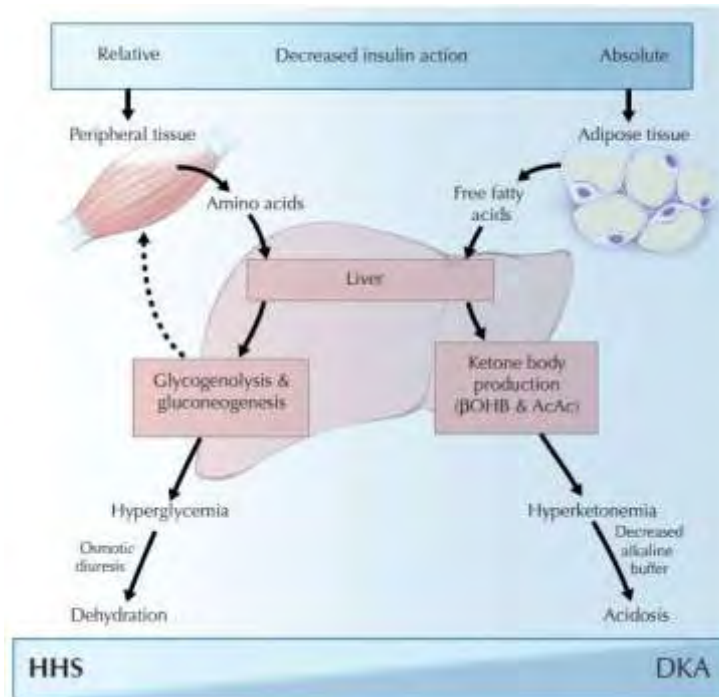
Πάνω από το 80% των παιδιών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 εμφανίζουν διαβητική κετοξέωση (DKA). Η διαβητική κετοξέωση είναι μια μεταβολική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία, οξέωση, κέτωση και εμφανίζεται όταν η αποτελεσματική δράση της ινσουλίνης είναι πολύ χαμηλή. Η διαβητική κετοξέωση είναι η κυρίαρχη αιτία θανάτου σε παιδιά με διαβήτη τύπου 1. Επιπρόσθετα τα παιδιά που νοσηλεύτηκαν με διαβητική κετοξέωση είχαν μεγαλύτερο αριθμό ψυχιατρικών διαταραχών, χαμηλότερη αυτοεκτίμηση και χειρότερες σχέσεις με τους γονείς τους αν και γενικά δεν έχει μελετηθεί η ψυχολογική επίδραση της διαβητικής οξέωσης κατά την έναρξη του διαβήτη τύπου 1 (*Usher-Smith J. A. et al., 2012*). Η εμφάνιση της διαβητικής κετοξέωσης γίνεται όταν υπάρχει υπερπαραγωγή της γλυκόζης και των κετονών στο ήπαρ με απελευθέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων από τους λιπώδη ιστούς, ως αποτέλεσμα της μεταβολής στην ισορροπία της

γλυκαγόνης και της ινσουλίνης. Όταν υπάρχει έλλειψη ινσουλίνης τα αυξημένα επίπεδα της γλυκαγόνης, των κατεχολαμινών και της κορτιζόλης διεγείρουν την παραγωγή ηπατικής γλυκόζης μέσω αυξημένης γλυκογονόλυσης και ενισχυμένης γλυκονεογένεσης όπως φαίνεται στην εικόνα 1. Η υπερκορτιζολαιμία θα οδηγήσει σε αυξημένη πρωτεόλυση παρέχοντας έτσι τα απαραίτητα αμινοξέα για την γλυκονεογένεση. Η χαμηλή συγκέντρωση ινσουλίνης και η υψηλή συγκέντρωση κατεχολαμινών θα μειώσουν την πρόσληψη της γλυκόζης από τους περιφερειακούς ιστούς. Ο συνδυασμός της αυξημένης παραγωγής ηπατικής γλυκόζης και η μειωμένη περιφερειακή χρήση της γλυκόζης είναι η κύρια παθολογική διαταραχή που ευθύνεται για την διαβητική κετοξέωση και για την υπεργλυκαιμική υπερωσμωτική κατάσταση (Chiasson J-L., 2003). Όταν εμφανίζεται η διαβητική κετοξέωση μεταβάλλεται η φυσιολογική μεταβολική ομοιότητα συνήθως λόγω της απόλυτης ανεπάρκειας της ινσουλίνης που βρίσκεται στην κυκλοφορία. Επίσης η μεταβολή αυτή μπορεί να οφείλεται στην παρουσία περίσσειας ρυθμιστικών ορμονών της γλυκόζης όπως είναι οι κατεχολαμίνες, η γλυκαγόνη, η αυξητική ορμόνη και κατά την εγκυμοσύνη η ανθρώπινη λακτογόνο ορμόνη του πλακούντα και η προλακτίνη. Το αποτέλεσμα της δράσης των παραπάνω ορμονών όπως αναφέρθηκε είναι η υπεργλυκαιμία. Η γλυκαγόνη οδηγεί σε αύξηση της ηπατικής παραγωγής των κετονοσωμάτων από λιπαρά οξέα. Επίσης στην αποικοδόμηση των κετονικών σωμάτων εμπλέκεται η ινσουλίνη. Έτσι λοιπόν η υπερβολική κετοναίμια μπορεί να οφείλεται και σε υπερπαραγωγή κετονοσωμάτων αλλά και στην μείωση της χρησιμοποίησης και απέκκρισης των κετονικών σωμάτων. Στον Πίνακα 1 φαίνονται οι κλινικές επιδράσεις την κετοξέωσης (De Veciana M., 2013).

Πίνακας 1: Σύνοψη των κλινικών χαρακτηριστικών της διαβητικής κετοξέωσης (De Veciana M, 2013).

Συμπτώματα διαβητικής κετοξέωσης

Ναυτία/Εμετός	Υπεραερισμός/fruity breath
Πολυδιψία	Ξηροί βλεννογόνοι
Πολουρία→ ολιγουρία	Ταχυκαρδία
Αδυναμία	Υπόταση
Απώλεια βάρους	Μεταβολές της νοητικής κατάστασης
Κοιλιακό άλγος	Κώμα



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της παθογένεσης της διαβητικής κετοξέωσης (DKA) και της υπεργλυκαιμικής υπερωσμωτικής κατάστασης (HHS). Η σχετική ή απόλυτη ανεπάρκεια ινσουλίνης διεγείρει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης, κάτι το οποίο οδηγεί σε υπεργλυκαιμία, οσμωτική διούρηση και αφυδάτωση. Σε σοβαρή ανεπάρκεια ινσουλίνης το ήπαρ θα αυξήσει την παραγωγή κετονικών σωμάτων οδηγώντας σε υπερκετοναμία και τελικά σε οξέωση. OHB: υδροξυβουτυρικό οξύ, AcAc: ακετοξικό οξύ (Chiasson J-L, 2003)

1.1.3 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

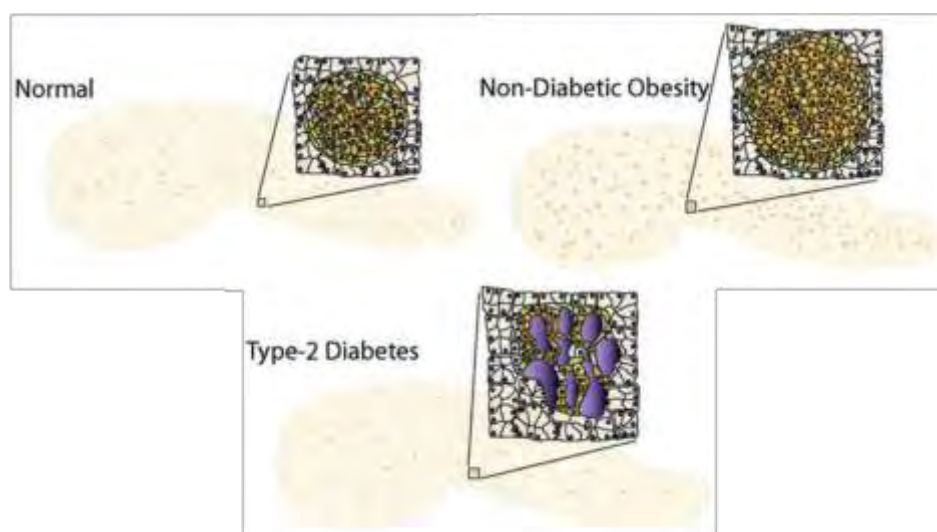
Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (ΣΔ2) αντιπροσωπεύει περίπου το 90% του διαβητικού πληθυσμού και χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα του σώματος να χρησιμοποιήσει αποτελεσματικά την ινσουλίνη. Για την θεραπεία του ΣΔ2 εκτός από τον έλεγχο του τρόπου ζωής χρειάζεται χορήγηση θεραπείας από το στόμα ακόμα και χορήγηση ινσουλίνης (Yan W. *et al.*, 2012). Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και οι επιπλοκές που μπορεί να προκαλέσει αποτελούν σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο. Εκτιμάται ότι το 2010, 285 εκατομμύρια άνθρωποι ζούσαν με ΣΔ2 από τους οποίους τα 7 εκατομμύρια προσεβλήθησαν από την ασθένεια μέσα στο χρόνο και περίπου 4 εκατομμύρια θάνατοι αποδόθηκαν στον διαβήτη. Το 2012 ο αριθμός των ασθενών με διαβήτη εκτιμήθηκε ότι ήταν 371 εκατομμύρια με τους θανάτους να ανέρχονται στα 4.8 εκατομμύρια. Για το 2030 εκτιμάται ότι 552 εκατομμύρια άνθρωποι θα πάσχουν από διαβήτη σύμφωνα με πληροφορίες της Διεθνούς Ομοσπονδίας για το Διαβήτη. Για την εκδήλωση της ασθένειας φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο τα πρότυπα διατροφής και ο τρόπος ζωής, ωστόσο η παθογένεια του ΣΔ2 δεν έχει καθοριστεί πλήρως και εικάζεται πως εμπλέκονται πολλοί διαφορετικοί παράγοντες (Kunutsor S. K., 2013; *International Diabetes Federation*, <http://www.idf.org/diabetesatlas> διαθέσιμο στις 12/8/13).

Η ανάπτυξη του ΣΔ2 που προέρχεται από την ανοχή στην ινσουλίνη και την δυσλειτουργία των β κυττάρων του παγκρέατος έχει ως αποτέλεσμα η ινσουλίνη που παράγεται να μην επαρκεί για να καλύψει τις ανάγκες του οργανισμού (Van Greevenbroek M.M.J., 2013).

Η ινσουλίνη δρα σε συνεργασία με την γλυκαγόνη, η οποία έχει αντίθετη δράση και είναι υπεύθυνη για την διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης. Σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας ή υπογλυκαιμίας μπορεί να επηρεαστεί η φυσιολογία ολόκληρου του σώματος οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Σε μη παθολόνες καταστάσεις η δράση της ινσουλίνης μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον ιστό-στόχο. Κάποιες από τις δράσεις της ινσουλίνης στους διάφορους ιστούς είναι:

- Στους σκελετικούς ιστούς: Αυξάνει τη μεταφορά της γλυκόζης, αυξάνει την πρόσληψη της γλυκόζης και ενεργοποιεί την σύνθεση του γλυκογόνου
- Στο ήπαρ: Επάγει την σύνθεση του γλυκογόνου και της de novo λιπογένεσης καθώς αναστέλλει την γλυκονεογένεση
- Στο λιπώδη ιστό: Καταστέλλει την λιπόλυση και προωθεί την λιπογένεση, οδηγώντας σε καθαρή συσσώρευση λίπους

Η έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος καταστέλλεται κατά την νηστεία. Κατά τη διάρκεια της νηστείας αυξάνεται η παραγωγή ηπατικής γλυκόζης καθώς και η γλυκογονόλυση. Στο ήπαρ μειώνεται η σύνθεση των λιπιδίων και παράλληλα αυξάνεται η λιπόλυση στον λιπώδη ιστό (Gonzalez-Franquesa A., 2012).



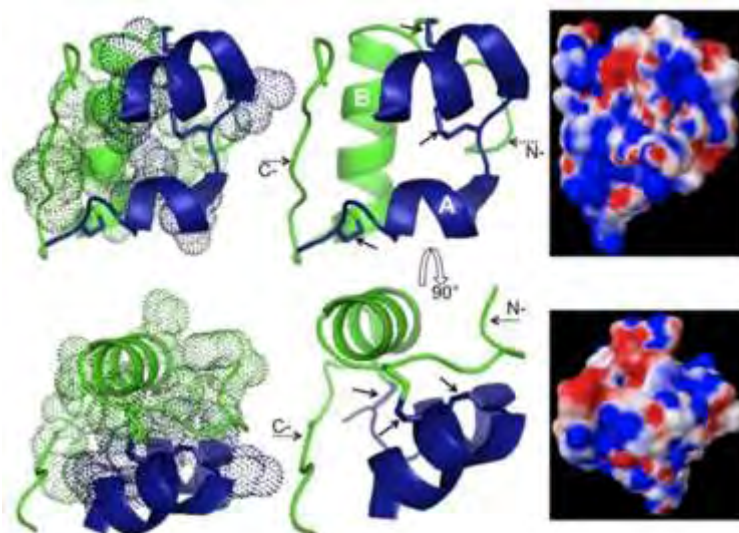
Εικόνα 2: Μορφολογία του παγκρέατος ενηλίκων ατόμων σε φυσιολογικούς ανθρώπους, μη διαβητικούς παχύσαρκους ανθρώπους και σε ασθενείς με ΣΔ2. Το πάγκρεας το οποίο αποτελείται κυρίως από εξωκρινή κύτταρα διατηρεί το σχήμα και το μέγεθος του και στις τρεις διαφορετικές περιπτώσεις. Οι ενδοκρινείς νησίδες (που εκκρίνουν ινσουλίνη) είναι πιο δυναμικές. Οι νησίδες αυτές σε φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται διασπαρμένες σε όλο το πάγκρεας και αποτελούν περίπου το 1% του συνολικού πληθυσμού των κυττάρων του παγκρέατος. Στις φυσιολογικές νησίδες τα β-κύτταρα (καφέ χρώμα) τείνουν να εντοπίζονται στον πυρήνα των νησίδων αντιπροσωπεύουν περίπου το 70% των ενδοκρινικών κυττάρων των νησίδων. Σε μη διαβητικούς παχύσαρκους ανθρώπους τα νησίδα τείνουν να αυξάνονται σε αριθμός και μέγεθος κυρίως λόγω της αύξησης του αριθμού των β-κυττάρων ανά νησίδα ή σε ορισμένες περιπτώσεις λόγω της αύξησης του μεγέθους των β-κυττάρων. Ως αποτέλεσμα το 90% των νησίδων των ενδοκρινικών κυττάρων είναι β-κύτταρα. Στον διαβήτη τύπου 2 ο αριθμός των νησίδων στο πάγκρεας μπορεί να μειωθεί και οι νησίδες τείνουν να αποδιοργανώνονται και να παραμορφώνονται. Υπάρχει μια αξιοσημείωτη μείωση του αριθμού των β-κυττάρων ανά νησίδα και οι αμυλοειδείς πλάκες (μωβ) μπορούν να κυριαρχήσουν στην περιοχή της νησίδα (Rhodes C. J., 2010).

Ο ΣΔ2 εμφανίζεται όταν το πάγκρεας αποτυγχάνει να εκκρίνει την απαραίτητη ινσουλίνη που απαιτεί ο μεταβολισμός, λόγω επίκτητης εκκριτικής δυσλειτουργίας

των β παγκρεατικών κυττάρων ή λόγω μείωσης της μάζας των β-κυττάρων. Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν η εκκριτική δυσλειτουργία των β-κυττάρων για την ινσουλίνη αποτελεί αίτιο ή συνέπεια της νόσου, όμως υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι μπορεί να οφείλεται σε συμπτωματική αλλαγή στη μάζα των β-κυττάρων του παγκρέατος. Στην εικόνα 2 φαίνεται η μορφολογία του παγκρέατος μεταξύ φυσιολογικών, μη-διαβητικών παχύσαρκων ανθρώπων και ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Rhodes C. J., 2010).

1.1.4 Ανοχή στην ινσουλίνη

Η σηματοδότηση της ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους οδηγεί σε μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών αποκρίσεων. Οι αποκρίσεις αυτές είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη του οργανισμού αλλά και για την ομοίωση της γλυκόζης, του λίπους και του μεταβολισμού των πρωτεϊνών (Le Roith D. et al., 2001). Η ινσουλίνη προκειμένου να επιφέρει το βιολογικό της αποτέλεσμα πρέπει να δράσει μέσω του διαμεμβρανικού της υποδοχέα. Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται η κρυσταλλική δομή της ινσουλίνης (Muzaffar M., 2011). Ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι ένας υποδοχέας κινάσης τυροσίνης και βρέθηκε για πρώτη φορά ως ένα ομοδιμερές με εξωγενείς δισουλφιδικούς δεσμούς ώστε να δημιουργηθεί ο λειτουργικός υποδοχέας. Κάθε μονομερές του υποδοχέα της ινσουλίνης αποτελείται από μια α- και μια β-υπομονάδα οι οποίες συνδέονται μέσω ενός εσωτερικού δισουλφιδικού δεσμού. Η α-υπομονάδα με μοριακό βάρος 135-kDa βρίσκεται στο εξωκυτταρικό τμήμα και συνδέεται με τον προσδέτη, ενώ η β-υπομονάδα με μοριακό βάρος 95-kDa αποτελείται από ένα εξωκυτταρικό, διαμεμβρανικό και ενδοκυτταρικό τμήμα το οποίο έχει την επικράτεια της κινάσης. Ο προσδέτης συνδέεται στην α-υπομονάδα ενεργοποιώντας τη δραστηριότητα της ενδογενούς κινάσης τυροσίνης, η οποία βρίσκεται στις β-υπομονάδες, και στη συνέχεια ενεργοποιεί ένα καταρράκτη φωσφορυλιώσεων που οδηγεί σε διαφορετικές βιολογικές αποκρίσεις (Chiu S-L., 2010). Αφού ενεργοποιηθεί η ενδογενής κινάση τυροσίνης του υποδοχέα (IRK), φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες στόχους όπως οι Sch και η οικογένεια των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS-1 έως IRS-4) σε επιλεγμένα κατάλοιπα τυροσίνης που χρησιμεύουν ως θέσεις πρόσδεσης για επόμενους τελεστές. Το παραπάνω γεγονός ενεργοποιεί δύο κύριους καταρράκτες σηματοδοτικών γεγονότων, ο ένας είναι της κινάσης της φωσφατίδυλο ινοσιτόλης (PIK-3) και ο άλλος των πρωτεϊνικών κινάσεων που ενεργοποιούνται από μιτογόνο παράγοντες (Mitogen Activated Protein Kinases Cascade, MAPK cascade). Οι δύο αυτοί καταρράκτες γεγονότων εμπλέκονται στις αυξητικές και μεταβολικές λειτουργίες της ινσουλίνης (Zick Y., 2001), στην εικόνα 4 φαίνεται το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης (Youngren J. F., 2007).

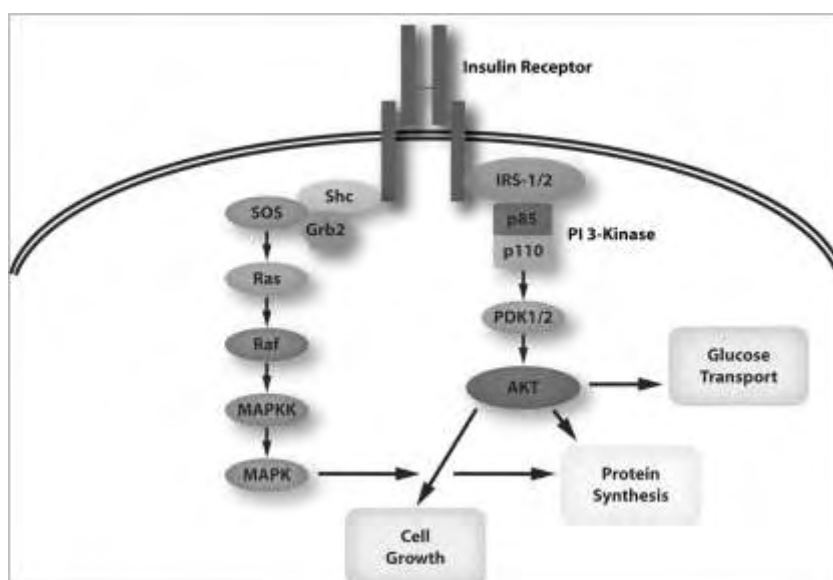


Εικόνα 3: Κρυσταλλική δομή της ινσουλίνης (PDB ID: 9INS), με 90⁰ περιστροφή. Με μπλε χρωματίζεται η αλυσίδα A ενώ με πράσινο χρώμα η αλυσίδα B. Οι τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί της ινσουλίνης αποτυπώνονται με ολοκληρωμένα βέλη. Τα διακεκομμένα βέλη υποδεικνύουν τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα της αλυσίδας-B. Οι σφαίρες στην αριστερή πλευρά της εικόνας δείχνουν τον κεντρικό υδρόφοβο πυρήνα της ινσουλίνης. Στη δεξιά πλευρά του σχήματος φαίνεται το δυναμικό της επιφάνειας της ινσουλίνης (μπλε-θετικό, κόκκινο-αρνητικό) που αποκτήθηκε ύστερα από επεξεργασία των PDB2PQR και APBS (Muzaffar M., 2011)

Η χρόνια υπεργλυκαιμία μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένη ενεργοποίηση της διατροφαισθητήριας (nutrient-sensing) πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/θρεονίνης mTOR (στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά) στα β παγκρεατικά κύτταρα. Η ενεργός mTOR προκαλεί φωσφορυλίωση του IRS-2 σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης οδηγώντας σε αποικοδόμηση του στο πρωτεάσωμα (proteosomal degradation), κάτι το οποίο θα οδηγήσει σε αυξημένη απόπτωση των β-κυττάρων. Επίσης η χρόνια υπεργλυκαιμία μπορεί να προκαλέσει απόπτωση των β-κυττάρων του παγκρέατος μέσω μηχανισμών οι οποίοι ονομάζονται στο σύνολο τους «γλυκοτοξικότητα». Αυτοί οι μηχανισμοί επάγουν την παραγωγή δυνητικά επιβλαβών δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS). Η απόπτωση των β-κυττάρων του παγκρέατος μπορεί να προκληθεί και από ανώμαλη συσσώρευση των λιπιδίων στα β-κύτταρα κατά την υπερλιπιδαιμία. Τα λιπαρά οξέα μέσω της μακράς αλυσού άκυλο-CoA μπορούν να ενεργοποιήσουν ισομορφές της πρωτεϊνικής κινάσης C (nPKC) ανεξάρτητα από το ασβέστιο. Χρόνια ενεργοποίηση ορισμένων nPKCs μπορεί να επιφέρει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση των μορίων IRS σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης, κάτι το οποίο στα β-κύτταρα θα ενεργοποιήσει και πάλι την αποικοδόμηση του IRS-2 ώστε τελικά το β-κύτταρο να οδηγηθεί σε απόπτωση (Rhodes C. J., 2010).

Η παχυσαρκία, η παρουσία σπλαχνικού λίπους και ιδιαίτερα η άνιση κατανομή του λίπους σχετίζεται με την επαγωγή μια ήπιας φλεγμονής η οποία χαρακτηρίζεται με υψηλά επίπεδα κυκλοφορίας προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και λιπαρών οξέων. Η ήπια αυτή φλεγμονή έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την σηματοδότηση της ινσουλίνης και την λειτουργία των β-κυττάρων οδηγώντας έτσι στην εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNF-α και η IL-6 μπορούν να παρεμποδίσουν το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης μέσω του μονοπατιού IRS και PI-3 κινάσης με ενεργοποίηση των κινάσεων σερίνης-θρεονίνης. Η μεταγωγή του

σήματος από την ινσουλίνη μέσω της PI3 κινάσης προσβάλλει κυρίως μεταβολικά μονοπάτια, όπως την μετατόπιση του GLUT4 προς την μεμβράνη και την αναστολή της ορμονοευαίσθητης λιπάσης (Van Greevenbroek M.M.J., 2013). Ο υποδοχέας GLUT4, είναι υπεύθυνος για την μεταφορά την γλυκόζης στο λιπώδη ιστό και στα μυϊκά κύτταρα και ρυθμίζεται από την ινσουλίνη. Στα κύτταρα του λιπώδους ιστού ο GLUT4 βρίσκεται σε μια συνεχή ανακύκλωση μεταξύ των ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων του κυττάρου και της πλασματικής μεμβράνης. Φυσιολογικά, η πλειοψηφία των υποδοχέων GLUT4 βρίσκεται σε ένα ενδοκυτταρικό τμήμα αποτελούμενο από σωληνίσκους και κυστιδία (tubulo-vesicular compartment). Η ινσουλίνη επάγει την μετακίνηση και εξωκυττάρωση των κυστιδίων που περιέχουν τον GLUT4 οδηγώντας σε μεγάλη κατανομή των υποδοχέων GLUT4 προς την μεμβράνη (Al-Hasani H., 1999). Η μετατόπιση αυτή προς την πλασματική μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυμού μεταφοράς της γλυκόζης (προς το εσωτερικό του κυττάρου). Σε ότι αφορά την πρωτεϊνική σύνθεση και την ανάπτυξη των κυττάρων, αυτή σχετίζεται ειδικότερα με τα μονοπάτια Ras/MAPK τα οποία ενεργοποιούνται κατά κύριο λόγο με φωσφορυλίωση των Sch. Κατά την ανοχή στην ινσουλίνη μειώνεται η ικανότητα της ινσουλίνης να ενεργοποιήσει αυτούς τους καταρράκτες αυτών γεγονότων. Ο τρόπος όμως με τον οποίο γίνεται η αρχική διαταραχή κατά τη μεταγωγή του σήματος παραμένει ασαφής (Youngren J. F. 2007).



Εικόνα 4: Το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης. Η σύνδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της οδηγεί σε αυτοφωσφορυλίωση των β-υπομονάδων και την φωσφορυλίωση του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS) και άλλων ενδιάμεσων σηματοδοτικών μορίων όπως η Shc σε κατάλοιπα τυροσίνης. Τα φωσφορυλιωμένα πρωτεϊνικά υποστρώματα IRS χρησιμεύουν πως πρωτεΐνες αγκυροβόλησης (docking proteins) για δευτερογενή μηνύματα. Η σύνδεση της PI-3 κινάσης (PI3K) μέσω των επικρατειών SH2 στις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες του IRS οδηγεί στην ενεργοποίηση της. Η δράση της PI3K οδηγεί στην παραγωγή φωσφολιπιδίων της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης τα οποία ενεργοποιούν την PDK-1 και μεταγενέστερα την Akt/PKB. Το αποτέλεσμα του μονοπατιού αυτού είναι η μετατόπιση του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT4 από τα κυτταροπλασματικά κυστιδία στην μεμβράνη του κυττάρου ώστε να διευκολύνθει την μεταφορά της γλυκόζης. Η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού Ras/MAPK κατά κύριο λόγο διεγείρει μιτογόνες και καταβολικές διεργασίες, παρά τις μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης (Youngren J. F., 2007)

Σήμερα, η συνήθης προτεινόμενη φαρμακευτική αγωγή παγκοσμίως για την θεραπεία του ΣΔ2 βασίζεται σε έναν υπογλυκαιμικό διγουανιδικό (biguanide) παράγοντα που ονομάζεται μετφορμίνη (metformine). Ως κυτταρικές αποκρίσεις της μετφορμίνης έχουν αναφερθεί μεταξύ άλλων η αυξημένη δράση της κινάσης τυροσίνης (KA) του υποδοχέα της ινσουλίνης, μειωμένη γλυκονεογένεση στο ήπαρ, αναστολή της δραστηριότητας της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, πρόληψη υπερινσουλιναιμίας, βελτίωση της φυσιολογίας της κυτταρικής μεμβράνης, μείωση της ροής των ελεύθερων λιπαρών οξέων ενώ δεν παρατηρείται αλλαγή στη μετατόπιση και δράση των υποδοχέων GLUT λόγω δράσης IR-KA (Gunton J. E. et al., 2003). Η μετοφορμίνη ενεργοποιεί την κινάση που ενεργοποιείται από το AMP (AMP-activated protein kinase), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στη ενεργειακή ισορροπία του σώματος ρυθμίζοντας το μεταβολισμό των υδατανθράκων και το λιπιδίων μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της ινσουλίνης. Η μετοφορμίνη σε σύγκριση με άλλα φάρμακα που συνταγογραφούνται για τον ΣΔ2 παρέχει τη μεγαλύτερη προστασία έναντι της καρδιάς και έχει την ικανότητα να μειώνει τα ποσοστά της γλυκόζης στο αίμα χωρίς να προκαλεί εκτεταμένη υπογλυκαιμία. Επίσης η μετφορμίνη περιγράφεται και ως ευαισθητοποιητής της ινσουλίνης που οδηγεί στην μείωση της ανοχής στην ινσουλίνη και προκαλεί σημαντική μείωση των επιπέδων της ινσουλίνης νηστείας στο πλάσμα. Γνωστές παρενέργειες στη μετφορμίνη είναι η κοιλιακή δυσφορία, ναυτία, έμετος, διάρροια, δυσκοιλιότητα, μετεωρισμός, δυσπεψία και κάψιμο στην καρδιά (Mahmood K. et al., 2012; Viollet B. et al., 2012).

Με την πάροδο του χρόνου ο διαβητικός φαινότυπος, ακόμα και με φαρμακευτική αγωγή, μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές σε πολλούς ιστούς όπως η καρδιά, τα αιμοφόρα αγγεία, τα μάτια, τα νεφρά, τα νεύρα αλλά μπορεί να επηρεάσει και την υγεία των οστών (Yan W. et al., 2012).

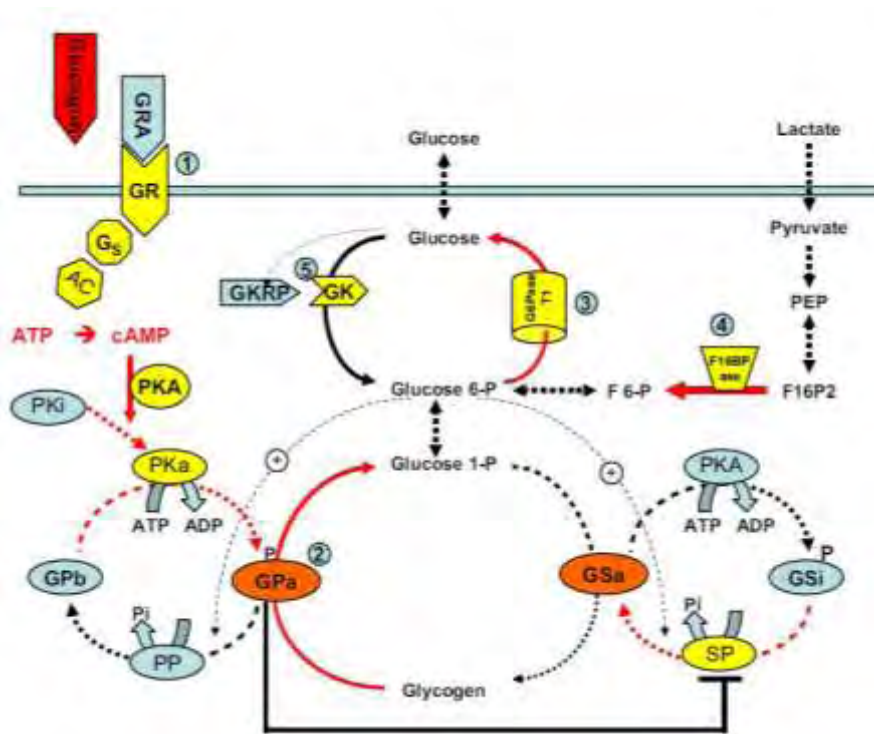
1.1.5 Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη είναι μια κύρια (αντί)-ρυθμιστική ορμόνη η οποία είναι υπεύθυνη για την διέγερση της παραγωγής της γλυκόζης από το ήπαρ. Η γλυκαγόνη προκαλεί αναστολή του μεταβολισμού της γλυκόζης προωθώντας την σύνθεση του γλυκογόνου, τη γλυκόλυση και η δράση της στοχεύει κυρίως το ήπαρ με λιγότερες επιδράσεις στην λιπόλυση στον λιπώδη ιστό. Η γλυκαγόνη προσδένεται στον υποδοχέα της και ενεργοποιεί μια σειρά ενδοκυτταρικών διαδικασιών που απεικονίζονται στην εικόνα 5 (Bollen M. et al., 1998). Η αύξηση των αμινοξέων του αίματος και η μυϊκή άσκηση διεγείρουν την έκκριση της γλυκαγόνης ενώ η αυξημένη γλυκόζη στο αίμα αναστέλλει την έκκριση της (Guyton and Hall, 2008).

1.1.6 Θεραπευτικοί στόχοι για ΣΔ2 (Ηπατικοί στόχοι)

Διάφορες φαρμακευτικές εταιρείες έχουν προγράμματα που σχετίζονται με ανακάλυψη φαρμάκων που απευθύνονται σε νέους ηπατικούς στόχους. Μεταξύ άλλων περιλαμβάνονται ο υποδοχέας της γλυκαγόνης (GR), ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, τα ένζυμα της γλυκονεογένεσης ή της γλυκογονόλυσης, και η γλυκοκινάση. Στην εικόνα 5

αποτυπώνονται οι ηπατικοί στόχοι που βρίσκονται σε επίκεντρο των προγραμμάτων ανακάλυψης νέων φαρμάκων (Agius L., 2007).



Εικόνα 5: Ηπατικοί στόχοι για αντι-υπεργλυκαιμικά φάρμακα **1** Ο υποδοχέας της γλυκαγόνης (GR): Η πρόσδεση της γλυκαγόνης στον υποδοχέα της ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση (AC) με σύζευξη του Gs (λογικά εννοεί το s από τον GPCR). Το cAMP ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) η οποία με τη σειρά της μετατρέπει την κινάση της φωσφορυλάσης (PK) από μία μη ενεργή (i) σε μια ενεργή (a) κατάσταση. Η PK ενεργοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) μετατρέποντας μέσω με φωσφορυλίωσης την μη ενεργή μορφή (GPb) στην ενεργή μορφή (GPa). Η αντίθετη διαδικασία καταλύεται από την φωσφατάση της φωσφορυλάσης (PP). **2** Η GPa καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου σε 1 φωσφορική γλυκόζη και είναι επίσης ισχυρός αναστολέας της φωσφατάσης της συνθάσης του γλυκογόνου (GSP) η οποία μετατρέπει την συνθάση του γλυκογόνου (GS) από την λιγότερο ενεργή (i) στην πιο ενεργή (a) μορφή. Η 1 φωσφορική γλυκόζη που σχηματίζεται από την γλυκογονόλυση μετατρέπεται σε 6 φωσφορική γλυκόζη και έπειτα σε γλυκόζη μέσω της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης?? **3** Η γλυκονογένεση από το λακτικό και άλλους 3-καρβονικούς (ανθρακικούς) προγόνους αποτελεί μια εναλλακτική πηγή 6-φωσφορικής γλυκόζης. **4** Η φωσφατάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης (F16BPase) καταλύει την προτελευταία αντίδραση στη γλυκονογένεση δίνοντας 6-φωσφορική γλυκόζη. **5** Σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης, η γλυκόζη προκαλεί ενεργοποίηση της γλυκοκινάσης (GK) μέσω διάσπασης της ανασταλτικής της πρωτεΐνης (GKRP). Η GK καταλύει την φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Η 6-φωσφορική γλυκόζη είναι ένας πρόδρομο μόριο (πρόγονος) της σύνθεσης του γλυκογόνου και ενεργοποιεί την συνθάση του γλυκογόνου και απενεργοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου προωθώντας την αποφωσφορυλίωση της GSi και της GPa (Agius L., 2007).

2. Βασικές γνώσεις

2.1 Γλυκόζη

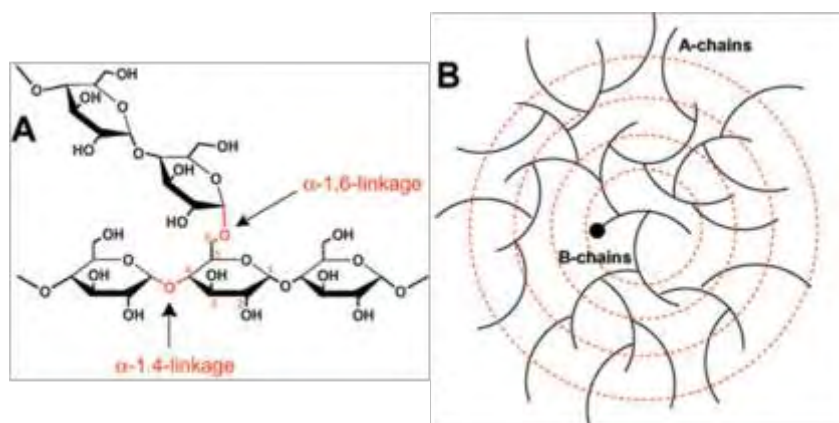
Η γλυκόζη αποτελεί πολύ σημαντική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα και η μεταφορά της στο εσωτερικό τους γίνεται μέσω της ινσουλίνης που υπάρχει στην κυκλοφορία του αίματος. Το ανθρώπινο σώμα ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης σε συγκέντρωση 4-8mM (70-120mg dL⁻¹). Όταν υπάρχει κάποια φυσιοπαθολογική κατάσταση τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα θα μπορούσαν να κυμαίνονται σε 2-30mM (30-500mg dL⁻¹) (Scognamiglio V., 2013). Ωστόσο είναι απαραίτητο η γλυκόζη στο αίμα να μη

ξεπερνά τα φυσιολογικά επίπεδα για τέσσερις λόγους: Πρώτον, η γλυκόζη ασκεί αρκετά μεγάλη ωσμωτική πίεση στο εξωκυττάριο υγρό και εάν η συγκέντρωση της βρίσκεται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα, τότε αυτό μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικού βαθμού αφυδάτωση των κυττάρων. Δεύτερον, τα υψηλά επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα οδηγούν σε απώλεια της γλυκόζης με τα ούρα. Τρίτον, αυτό προκαλεί ωσμωτική διούρηση με τους νεφρούς, γεγονός που μπορεί να εξαντλήσει τα υγρά και τους ηλεκτρολύτες του σώματος. Τέταρτον, οι μακροπρόθεσμες αυξήσεις της γλυκόζης του αίματος μπορούν να οδηγήσουν σε πολλές ιστικές βλάβες και ιδιαίτερα στα αιμοφόρα αγγεία. Η αγγειοπάθεια σχετίζεται με τον ανεξέλεγκτο σακχαρώδη διαβήτη και οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση εγκεφαλικού επεισοδίου, καρδιακής προσβολής, νεφροπάθειας τελικού σταδίου και τύφλωσης (Guyton and Hall, 2008)

2.2 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές της γλυκόζης και χρησιμοποιείται από πολυάριθμους οργανισμούς ως αποθήκη όταν η γλυκόζη είναι άφθονη ή ως πηγή γλυκόζης κάτω από συνθήκες μεταβολικής εξάντλησης. Η δομή του γλυκογόνου είναι κατάλληλη να αποθηκεύει μεγάλα ποσά γλυκόζης, τα οποία μπορούν να γίνουν άμεσα διαθέσιμα, χωρίς να επηρεάζεται η κυτταρική ωσμωτικότητα. Στα θηλαστικά οι σκελετικοί μύες αποτελούν την κύρια θέση διάθεσης της γλυκόζης αποθηκεύοντας στο σύνολο τους περισσότερο γλυκογόνο σε σχέση με το ήπαρ (Palm D. C. et al., 2013).

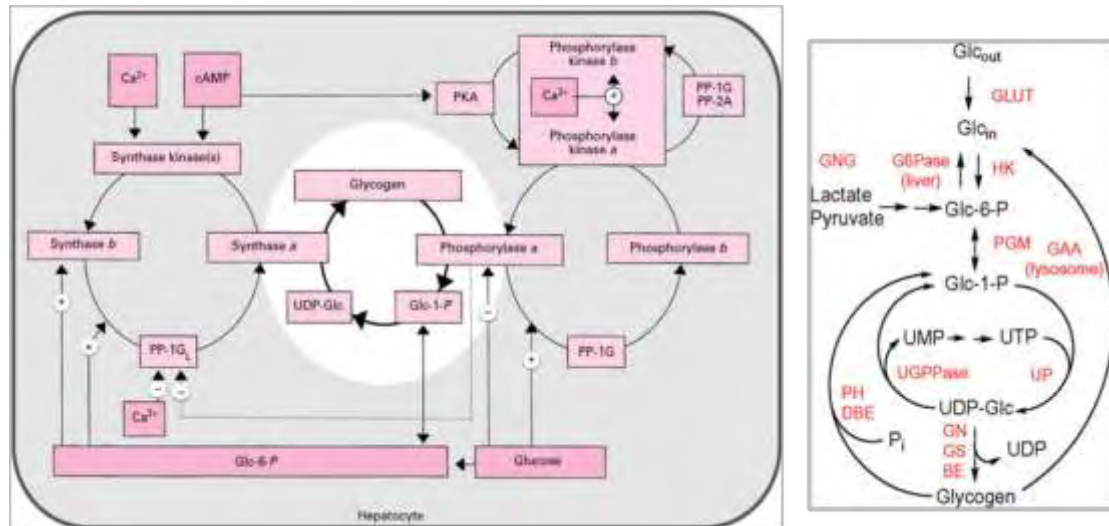
Ο πρωταρχικός πολυμερισμός γλυκογόνου παρέχεται από α -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των υπολειμμάτων της γλυκόζης: διακλαδώσεις εισάγονται από α -1,6-γλυκοσιδικούς δεσμούς όπως φαίνεται στην εικόνα 6. Ένα καλά αποδεκτό μοντέλο της δομής του γλυκογόνου κατηγοριοποιεί τις αλυσίδες ως εσωτερικές Β-αλυσίδες, οι οποίες περιέχουν συνήθως δύο διακλαδώσεις, και εξωτερικές Α-αλυσίδες, οι οποίες είναι μη διακλαδισμένες.



Εικόνα 6: (A) Παρατηρείται ο πολυμερισμός α -1,4-γλυκοσιδικών δεσμών και μια διακλάδωση α -1,6-γλυκοσιδικών δεσμών. (B) Το κλιμακωτό μοντέλο της οργάνωσης του γλυκογόνου στο οποίο οι εσωτερικές β-αλυσίδες κατά μέσο όρο φέρουν δύο διακλαδώσεις και οι εξωτερικές α -αλυσίδες δεν έχουν διακλαδώσεις (Roach P. J. et al., 2012).

Ο άμεσος δότης γλυκόζης για την σύνθεση του γλυκογόνου είναι η ενεργοποιημένη UDP γλυκόζη. Το γλυκογόνο παράγεται από φωσφορυλίωση της UDP γλυκόζης εις βάρος της μετατροπής UTP σε UDP όπως φαίνεται στην εικόνα 7. Στα ευκαρυωτικά

κύτταρα η συνθάση του γλυκογόνου είναι υπεύθυνη για το μεγαλύτερο μέρος της σύνθεσης του γλυκογόνου σχηματίζοντας τους α-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς χρησιμοποιώντας την UDP γλυκόζη ως δότη γλυκοζυλίου. Η συνθάση του γλυκογόνου στους ευκαρυώτες ενεργοποιείται αλλοστερικά από την 6-φωσφορική γλυκόζη και ρυθμίζεται αρνητικά με ομοιοπολική φωσφορυλίωση. Η παρουσία της 6-φωσφορικής γλυκόζης υπερνικά την απενεργοποίηση που οφείλεται στη φωσφορυλίωση και το ένζυμο μπορεί να επανακτήσει πλήρως την δραστηριότητα του (Roach P. J. et al., 2012).



Εικόνα 7: Επισκόπηση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. PKA πρωτεϊνική κινάση A, Glc-1-P 1-φωσφορική γλυκόζη, Glc-6-P 6-φωσφορική γλυκόζη, UDP-Glc UDP γλυκόζη, Glc_{out} εξωκυτταρική γλυκόζη, Glc_{in} ενδοκυτταρική γλυκόζη, HK εξοκινάση, G6Pase φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, PGM φωσφογλυκομουτάση, UP φωσφορυλάση της UDP γλυκόζης, UGPPase φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, GN γλυκογενίνη, GS συνθάση του γλυκογόνου, BE ένζυμο που δημιουργεί διακλαδώσεις (BE, branching enzyme), PH φωσφορυλάση του γλυκογόνου, DBE debranching enzyme, GAA λυσοσωμική α-γλυκοσιδάση, GNG γλυκονεογένεση (Bollen M. et al., 1998; Roach P. J. et al., 2012).

2.3 Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Το ένζυμο κλειδί για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου στους σκελετικούς ιστούς είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (EC 2.4.1.1.). Η φωσφορυλάση καταλύει το πρώτο βήμα του μονοπατιού της αποικοδόμησης του γλυκογόνου. Η αντίδραση που καταλύεται από τον ένζυμο είναι η εξής:



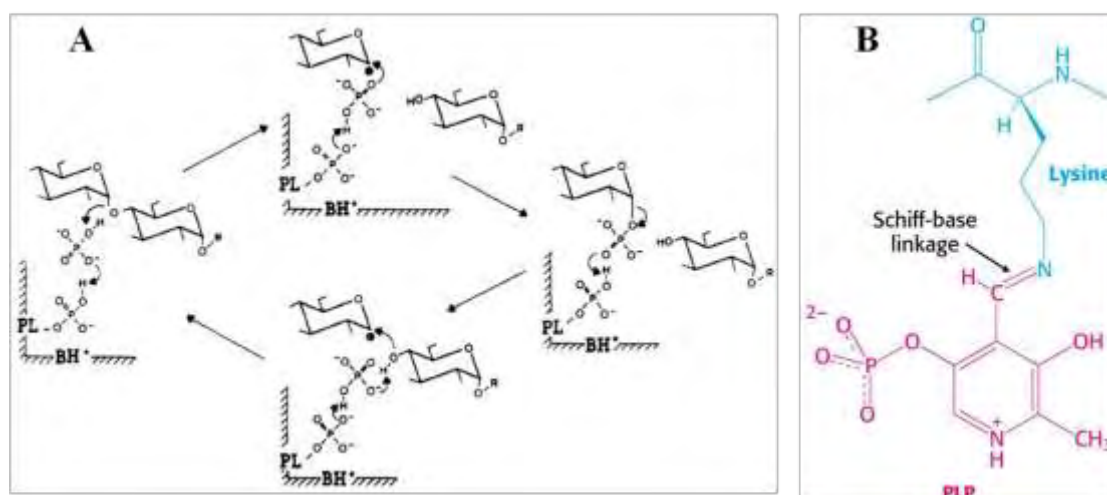
Όπου n ο αριθμός των κατάλοιπων της γλυκόζης. Η φωσφορυλυτική διάσπαση των α-1,4-γλυκοσιδικών δεσμών προχωρά από τα μη αναγωγικά άκρα της αλυσίδας του γλυκογόνου και η φωσφορυλάση επεκτείνει τη διάσπαση μέχρι το τέταρτο κατάλοιπο από το σημείο διακλάδωσης. Η αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση είναι αντιστρέψιμη και το λόγος της ισορροπίας των συγκεντρώσεων $\frac{[1\text{-φωσφορική γλυκόζη}]}{[\text{P}_i]}$ είναι 0.28 σε pH 6.8 (Livanova N. B. 2002).

Επειδή το σάκχαρο που προκύπτει από την αντίδραση της φωσφορυλάσης είναι φωσφορυλιωμένο δεν χρειάζεται επιπλέον φωσφορυλίωση για να εισέλθει στη

γλυκολυτική πορεία, κάτι που θα γινόταν αν το ένζυμο κατέλυε υδρολυτική διάσπαση. Σε μια τέτοια περίπτωση θα προέκυπτε γλυκόζη η οποία θα χρειαζόταν να φωσφορυλιωθεί, καταναλώνοντας ένα μόριο ATP, για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Επομένως η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά έναντι υδρολυτικής διάσπασης. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της 1-φωσφορικής γλυκόζης, σε αντίθεση με την γλυκόζη, είναι ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες ιονίζεται μέσα στα κύτταρα των μυών και δεν μπορεί να διαχυθεί προς το εξωτερικό του κυττάρου (Stryer L. et al., 2002).

2.4 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης

Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση 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. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. 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 (οξοκαρβονιόν), όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη (Stryer L. et al., 2002).



Εικόνα 8: **A)** Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η PLP συμμετέχει στην ενζυμική αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου **b.** Το σχήμα της αντίδρασης δείχνει την ανατρεψιμότητα της φωσφορύλωσης των ολιγοσακχαριτών (R) παρουσία ορθοφωσφορικού (πάνω μισό) και την σύνθεση παρουσία 1-φωσφορικής γλυκόζης που εξαρτάται από τον εκκινητή (κάτω μισό). PL = ένζυμο που συνδέει πυριδοξάλη, BH⁺ = πρωτονιώσιμη γενική βάση που προσφέρεται από το πρωτεϊνικό ένζυμο (Livanova N. B. 2002; Palm D., 1990). **B)** Δεσμός βάσης Schiff που σχηματίζει η PLP. Η PLP (κόκκινο χρώμα) σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (μπλε χρώμα) στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Stryer L. et al., 2002).

Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και είναι απαραίτητος συμπαράγοντας για την δραστικότητα του ενζύμου. Η αλδεϋδική ομάδα της PLP συνδέεται ως βάση Schiff με την λυσίνη 680 (Lys680), όπως φαίνεται στην εικόνα 8B. Στην εικόνα 8A φαίνεται η συμμετοχή της PLP στην αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου b και. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 8A η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP λειτουργεί υπό μορφή διανιόντος ως δότης-δέκτης πρωτονίων σύμφωνα με το γενικό σχήμα της οξεοβασικής κατάλυσης. Όταν η αντίδραση προχωράει τα εμπρός (φωσφορόλυση α-1,4 γλυκοσιδικού δεσμού), το πρώτο βήμα είναι η πρωτονίωση του οξυγόνου του γλυκοσιδίου από ορθοφωσφορικό. Η επακόλουθη ομοιοπολική πρόσδεση του φωσφορικού προκαλεί τη διαμόρφωση της 1 φωσφορικής γλυκόζης. Όταν η αντίδραση προωθείται προς την αντίθετη πλευρά (σύνθεση των ολιγοσακχαριτών) η πρωτονίωση της φωσφορικής ομάδας της 1-φωσφορικής γλυκόζης αποσταθεροποιεί τον γλυκοσιδικό δεσμό και αυτό ευνοεί τον σχηματισμό του ζεύγους γλυκοσυλοξοκαρβονίδιακό ιόν-φωσφορικό ανιόν. Το φωσφορικό ανιόν διευκολύνει ουσιαστικά την πυρηνόφιλη προσβολή του τελευταίου κατάλοιπου του γλυκοσιδίου στο καρβονικό ιόν. Αυτή η αλληλουχία γεγονότων προκαλεί τον σχηματισμό του α-1,4-γλυκοσιδικού δεσμού και αύξηση του αριθμού των γλυκοσιδικών κατάλοιπων στον αρχικό ολιγοσακχαρίτη (Livanova N. B. 2002; Palm D., 1990).

3. Η Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

3.1 Γενικά

Όπως αναφέρθηκε η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ένζυμο του μεταβολισμού του γλυκογόνου στα κύτταρα, το οποίο εντοπίζεται στο σαρκοπλασματικό δίκτυο όπου καταλύει το πρώτο βήμα της γλυκογονόλυσης. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου εντοπίζεται σε διάφορους ιστούς και ταξινομείται σε τρεις ισομορφές (Lillropp L. et al., 2012). Οι τρεις αυτές ισομορφές είναι προϊόντα διαφορετικών γονιδίων και η αμινοξική τους αλληλουχία είναι πανομοιότυπη κατά 80-83% (Coats W. S. 1991):

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών (GPMM): Η ισομορφή αυτή υπάρχει στους σκελετικούς μύες και στην καρδιά

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του ήπατος (GPLL): Αρχικά βρέθηκε στο ήπαρ αλλά βρίσκεται παντού εκτός από τον εγκέφαλο, τους σκελετικούς μύες, τα μυοκύτταρα της καρδιάς και τον εγκέφαλο. Αυτή η ισομορφή της φωσφορυλάσης έχει ομοιοστατικό ρόλο καθώς ρυθμίζει την απελευθέρωση της γλυκόζης (Stryer L. et al., 2002).

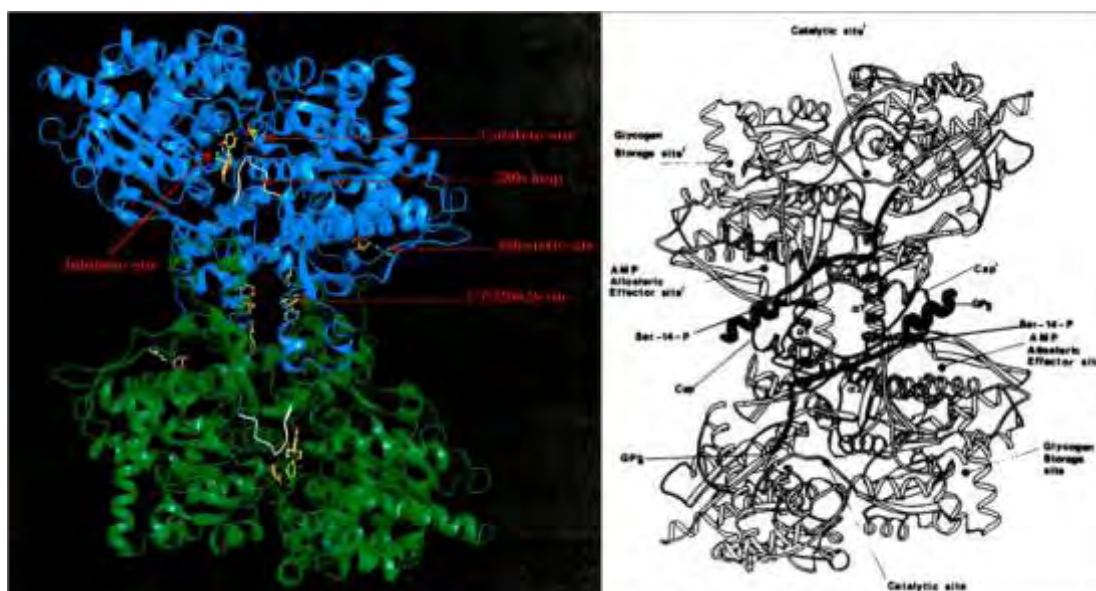
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου (GPBB): Εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον ιστό του εγκεφάλου και στα μυοκύτταρα της καρδιάς.

Σε περίπτωση υποξίας ή ισχαιμίας κάποιου ιστού η γλυκογονόλυση ξεκινά με την μετατροπή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στη πιο δραστική, διαλυτή και κυτοπλασματική της μορφή, από την κινάση της φωσφορυλάσης. Καθώς η διαπερατότητα της μεμβράνης αυξάνεται κατά την υποξία μια υψηλή βαθμίδωση συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης στο σαρκοπλασματικό δίκτυο επιτρέπει την εκροή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στην κυκλοφορία του αίματος. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι εφόσον η GPBB υπάρχει στον καρδιακό μυ, μια αυξημένη συγκέντρωση της φωσφορυλάσης στο πλάσμα του αίματος κατά την ισχαιμία δείχνει ότι η GPBB είναι υποκατάστατος δείκτης για τις οξείες στεφανιαίες νόσους (Lee J. et al., 2012). Η απελευθέρωση της διαλύτης GPBB στην κυκλοφορία του αίματος γίνεται γρήγορα με τα επίπεδα της GPBB στο πλάσμα να αυξάνονται κατά τις πρώτες ώρες με την έναρξη του πόνου στο στήθος. Ωστόσο μελέτες σχετικά με την χρησιμότητα της GPBB στη διάγνωση είναι σπάνιες ενώ παράλληλα έχουν παραχθεί αντιφατικά αποτελέσματα και δεν υπάρχουν μελέτες που να συγκρίνουν την ευαισθησία της GPBB σε σχέση με την ευαισθησία προς τη δοκιμασία της τροπονίνης. Επίσης δεν υπάρχουν δεδομένα σε ότι αφορά την προγνωστική αξία της GPBB για την αξιολόγηση της επικινδυνότητας των ασθενών με υποψία οξέος στεφανιαίου συνδρόμου (Lillpop L. et al., 2012).

3.2 Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα διμερές το οποίο αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες και μοριακό της βάρος είναι 97,444 *KDa* (842 αμινοξέα). Αποτελείται επίσης από έναν απαραίτητο παράγοντα, την φωσφορική πυριδοξάλη, η οποία συνδέεται σε κάθε υπομονάδα μέσω μια βάσης *Schiff* με την λυσίνη 680 (Johnson L. N. 1992). Ο μηχανισμός δράσης της φωσφορικής πυριδοξάλης έχει αναφερθεί εκτενώς στο εδάφιο §2.4. Η κρυσταλλική δομή της GP_a και της GP_b (*T* και *R* διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 από τους Barford & Johnson. Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά ύδατος (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Και 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 κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60x60x55 Å. Η GP είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες 3₁₀ μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια π έλικα μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται μόνο από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων γίνεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές περιοχές που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα

36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (*cap*) και πύργος (*tower*) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόχος 280 (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18). Στην εικόνα 9 αποτυπώνεται η δομή της μυικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μαζί με τις ρυθμιστικές περιοχές και στην εικόνα 10 ένα σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου περιέχει τουλάχιστον πέντε πιθανές ρυθμιστικές περιοχές, αυτές είναι: Η θέση αναγνώρισης για την φωσφορυλιωμένη σερίνη 14 (*Ser14-phosphate*), τα αλλοστερικά κέντρα ενεργοποίησης και αναστολής για το AMP και την 6-φωσφορική γλυκόζη αντίστοιχα, το καταλυτικό κέντρο όπου προσδένεται η γλυκόζη και η 1-φωσφορική γλυκόζη, το κέντρο της αποθήκης του γλυκογόνου και το κέντρο αναστολής όπου προσδένεται η καφεΐνη και σχετικές ενώσεις, το οποίο απέχει 12 Å από το καταλυτικό κέντρο. Το 2000 οι *Oikonomakos N. G. et al.*, βρήκαν ότι το πιθανό αντιδαβητικό φάρμακο CP320626 προσδένεται σε μια νέα αλλοστερική θέση που βρίσκεται στην διεπαφή του διμερούς και δεν έχει χαρακτηριστεί νωρίτερα (*Oikonomakos N. G., Skamnaki V. T. et al., 2000; Oikonomakos N. G. et al., 1992*).

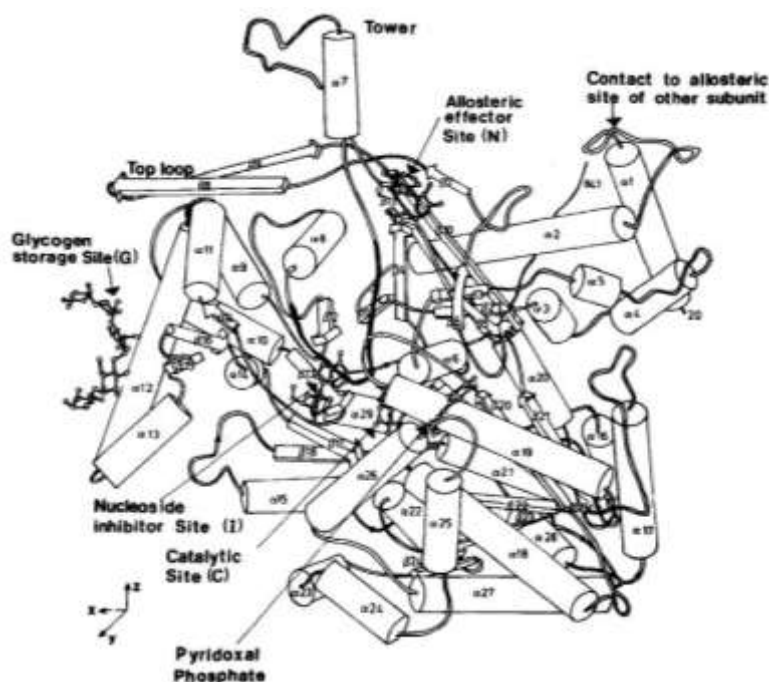


Εικόνα 9: Αριστερά φαίνεται η τρισδιάστατη δομή του διμερούς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου κάτω από τον δυαδικό άξονα συμμετρίας όπου φαίνονται τα πιθανά κέντρα ρύθμισης του ενζύμου. Επίσης υποδεικνύεται η θέση του βρόχου 280S (*Oikonomakos N. G., Schnier J. B., et al., 2000*). Δεξιά φαίνεται ένα σχηματικό διάγραμμα του διμερούς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου κάτω από τον δυαδικό άξονα με τα αλλοστερικά κέντρα και τις θέσεις των φωσφορυλιωμένων σερινών προς τον παρατηρητή. Τα αμινοξικά κατάλοιπα 10-23 εμφανίζονται ως μια παχιά γραμμή. Μετά την φωσφορυλίωση τα κατάλοιπα αυτά αλλάζουν διαμόρφωση και εμφανίζονται με μια σκούρα διαγράμμιση δείχνοντας τη θέση της *Ser14-P* στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η αναδίπλωση των καταλοίπων 24-80 μέσω της $\alpha 1$ έλικας, της περιοχής *cap* και της $\alpha 2$ έλικας φαίνεται με ελαφριές διασταυρώσεις (*light crosses*). Η περιοχή αποθήκευσης του γλυκογόνου βρίσκεται στην επιφάνεια της υπομονάδας και σχετίζεται (συνδέεται-*associated*) με μια μακριά α -έλικα. Το AMP συνδέεται στην αλλοστερική περιοχή η οποία βρίσκεται μεταξύ της $\alpha 2$ έλικας και της περιοχής *cap* της άλλης υπομονάδας. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στο κέντρο της υπομονάδας όπου οι δυο υπομονάδες έρχονται σε επαφή (*Johnson L. N., 1992*).

Η θέση του αλλοστερικού τελεστή, όπου προσδένονται το AMP, IMP, ως αλλοστερικοί ενεργοποιητές και το ATP, 6-φωσφορική γλυκόζη ως αλλοστερικοί αναστολείς, βρίσκεται κοντά στη διεπαφή υπομονάδας-υπομονάδας και αξιοποιεί τα πρώτα 320 αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο. Το καταλυτικό κέντρο εντοπίστηκε από την σύνδεση της 1-φωσφορικής γλυκόζης, *heptenitol*, 2-φωσφορική *heptulose*

και περιέχει το συνένζυμο φωσφορική πυριδοξάλη. Το καταλυτικό κέντρο εντοπίζεται στο κέντρο του μορίου στη διεπαφή μεταξύ της περιοχής 1 (κατάλοιπα 1-484), που ονομάζεται ρυθμιστική και περιλαμβάνει επίσης το κέντρο φωσφορύλιωσης της *Ser14*, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του *AMP*, το αποθηκευτικό κέντρο, τις περιοχές πύργος, και το επικάλυμμα, και της περιοχής 2 (κατάλοιπα 485-842), που ονομάζεται καταλυτική και περιλαμβάνει επίσης το κέντρο αναστολής και την *PLP*. Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται περίπου 3.2nm από το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο του αναστολέα, όπου προσδένονται νουκλεοζίτες, καφεΐνη και άλλες σχετικές ενώσεις, τοποθετείται περίπου 1.2nm από το καταλυτικό κέντρο και στην κατάσταση *T* εμποδίζει την είσοδο στο καταλυτικό κέντρο. Η περιοχή αποθήκευσης του γλυκογόνου, η οποία είναι επίσης μια θέση ενεργοποιητή, βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, περίπου 3nm από το καταλυτικό κέντρο και 3.9nm από το αλλοστερικό κέντρο (*Oikonomakos N. G. et al., 1988; Fletterick R. J., 1980*).

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπάρχει σε αλληλομετατροπούμενες μορφές, την φωσφορυλάση του γλυκογόνου *b* (*GPb*), που έχει χαμηλή δραστηριότητα και χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα, και την φωσφορυλάση του γλυκογόνου *a* (*GPa*) η οποία έχει υψηλή δραστηριότητα και υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα. Η ενεργή φωσφορυλάση του γλυκογόνου μπορεί να πάρει δύο διαφορετικές μορφές, την ανενεργή μορφή *T* και την ενεργή μορφή *R* (*Tsitsanou K. E. et al., 2013*). Η μετατροπή της *GP* από την ανενεργή μορφή *b* στην ενεργή μορφή *a* γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης στη *Ser14* από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί από γλυκαγόνη και άλλες ορμόνες που αυξάνουν το *cAMP* και/ή το κυτταρικό ασβέστιο. Η δ-υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης είναι πανομοιότυπη με την καλμοδουλίνη και παρέχει στην κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου την δυνατότητα να ενεργοποιηθεί το Ca^{2+} . Αντίθετα με τα περισσότερα ένζυμα που ρυθμίζονται από καλμοδουλίνη, η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου διατηρεί την δ-υπομονάδα της ακόμα και απουσία Ca^{2+} . Η μετατροπή της *GPa* σε *GPb*, η οποία ενεργοποιείται από την ινσουλίνη, καταλύεται από την φωσφατάση της φωσφορυλάσης (*Bollen M. et al., 1998; Agius L. et al., 2007*), όπως φαίνεται και στην εικόνα 7.



Εικόνα 10: Σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της GP. Οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που αντιστοιχούν στην α1 έλικα, στην περιοχή επικαλύμματος, στην αρχή της α2 έλικας και στην έλικα της περιοχής πύργος, ο βρόχος 280s και η αρχή της α8 έλικας μαζί με τον βρόχο που συνδέει τις διαμορφώσεις β7 και β8 είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Η PLP είναι εγκλωβισμένη στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένη με τη Lys680 της α21 έλικας. Το καταλυτικό κέντρο, που φαίνεται στο σχήμα μαζί με την GIP, βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο περιβάλλον διαλύτης έχει πρόσβαση σ' αυτό μέσω ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å. Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με το AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, μεταξύ της α2 και της α8 έλικας. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, συνδέεται με την α12 έλικα και είναι στην επιφάνεια του ενζύμου μακριά από το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο του νουκλεοζιτικού αναστολέα βρίσκεται στην είσοδο του καναλιού του καταλυτικού κέντρου. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτιδία που συνδέονται σε αυτό το κέντρο δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας. Η κατάληψη αυτού του κέντρου σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου (Oikonomakos N. G. et al., 1988 για την εικόνα. Για το κείμενο;).

3.3 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

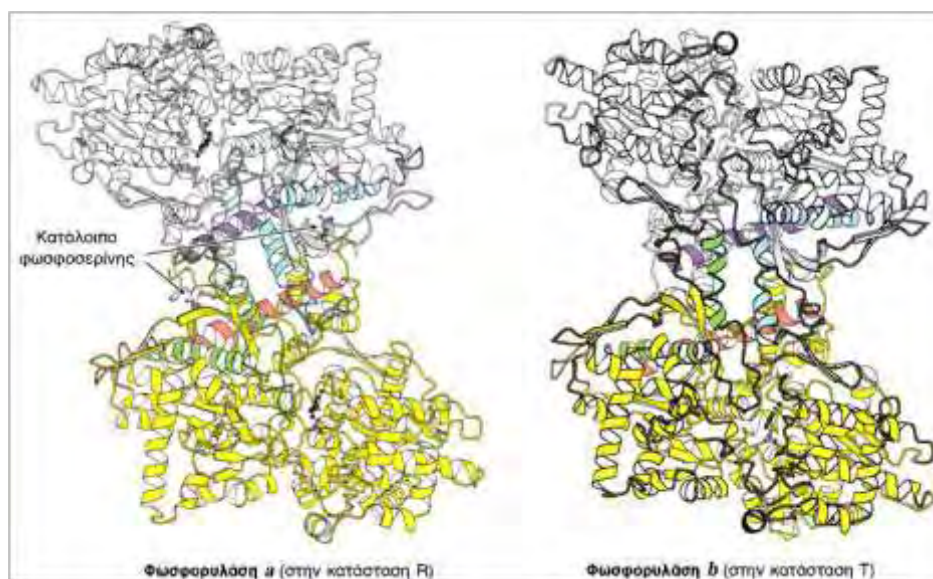
Σε πολλά ολιγομερή ένζυμα παρατηρείται το φαινόμενο της *συνέργειας* (*cooperativity*), κατά το οποίο η δέσμευση ενός μορίου-δεσμευτή σε μια περιοχή δεσμεύσεως επηρεάζει τη συγγένεια κάποιας άλλης θέσης δεσμεύσεως του ενζύμου για τον δεσμευτή, κάτι το οποίο προϋποθέτει την δυνατότητα επικοινωνίας μεταξύ των περιοχών δέσμευσης. Η δραστηριότητα των ενζύμων μπορεί να ελεγχθεί από διάφορους μεταβολίτες οι οποίοι (έχουν ελάχιστη ή καμία ομοιότητα με τα υποστρώματα) δεν έχουν κάποια άμεση αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα ή τα προϊόντα των αντιδράσεων που καταλύονται από τα αντίστοιχα ένζυμα. Η επίδραση αυτών των μεταβολιτών στην λειτουργία του ενζύμου φαίνεται να προκύπτει από μια αλλοστερική μετάπτωση (διαμορφωτική μεταβολή) η οποία επάγεται όταν δεσμευτεί στην πρωτεΐνη ο κατάλληλος παράγοντας. Πιθανότατα η φωσφορυλάση *b* του γλυκογόνου αποτελεί το πρώτο αλλοστερικό ένζυμο του οποίου ανακαλύφθηκε ο μηχανισμός με λεπτομέρεια. Η φωσφορυλάση *b* είναι ανενεργή απουσία 5'-AMP και ενεργοποιείται παρουσία του (Monod J. et al., 1963). Ο αλλοστερικός τροποποιητής επηρεάζει την λειτουργία του ενζύμου μεταβάλλοντας και όχι καταστρέφοντας τη δομή του. Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε ομότροπες

και ετερότροπες. Οι ομότροπες αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται μεταξύ πανομοιότυπων προσδετών ενώ οι ετερότροπες μεταξύ διαφορετικών προσδετών. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων συνδέονται με τέτοιο τρόπο ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις, δηλαδή, το μόριο να έχει έναν τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές απαντάται σε δυο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την *T* μορφή (χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα) και τη *R* μορφή (υψηλή συγγένεια για το υπόστρωμα), οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία που καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά *L* η οποία είναι ίση με $\frac{[T]}{[R]}$. Υπό αυτή την έννοια διακρίνονται δύο ήδη αλλοστερισμού, ο αρνητικός αλλοστερισμός και ο θετικός αλλοστερισμός. Η συμμετρία στα μονομερή διατηρείται κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής μετάπτωσης από τη μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγένειά τους με συγκεκριμένους υποκαταστάτες μεταβάλλεται. Η σύνδεση του υποστρώματος σε οποιοδήποτε μονομερές δεν επηρεάζει κατά κανένα τρόπο την σύνδεσή του στα υπόλοιπα μονομερή (δηλαδή οι μικροσκοπικές σταθερές διάστασης στα σύμπλοκα μεταξύ μονομερών *T* ή *R* διαμόρφωσης και υποστρώματος είναι αντίστοιχα ίδιες). Η σύνδεση ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη στη θέση του μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων με αποτέλεσμα την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές (αλλοστερικές) αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο ερμηνεύονται με βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας προς την κατεύθυνση της *R* διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα (Monod J. et al., 1965; Monod J et al., 1963; Κλώνης Ι. 2007).

Τα αλλοστερικά ένζυμα συχνά εμφανίζουν σιγμοειδείς γραφικές παραστάσεις της ταχύτητας της αντίδρασης V_0 σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος παρά ορθογώνιες υπερβολές που προβλέπονται από την εξίσωση *Michaelis-Menten*. Η σιγμοειδής καμπύλη μπορεί να αναπαραστεί ως μια σύνθεση δύο καμπυλών *Michaelis-Menten*, μια που αντιστοιχεί στην κατάσταση *T* και μια που αντιστοιχεί στην κατάσταση *R*. Μια άυξηση στη συγκέντρωση του υποστρώματος ευνοεί τη μετάβαση από την καμπύλη της κατάστασης *T* στην καμπύλη της κατάστασης *R* (Stryer L. et al., 2002).

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Wyman και Changeux (*MWC*) και οι οποίοι περιέγραψαν τον αλλοστερισμό ως την συναγωνιστική αναστολή στα ένζυμα που παρουσιάζεται από μόρια με ελάχιστη ή καμία δομική ομοιότητα με το υπόστρωμα. Όταν συνδεθεί ο αλλοστερικός τροποποιητής στο ένζυμο, τότε μεταβάλλεται η ισορροπία που υπάρχει μεταξύ της λιγότερο δραστηκής μορφής *T* και της πιο δραστηκής μορφής *R* (Oikonomakos N. G., Schnier J. B. et al., 2000; Κλώνης Ι. 2007). Στην στερεοδιαμόρφωση *T* η πρόσβαση της μεταλύτερης ποσότητας του διαλύτη προς το καταλυτικό κέντρο είναι μπλοκαρισμένη κυρίως λόγω του βρόχου 280s (βρίσκεται στα κατάλοιπα 282-286 της αλυσίδας). Η πλευρική αλυσίδα της Asp283 κατευθύνεται προς το καταλυτικό κέντρο και συνδέεται με δύο μόρια νερού στην 5-φωσφορική ομάδα της φωσφορική πυριδοξάλης. Η ομάδα της γουανιδίνης της Arg569 είναι σχεδόν πλήρως

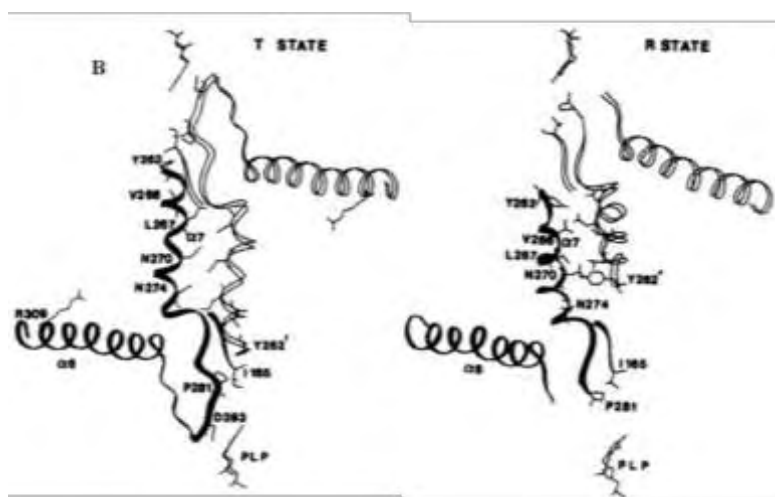
θαμμένη και η φορτισμένη της ομάδα αντισταθμίζεται μέσω δεσμών υδρογόνων που δημιουργούνται με τα καρβονυλικά οξυγόνα των αμινοξέων *Pro281*, *Asn133* και *Lys608*. Στην διαμόρφωση *R* υπάρχει ένα ιόν θείου το οποίο προσδέεται στη θέση αναγνώρισης. Ο βρόχος 280s μετατοπίζεται από το καταλυτικό κέντρο. Η *Arg569* καταλαμβάνει μια θέση η οποία βρίσκεται κοντά με εκείνη που ετέχει η *Asp283* στην διαμόρφωση *T* και η ανταλλαγή μεταξύ μιας όξινης και μιας βασικής ομάδας βοηθάει στην δημιουργία του κέντρου αναγνώρισης υψηλότερης συγγένειας ανιόντος (είτε για φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα, είτε για θειικό άλας). Οι αλλαγές στην *Arg569*, καθώς σπάνε οι επαφές που έχει στην *T* διαμόρφωση, με τα αμινοξέα *Ile165*, *Pro281*, και *Asn133*, σχετίζονται με τις αλλαγές στη διαμόρφωση αυτών των καταλοίπων έτσι ώστε οι αλλαγές στο καταλυτικό κέντρο να συνδέονται με τα γεγονότα της αλληλεπίδρασης πύργου/πύργου, και μέσω των αλλαγών στην τεταρτοταγή διαμόρφωση να σχετίζονται με τα γεγονότα αλληλεπίδρασης στο κέντρο φωσφορυλίωσης και στο κέντρο αναγνώρισης *AMP* (Johnson L. N. 1992). Στην εικόνα 11 φαίνεται η αλλαγή στη δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ενώ στην εικόνα 12 φαίνονται ειδικότερα οι αλλαγές που συμβαίνουν κατά την μετατροπή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από την στερεοδιαμόρφωση *T* στην στερεοδιαμόρφωση *R*.



Εικόνα 11: Δομή της φωσφορυλάσης *a* και της φωσφορυλάσης *b*. Η φωσφορυλάση *a* φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 14 κάθε υπομονάδας. Η τροποποίηση αυτή ευνοεί τη δομή της πλέον ενεργού κατάστασης *R*. Η μία υπομονάδα δείχνεται με λευκό, ενώ οι έλικες και οι θηλιές, που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση, με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα δείχνεται με κίτρινο και οι ρυθμιστικές δομές με πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν φωσφορυλιώνεται και υπάρχει κυρίως στην κατάσταση *T* (Stryer L. et al., 2002).

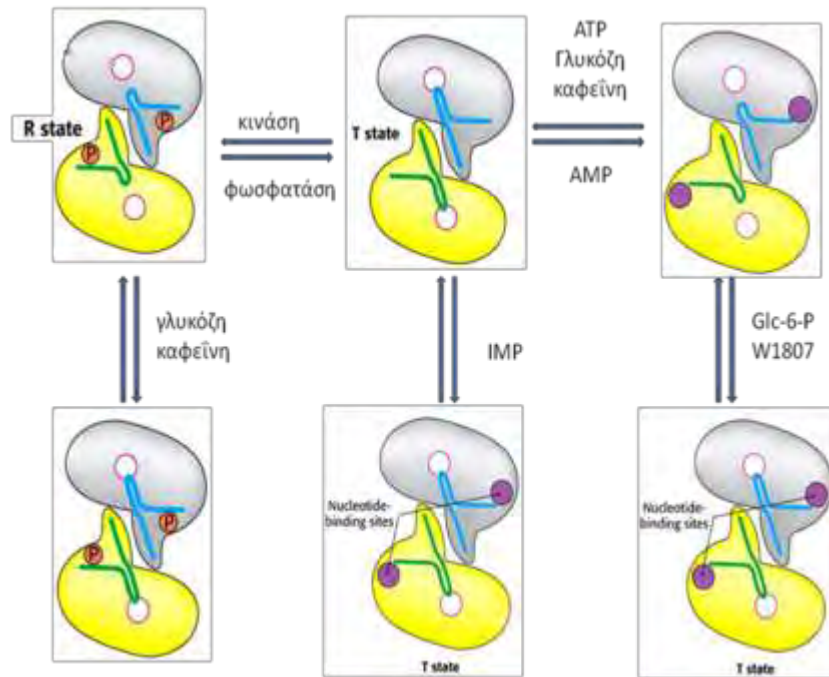
Οι αλλοστερικοί ενεργοποιητές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι το *AMP* και το *IMP*, ενώ οι αλλοστερικοί αναστολείς είναι το *ATP*, η 6-φωσφορική γλυκόζη και η *UDP* γλυκόζη. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης *b* από την κατάσταση *T* στην κατάσταση *R* και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Η 6-φωσφορική γλυκόζη, που είναι ένας ισχυρός αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b*, παράγεται συνεχώς στους μύες ως προϊόν της αντίδρασης φωσφορόλυσης, η 1-φωσφορική γλυκόζη από τη

φωσφογλυκομουτάση και εξασφαλίζει ότι η *GPb* θα παραμένει ανενεργή στους μύες (*Livanova N. B. 2002; Stryer L. et al., 2002*). Όταν μύες βρίσκονται σε ηρεμία η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπάρχει στην ανενεργή μορφή *GPb* η οποία μπορεί να ενεργοποιηθεί είτε από συνεργική μη ομοιοπολική πρόσδεση του *AMP* (ή του *IMP*) ή με ομοιοπολική φωσφορυλίωση προς σχηματισμό *GPa*. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου *a* δεν χρειάζεται *AMP* για να ενεργοποιηθεί, ωστόσο η προσθήκη *AMP* μπορεί να αυξήσει την δραστηριότητα του ένζυμου κατά 10-20%. Και οι δύο μορφές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μπορούν να υπάρχουν σε μια λιγότερο ενεργή μορφή *T* και σε μια περισσότερο ενεργή μορφή *R*. Οι αλλοστερικοί έλεγχοι στους οποίου υπόκειται η *GPa* διαφέρουν από αυτούς της *GPb* γιατί η δραστηριότητα δεν αναστέλεται πλέον αισθητά από το *ATP* ή την 6-φωσφορική γλυκόζη. Στην πραγματικότητα το *ATP* αναστέλλει την επιπλέον δραστηριότητα που προκαλείται από το *AMP*, ενώ η 6-φωσφορική γλυκόζη αναστέλλει το ένζυμο σε μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις (*Oikonomakos N. G. et al., 1999*)



Εικόνα 12: Οι αλλαγές που υφίστανται οι πύργοι από την κατάσταση *T* στην ενεργοποίηση της κατάστασης *R* στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου *b* (*Johnson L. N. 1992*).

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 *a*, αλλά όχι η *b* 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 *a* από την κατάσταση *R* στην *T* απενεργοποιώντας το ένζυμο. 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. Στην εικόνα 13 φαίνεται η ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης (*Stryer L. et al., 2002*).



Εικόνα 13: Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Stryer L. et al., 2002).

3.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

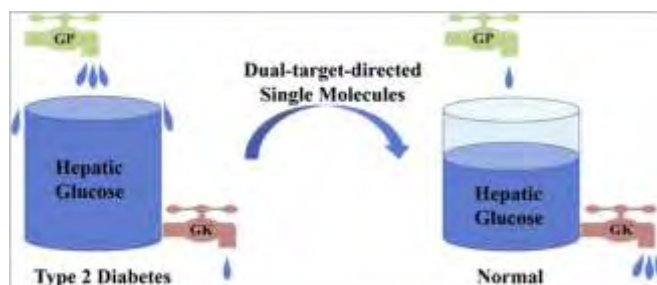
Τα επίπεδα της ηπατικής γλυκόζης επηρεάζονται από την γλυκογονόλυση και την γλυκονεογένεση. Μια σειρά μελετών έχουν προτείνει ότι στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 το περισσότερο από το 70% της ολικής ηπατικής παραγωγής της γλυκόζης οφείλεται στο σπάσιμο του γλυκογόνου. Επιπλέον η ανοχή στην ινσουλίνη επηρεάζεται επίσης από την ανικανότητα καταστολής της γλυκογονόλυσης (Kato et al., 2008). Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου λόγω του βασικού της ρόλου στη ρύθμιση του γλυκογόνου έχει αξιοποιηθεί ως μοριακός στόχος για τον σχεδιασμό ενώσεων που εμποδίζουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση, κάτω από συνθήκες υψηλής γλυκόζης, κάτι το οποίο μπορεί να σχετίζεται με τον έλεγχο του σακχαρώδους διαβήτη (Tsitsanou et al., 200). Γενικά έχουν αναφερθεί πολλοί αναστολείς έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου οι οποίοι στοχεύουν διαφορετικά κέντρα:

- Καταλυτικό κέντρο: Ανάλογα γλυκόζης που περιλαμβάνουν *N-acetyl-b-D-glucosamine* και τον δικυκλικό παράγοντα *glucopyranose spirohydantoin*
- Κέντρο πρόσδεσης του AMP
- Indole-carboxamide-site inhibitors
- Purine-nucleoside-site inhibitors

(Agius L., 2007)

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 φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με $K_i \approx 1 \mu M$, ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης (Witters L. A., Avruch J, 1978) στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου.

Ιδανική προσέγγιση θα αποτελούσε η εύρεση ενός μορίου με διπλή δράση το οποίο θα μπορεί να επιβραδύνει της εισροή της γλυκόζης από την γλυκογονόλυση και να επιταχύνει την εκροή της γλυκόζης στο ήπαρ, έτσι ώστε να επιτευχθεί καλύτερος έλεγχος της υπεργλυκαιμίας στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, όπως φαίνεται και στην εικόνα 14. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί με ενώσεις που θα μπορούν να αναστέλλουν την φωσφορυλάση του γλυκογόνου και να ενεργοποιούν την γλυκοκινάση (Zhang L., 2012).



Εικόνα 14: Ο διαβήτης τύπου 2 μπορεί να βελτιωθεί με μόρια τα οποία θα στοχεύουν ταυτόχρονα στην αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και στην ενεργοποίηση της γλυκοκινάσης (Zhang L., 2012).

3.5 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών ενώσεων που προέρχονται από φυτά

Τα περισσότερα από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα έχουν τις ρίζες τους στην αρχαιότητα μιας και από τότε μέχρι σήμερα τα φυσικά προϊόντα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Επομένως τα φυσικά προϊόντα μπορούν να βοηθήσουν στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Η ταυτοποίηση ενός φυσικού προϊόντος ως πιθανό φάρμακο μπορεί να οδηγήσει στην χρήση μεθόδων οργανική σύνθεσης που θα έχουν ως αποτέλεσμα δομικές τροποποιήσεις, οι οποίες θα οδηγήσουν στον σχεδιασμό ενώσεων με μεγαλύτερη θεραπευτική ικανότητα και εκλεκτικότητα έναντι ενός συγκεκριμένου στόχου. Σε ό,τι αφορά τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου ο προσδιορισμός ασφαλών και αποτελεσματικών φυσικών προϊόντων που έχουν τη δυνατότητα να βοηθούν στη ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα θα μπορούσε να οδηγήσει σε, πιθανά, μη συνταγογραφούμενα συμπληρώματα διατροφής (ή λειτουργικά τρόφιμα). Ορισμένα φυσικά προϊόντα έχουν δείξει κάποιο ανασταλτικό δυναμικό σε κινητικές μελέτες αλλά παραμένει άγνωστη η θέση πρόσδεσής τους στο ένζυμο (Hayes J. M., et al., 2014).

3.5.1 *Vitis vinifera* (σταφύλι)

Το σταφύλι (*vitis vinifera*), είναι μια από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες ανά τον κόσμο με το κρασί να αποτελεί μέρος της διατροφής των ανθρώπων από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα. Υπολογίζεται ότι η παγκόσμια παραγωγή σταφυλιών ανέρχεται πάνω από 60 εκατομμύρια τόνους. Τα τελευταία χρόνια τα εκχυλίσματα σταφυλιών και το κρασί αποτελούν μέρος πολλών μελετών σχετικά με τις ευεργετικές επιδράσεις που ενδέχεται να επιφέρουν στην ανθρώπινη υγεία (Apostolou A., et al., 2013). Τα φύλλα του φυτού είναι πλούσια σε τανίνες, флаβονοειδή, προκυανιδίνες καθώς και σε οργανικά οξέα, λιπίδια και βιταμίνες. Μολονότι η χημική σύσταση των

φύλλων του *Vitis vinifera* είναι γνωστή, οι μελέτες που διεξάγονται για τις βιολογικές επιδράσεις των φύλλων είναι λίγες. Επίσης, προς το παρόν δεν έχουν αξιολογηθεί οι αντι-υπεργλυκαιμικές και υπογλυκαιμικές επιδράσεις των φύλλων του *Vitis vinifera*. Οι *Nilüfer Orhan et al.*, έδειξαν ότι τα φύλλα του *Vitis vinifera* έχουν αντιδιαβητική δράση πιθανώς λόγω των συμπυκνωμένων τανινών και φλαβονοειδών που περιέχουν. Επομένως, η κατανάλωση των φύλλων του *Vitis vinifera* μέσω της τροφής, μιας και τα φύλλα αυτά είναι δημοφιλές συστατικό τροφίμων στην Ανατολία, είτε ως νωπά είτε ως μαριναρισμένα μπορεί να θεωρηθεί ως ασφαλής εναλλακτική ιατρική για τον έλεγχο των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα των διαβητικών (*Orhan N., et al., 2006*).

3.5.2 *Punica granatum L.* (Ρόδι)

Το ρόδι (*Punica granatum L.*) θεωρείται ως ένας από τους παλαιότερους καρπούς και αποτελεί το σύμβολο ευμάρειας και ευημερίας. Για χιλιάδες χρόνια πολλοί πολιτισμοί πίστευαν ότι το ρόδι προσφέρει ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία, τη γονιμότητα και τη μακροζωία. Το μεγάλο ενδιαφέρον που υπάρχει στις μέρες μας γύρω από το ρόδι οφείλεται από τη μία πλευρά στην ευχάριστη γεύση του και από την άλλη πλευρά στα επιστημονικά στοιχεία, που υποδηλώνουν θεραπευτικές δράσεις του ροδιού. Μερικές από τις δράσεις αυτές είναι αντιαθηρογόνες, αντιπαρασιτικές, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντικαρκινογόνες και αντιφλεγμονώδεις. Αυτά τα ευεργετικά αποτελέσματα αποδόθηκαν στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων του ροδιού, όπως είναι οι τανίνες και οι ανθοκυανίνες. Σήμερα, βρίσκονται σε εξέλιξη κλινικές δοκιμές ώστε να διερευνηθεί το θεραπευτικό δυναμικό των προϊόντων του ροδιού ιδίως προσδιορίζοντας την προληπτική δράση των εκχυλισμάτων ροδιού στον καρκίνο, στις καρδιαγγειακές παθήσεις, στη φλεγμονή, στο καρκίνο του δέρματος, και στο διαβήτη. Επιπλέον, η πιθανή χρήση των εκχυλισμάτων ροδιού ως θεραπεία ή ως επιπρόσθετο της θεραπείας στην πρόληψη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η αρτηριοσκλήρωση, η φλεγμονή, η μικροβιακή λοίμωξη, η παχυσαρκία, η ανδρική στειρότητα και η νόσος του *Alzheimer* χρειάζεται περισσότερες κλινικές έρευνες. Οι τρέχουσες μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην ανάπτυξη νέων προϊόντων που θα αποτελούν παράγωγα ροδιού όπως είναι οι σπόροι έτοιμοι προς κατανάλωση, συμπυκνωμένοι χυμοί, σπόροι σε σιρόπι, κατεψυγμένοι σπόροι κτλ (*Arzu Akpınar-Bayizit et al., 2012*).

4. Κρυσταλλογραφία

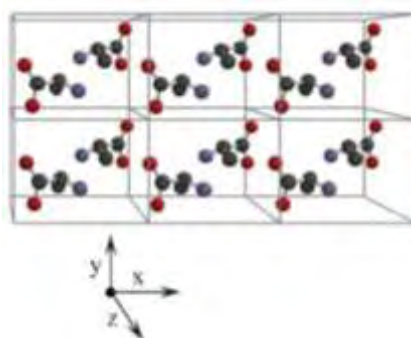
4.1 Γενικά

Για πάνω από μια δεκαετία έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ώστε να καταδειχθεί η δομική βιολογία ως το κέντρο της διαδικασίας εύρεσης νέων φαρμάκων. Η χρήση της κρυσταλλογραφίας ως μέθοδο για την οπτικοποίηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ ένωσης και πρωτεΐνης, μπορεί να βοηθήσει στη μείωση των μη ειδικών επιδράσεων καθοδηγώντας τις προσπάθειες που γίνονται στον τομέα της φαρμακευτικής χημείας

έναντι συγκεκριμένων και επιλεκτικών αλληλεπιδράσεων με το στόχο. Μια τέτοια προσέγγιση, έχει ως απώτερο σκοπό να συνδυάσει ό,τι είναι ήδη τεχνικά απτό στη δομική βιολογία με ό,τι πρέπει να κατακτηθεί εάν η βιομηχανία έχει σκοπό να συνεχίσει να ακμάζει. Η πρόκληση, ωστόσο, είναι να διπλάσια. Οι παραδοσιακές κρυσταλλογραφικές γραμμές που ακολουθούνται στις φαρμακευτικές και μεγάλες βιοτεχνολογικές εταιρίες σπάνια ανταποκρίνονται στην ταχύτητα με την οποία πλέον καθορίζονται οι δομές των συμπλόκων μεταξύ πρωτεΐνης-προσδέτη. Λόγω της οικονομικής κατάστασης που επικρατεί στη βιομηχανία τώρα, η κατάσταση είναι απίθανο να αλλάξει. Επιπρόσθετα, δεν είναι εφικτή η καθημερινή πρόσβαση σε πηγές ακτίνων-X Synchrotron, που αποτελεί την πιο αποτελεσματική οδό για απόκτηση δεδομένων υψηλής ποιότητας (Wasserman S. R., et al., 2012). Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X όμως, απαιτεί κρυστάλλους, κάτι το οποίο μπορεί να αποτελέσει τροχοπέδη, ειδικά όταν υπάρχουν μικρές ποσότητες απο τον παράγοντα που θέλουμε να μελετήσουμε. Βέβαια υπάρχουν και άλλες τεχνικές όπως η φασματοσκοπία μάζας και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός που μπορούν να δώσουν πληροφορίες για τη δομή ενός μορίου αλλά λειτουργούν μέσω μιας επαγωγικής διαδικασίας αποκλείοντας εναλλακτικές λύσεις, κάτι το οποίο διαφέρει ριζικά απο τις εικόνες που παράγοντες απο την ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X (Stallforth P., et al., 2013).

4.2 Η φύση των κρυστάλλων

Κάτω απο συγκεκριμένες συνθήκες πολλές μεγαλομοριακές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, σταθεροποιούνται για να σχηματίσουν κρυστάλλους. Οι κρύσταλλοι είναι στερεά σώματα που αποτελούνται απο ακριβείς παναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου. Κατά την είσοδο από τη διαλυτή στην κρυσταλλική κατάσταση, μεμονωμένα μόρια της ουσίας υιοθετούν μια ή περισσότερες ίδιες κατευθύνσεις. Ο κρύσταλλος που προκύπτει είναι μια επαναλαμβανόμενη τρισδιάστατη συστοιχία μορίων που συγκρατούνται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (Rhodes G., 2006; Van Holde K. E., et al., 2010).

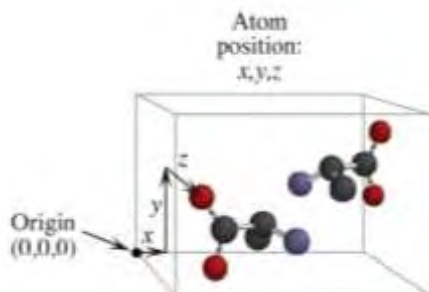


Εικόνα 15: Έξι μοναδιαίες κυψελίδες σε κρυσταλλικό πλέγμα. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιέχει δύο μόρια αλανίνης (τα άτομα του υδρογόνου δεν φαίνονται) σε διαφορετικές διαμορφώσεις (Rhodes G., 2006).

Στην *εικόνα 15* απεικονίζεται μια τέτοια συστοιχία μορίων. Οι γραμμές στην εικόνα διαιρούν τον κρύσταλλο σε πανομοιότυπες μοναδιαίες κυψελίδες¹. Η συστοιχία των

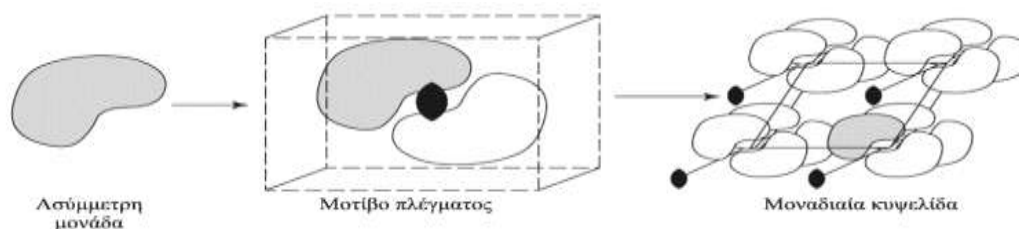
¹ Με τον όρο μοναδιαία (ή στοιχειώδη) κυψελίδα εννοούμε τη βασική και απλούστερη μονάδα που περιγράφει έναν κρύσταλλο (Rhodes G., 2006; Van Holde K. E., et al., 2010).

σημείων στις γωνίες ή στις κορυφές των μοναδιαίων κυψελίδων ονομάζεται πλέγμα. Εάν γνωρίζουμε το ακριβές περιεχόμενο της μοναδιαίας κυψελίδας μπορούμε να φανταστούμε ολόκληρο τον κρύσταλλο σαν μια πακεταρισμένη συστάδα πολλών μοναδιαίων κυψελίδων που στοιβάζονται η μία δίπλα και πάνω από την άλλη, περίπου, σαν πανομοιότυπα κουτιά σε μια αποθήκη (Rhodes G., 2006).



Εικόνα 16: Μία μοναδιαία κυψελίδα από την εικόνα 15. Η θέση ενός ατόμου στη μοναδιαία κυψελίδα μπορεί να ταυτοποιηθεί από ένα σύνολο συντεταγμένων στο χώρο (Rhodes G., 2006).

Η τοποθεσία ενός ατόμου δίνεται συνήθως από ένα σύνολο τρισδιάστατων καρτεσιανών συντεταγμένων x , y και z . Μία από τις κορυφές χρησιμοποιείται ως η αρχή του συστήματος των συντεταγμένων των στοιχειωδών κυψελίδων και της ανατίθενται οι συντεταγμένες $x = 0$, $y = 0$ και $z = 0$, που συνήθως αναγράφονται $(0,0,0)$ όπως φαίνεται και στην εικόνα 16 (Rhodes G., 2006).



Εικόνα 17: Τα στοιχεία ενός κρυστάλλου. Η ασύμμετρη μονάδα είναι εκείνο το μέρος του κρυστάλλου που δεν εμφανίζει καμία συμμετρία. Ένας τελεστής συμμετρίας παράγει το μοτίβο του δικτυωτού πλέγματος. Η επανάληψη αυτού του μοτίβου από τη μετατόπιση παράγει τις κορυφές της μοναδιαίας κυψελίδας, η οποία είναι η βασική μονάδα επανάληψης του πλέγματος του κρυστάλλου (Van Holde K. E., et al., 2010).

Μέσα στη μοναδιαία κυψελίδα το μεγαλύτερο άθροισμα των μορίων που δεν διαθέτουν στοιχεία συμμετρίας, αλλά μπορούν να αντιπαρατίθενται σε άλλες ταυτόσημες οντότητες με ενέργειες συμμετρίας², ονομάζεται ασύμμετρη μονάδα (εικόνα 17). Στις απλούστερες περιπτώσεις που αφορούν πρωτεΐνες, η ασυμμετρική μονάδα είναι ένα μονομερές μόριο πρωτεΐνης. Όλες οι μοριακές ιδιότητες ενός κρυστάλλου μπορούν να αποδοθούν σε εκείνες της ασύμμετρης μονάδας. Εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων μπορεί να βεβαιωθεί ότι όλα τα μόρια ή οι ομάδες μορίων που αποτελούν την ασύμμετρη μονάδα σε ένα κρύσταλλο, κατάλληλο για μελέτη με περίθλαση ακτίνων-X, έχουν ουσιαστικά την ίδια στερεοδιάταξη. Επομένως, για να

² Οι απλούστερες ενέργειες συμμετρίας και τα στοιχεία που χρειάζονται για να περιγράψουν μια μοναδιαία κυψελίδα είναι η μετάφραση (translation), η περιστροφή (στοιχείο: άξονες περιστροφής) και η αντανάκλαση (στοιχείο: επίπεδο κάτοπτρο) (Rhodes G., 2006).

επιλυθεί η δομή ενός κρυστάλλου, χρειάζεται να επιλυθεί η δομή μόνο της ασύμμετρης μονάδας (*Rhodes G., 2006; Van Holde K. E., et al., 2010*).

4.3 Ανάπτυξη κρυστάλλων

Οι κρυσταλλογράφοι αναπτύσσουν κρυστάλλους πρωτεϊνών με ελεγχόμενη βραδεία κατακρήμνιση από υδατικό διάλυμα κάτω από συνθήκες που δεν προκαλείται μετουσίωση της πρωτεΐνης. Υπάρχουν ουσίες που έχουν την δυνατότητα να επιφέρουν κατακρήμνιση πρωτεϊνών. Ιοντικές ενώσεις, όπως είναι τα άλατα, οδηγούν στην κατακρήμνιση πρωτεϊνών μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται "εξαλάτωση". Οι οργανικοί διαλύτες προκαλούν επίσης κατακρήμνιση πρωτεϊνών, αλλά συχνά αλληλεπιδρούν με τα υδρόφοβα τμήματα των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα να τις αφυδατώνουν. Το υδατοδιαλυτό πολυμερές *polyethylene glycol*³ (PEG) χρησιμοποιείται ευρέως επειδή αποτελεί ταυτόχρονα ισχυρό κατακρημνιστικό και ασθενές μετουσιωτικό. Ένας απλός τρόπος για να επιτευχθεί βραδεία κατακρήμνιση είναι να γίνει προσθήκη ενός μετουσιωτή σε ένα υδατικό διάλυμα πρωτεΐνης μέχρις ότου η συγκέντρωση του μετουσιωτή να είναι ακριβώς παρακάτω από εκείνη που απαιτείται για την καθίζηση της πρωτεΐνης. Τότε, το νερό αφήνεται να εξατμιστεί βραδέως, κάτι το οποίο αυξάνει ελαφρώς τη συγκέντρωση τόσο της πρωτεΐνης όσο και του μετουσιωτή έως ότου συμβεί η κατακρήμνιση. Η πιθανότητα η πρωτεΐνη να σχηματίσει κρύσταλλο ή αντιθέτως ένα περιττό άμορφο στερεό εξαρτάται από πολλές ιδιότητες του διαλύματος, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, της θερμοκρασίας, το pH και την ιοντική ισχύ. Η εύρεση των συγκεκριμένων συνθηκών για την παραγωγή ικανοποιητικών κρυστάλλων μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, απαιτεί συνήθως αρκετές δοκιμές (*Rhodes G., 2006*). Επίσης το προς κρυστάλλωση δείγμα θα πρέπει να είναι βιοχημικά καθαρό⁴ και στις περισσότερες περιπτώσεις θα πρέπει να είναι περισσότερο από 95% καθαρό για να παράγει έναν κρύσταλλο. Επιπλέον το δείγμα θα πρέπει να είναι και δομικά καθαρό⁵ και κατά συνέπεια τα διαλύματα και οι μέθοδοι κρυστάλλωσης επιλέγονται έτσι, ώστε να ευνοήσουν τη φυσική διαμόρφωση του μακρομορίου.

Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου, επομένως, συμβαίνει σε δύο διακριτικά βήματα:

- ✓ Ένα βήμα χαμηλής πιθανότητας για την πυρηνοποίηση και
- ✓ Ένα βήμα υψηλής πιθανότητας για την αύξηση (ή διάδοση) του μεγέθους του κρυστάλλου.

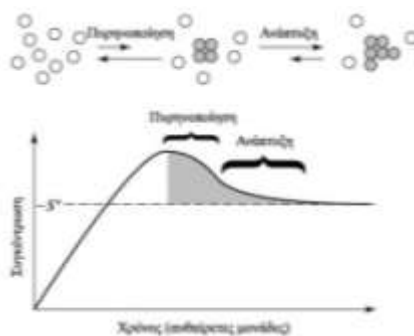
Το στάδιο πυρηνοποίησης απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη. Η απαραίτητη οδηγός δύναμη για την πυρηνοποίηση προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή αρκετά υψηλότερη από την εγγενή διαλυτότητά τους (υπερκορεσμένη). Η επακόλουθη προσθήκη μορίων στις κρυσταλλικές επιφάνειες

³ It is available in preparations of different average molecular masses, such as PEG 400, with average molecular mass of 400 daltons (*Rhodes G., et al., 2006*).

⁴ Βιοχημικά καθαρό ονομάζεται ένα δείγμα όταν κάθε μακρομόριο στο δείγμα έχει τον ίδιο μοριακό τύπο (*Van Holde K. E., et al., 2010*).

⁵ Η δομική καθαρότητα αναφέρεται στη διαμόρφωση των μορίων σε ένα συγκεκριμένο δείγμα (*Van Holde K. E., et al., 2010*).

λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τον υπερκορεσμό, κοντά στην εγγενή διαλυτότητα. Κατά συνέπεια, η αύξηση είναι μια σειρά βημάτων μικροϊσορροπίας για τα μακρομόρια του διαλύματος που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του κρυσταλλικού πλέγματος. Η πυρηνοποίηση⁶ αποτελεί το σημαντικότερο από τα δύο βήματα που αναφέρθηκαν. Εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, ο πυρήνας δεν σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλαπλούς πυρήνες, που θα εξαντλήσουν τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μία πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Πρέπει να υπάρξει μια ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν αρκούντως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παράσχουν υψηλής ευκρίνειας, δεδομένα περίθλασης ακτίνων-Χ. Κατά συνέπεια, το διάλυμα των μακρομορίων πρέπει να συμπυκνωθεί με έναν πολύ καλό ελεγχόμενο τρόπο. Στην εικόνα 18 παρουσιάζεται η διαδικασία της κρυστάλλωσης (Van Holde K. E., et al., 2010).



Εικόνα 18: Μηχανισμός της κρυστάλλωσης. Το αρχικό βήμα στην κρυστάλλωση είναι ο σχηματισμός πυρήνων ενός ελάχιστου κρυσταλλικού πλέγματος. Αυτό είναι ένα μικρής πιθανότητας βήμα που εμφανίζεται σε ένα υπέρκορο διάλυμα. Ο κρύσταλλος αναπτύσσεται με την προσθήκη μορίων στην επιφάνεια του πυρήνα. Αυτό συμβαίνει σε συγκεντρώσεις κοντά στην διαλυτότητα S^0 του μορίου (Van Holde K. E., et al., 2010)

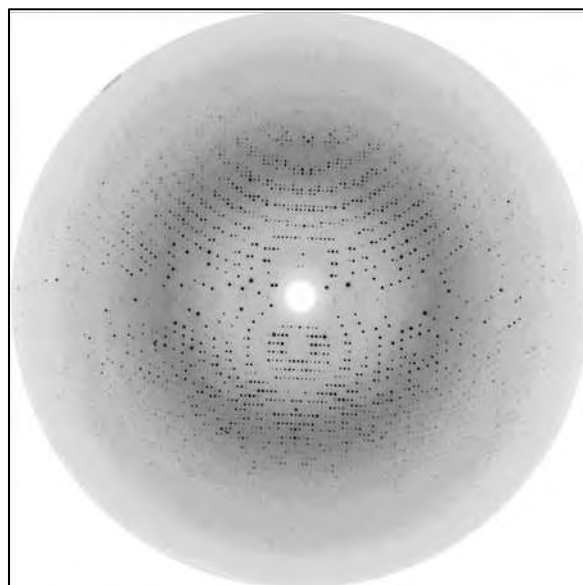
Όταν μια ουσία είναι κρυσταλλική συνήθως είναι καθαρή, γιατί κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης της οι ακαθαρσίες παραμένουν στο διάλυμα. Οι κρύσταλλοι κάθε ουσίας, που σχηματίζονται κατά την ψύξη ενός κορεσμένου διαλύματος αυτής, αρχικά διηθούνται, ακολούθως πλένονται με μικρές ποσότητες διαλύτη για να απομακρυνθεί το προσροφημένο “μητρικό υγρό” και τέλος ξηραίνονται. Όσο βραδύτερα ψύχεται το διάλυμα, τόσο αργότερα γίνεται η κρυστάλλωση και οι κρύσταλλοι που σχηματίζονται είναι μεγάλοι σε μέγεθος και κανονικοί στο σχήμα. Αν επιδιώκεται η ανάπτυξη μικρών κρυστάλλων, όπως στα περισσότερα φαρμακευτικά σκευάσματα, τότε το διάλυμα ψύχεται απότομα ή υφίσταται υπερηχητικές δονήσεις. Όταν κρύσταλλοι μεγάλης ποικιλίας έρχονται σε επαφή με το μητρικό τους υγρό για αρκετό χρόνο, τότε οι μεγάλοι κρύσταλλοι μεγαλώνουν ακόμα περισσότερο, σε βάρος των μικρών που εξαφανίζονται. Το τελευταίο συμβαίνει κυρίως όταν έχουμε διακυμάνσεις θερμοκρασίας και παρατηρείται πολλές φορές κατά την παρασκευή φαρμακευτικών κρεμών (Καραϊσκάκης Γ., 1998).

⁶ Η πυρηνοποίηση είναι ο ασχηματισμός εναρκτήριων μοριακών συμπλεγμάτων από τα οποία αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι (Rhodes G., 2006).

Σε ό,τι αφορά την δομή των κρυστάλλων, υπάρχουν διάφορες χημικές ενώσεις που μπορούν να έχουν την ίδια κρυσταλλική δομή. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ισομορφισμός και οι ενώσεις ισόμορφες. Δηλαδή, είναι πιθανό να υπάρχουν διαφορετικοί κρύσταλλοι των οποίων οι μοναδιαίες κυψελίδες έχουν τα ίδια μήκη αξόνων και γωνίες και ανήκουν στην ίδια ομάδα του χώρου. Επίσης τα περιθλασίγραμμα ακτίνων X των ισόμορφων αυτών κρυστάλλων πρέπει να είναι πολύ όμοια (Καραϊσκάκης Γ., 1998; Van Holde K. E., et al., 2010).

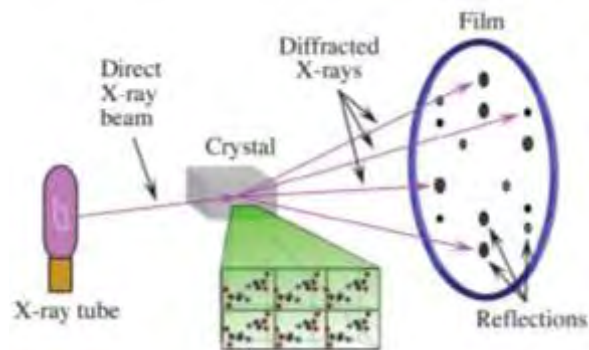
4.4 Ακτίνες-X

Η συνηθέστερη μέθοδος για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής των χημικών και φαρμακευτικών κρυσταλλικών δομών, καθώς και των πρωτεϊνών και άλλων βιολογικών μορίων είναι η περίθλαση των ακτίνων-X. Οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων στα κρυσταλλικά σώματα είναι της ίδιας τάξης μεγέθους (από 0.1 μέχρι 25Å) με τα μήκη κύματος των ακτίνων-X. Έτσι οι κρύσταλλοι δρουν σαν φράγματα περίθλασης για τις ακτίνες-X. Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής των δομών που προαναφέρθηκαν γίνεται από τα διαγράμματα περίθλασης, που λαμβάνονται από χιλιάδες προσανατολισμούς, σε σχέση με τη διεύθυνση της δέσμης των ακτίνων-X (Καραϊσκάκης Γ., 1998). Στην εικόνα 19 φαίνεται το περιθλασίγραμμα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε σύμπλοκο με αναστολέα.



Εικόνα 19: Περιθλασίγραμμα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε σύμπλοκο με αναστολέα

Στην εικόνα 20 απεικονίζεται η συλλογή δεδομένων περίθλασης με ακτίνες-X. Φαίνεται λοιπόν ότι ένα κρύσταλλος τοποθετείται μεταξύ μια πηγής ακτίνων-X και ενός ανιχνευτή ακτίνων-X. Ο κρύσταλλος διαπερνάται από μια στενή ακτίνα ακτίνων-X, η οποία προέρχεται από την πηγή. Η απλούστερη πηγή είναι ένας σωλήνας ακτίνων-X και ο απλούστερος ανιχνευτής είναι ένα φιλμ ακτίνων-X, στο οποίο θα εμφανιστούν σκούρες κηλίδες όπου προσπέσουν οι ακτίνες-X. Αυτά τα σημεία ονομάζονται αντανάκλασεις επειδή προκύπτουν από τον κρύσταλλο σαν να αντανάκλωνται από την επιφάνεια των ατόμων (Rhodes G., 2006).



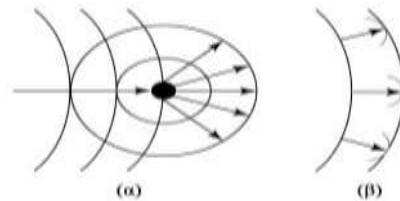
Εικόνα 20: Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Η ακτίνα-X περιθλάται από τον κρύσταλλο σε πολλές διακεκριμένες δέσμες (αντανάκλαση) πάνω στο φιλμ. Οι θέσεις και οι εντάσεις αυτών των αντανακλάσεων περιέχουν την πληροφορία που χρειάζεται για να καθοριστεί η μοριακή δομή (Rhodes G., 2006)

4.5 Θεωρία περίθλασης ακτίνων X από κρύσταλλο

Το μήκος της ακτινοβολίας των ακτίνων-X είναι κατάλληλο για τη διάκριση ατόμων σε απόσταση ομοιοπολικού δεσμού. Η ενέργεια ενός κβάντου αυτής της ακτινοβολίας είναι περίπου 8000eV, που είναι περίπου η ενέργεια των ηλεκτρονίων στα ατομικά τροχιακά τους. Αυτή η ισοδυναμία της ενέργειας οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις, έτσι ώστε τα ηλεκτρόνια ενός ατόμου να είναι πρώτιστα υπεύθυνα για τη σκέδαση των ακτίνων-X. Ο αριθμός των ηλεκτρονίων σε έναν δεδομένο όγκο του χώρου (η πυκνότητα των ηλεκτρονίων) καθορίζει, πόσο έντονα ένα άτομο σκεδάζει τις ακτίνες-X. Η συμβολή των σκεδαζόμενων ακτίνων-X οδηγεί στο γενικό φαινόμενο της περίθλασης. Στην περίθλαση των ακτίνων-X, αντιμετωπίζεται η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ως κύμα. Οι γενικές θεωρίες και οι συνέπειες της περίθλασης ισχύουν για ακτινοβολίες οποιασδήποτε ενέργειας. Η περίθλαση του ορατού φωτός χρησιμοποιείται συχνά για να επεξηγηθούν οι αρχές που διέπουν την περίθλαση των ακτίνων-X από ένα κρύσταλλο (Van Holde K. E., et al., 2010).

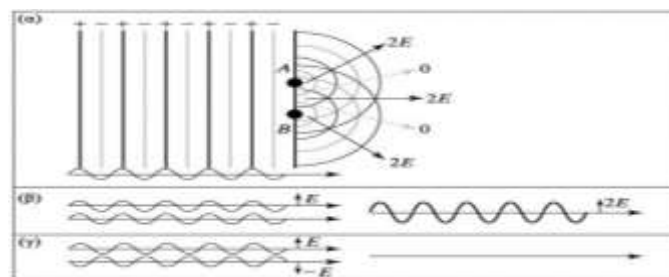
Η σκέδαση αναφέρεται απλά στην ικανότητα των αντικειμένων να αλλάζουν την κατεύθυνση ενός κύματος. Στην περίπτωση του ορατού φωτός, το απλούστερο παράδειγμα είναι η ανάκλαση από ένα κάτοπτρο. Το κάτοπτρο αλλάζει απλώς την κατεύθυνση των φωτεινών κυμάτων. Μη ανακλώντα αντικείμενα μπορούν επίσης να σκεδάσουν τα φωτεινά κύματα. Ένα αντικείμενο που τοποθετείται στην πορεία μια φωτεινής δέσμης, προερχόμενης από μια σημειακή πηγή, δεν μπορεί να σχηματίσει σκιά με σαφή όρια, λόγω της σκέδασης από τις ακμές του. Η προέλευση της σκέδασης μπορεί να αναλυθεί καλύτερα με αφετηρία την αρχή του Huygen, η οποία δηλώνει ότι κάθε σημείο ενός μετώπου κύματος μπορεί να θεωρηθεί ως πηγή ενός νέου μετώπου κύματος (Εικόνα 21α). Η ταχύτητα αυτού του νέου μετώπου κύματος είναι ίση με αυτή του αρχικού. Για ένα ανεμπόδιο μέτωπο κύματος, το δευτερογενές μέτωπο μπορεί να κατασκευαστεί σχεδιάζοντας κύκλους ακτίνας $r=vt$ (όπου v είναι η ταχύτητα του κύματος και t είναι ο χρόνος) σε σημεία επί του αρχικού μετώπου και μετά συνδέοντας τις εφαπτόμενες σε κάθε έναν από αυτούς τους κύκλους (Εικόνα 21β). Αντικείμενα, που τοποθετούνται στην πορεία ενός μετώπου κύματος, ενεργούν ως σημεία διάδοσης για τα νέα μέτωπα. Το εντελώς νέο μέτωπο

κύματος, που προκύπτει από αυτά, καλείται σκεδαζόμενο κύμα (Van Holde K. E., et al., 2010).



Εικόνα 21: Η αρχή του Huygen για την περίθλαση. (α) Κάθε σημείο της επιφάνειας ενός μετώπου κύματος ενεργεί ως σημείο διάδοσης νέων δευτερευόντων κυμάτων που αθροιστικά σχηματίζουν ένα νέο μέτωπο. Κάθε σημείο του προσπίπτοντος μετώπου κύματος παράγει δευτερεύον κύμα ίδιας ταχύτητας με το προσπίπτον, που αναπαρίσταται ως ένα σύνολο ομόκεντρων κύκλων που εκπέμπονται από το σημείο. (β) Το νέο μέτωπο κύματος διαμορφώνεται με τη σύνδεση των εφαπτόμενων των δευτερευόντων κυμάτων από όλα τα σημεία διάδοσης

Εάν τοποθετήσουμε τώρα δύο σημειακά αντικείμενα (A και B) στην πορεία του μετώπου κύματος, κάθε ένα από τα δύο σημεία θα διαδώσει ένα νέο μέτωπο, που θα έχει το ίδιο μήκος κύματος και την ίδια ταχύτητα, όπως φαίνεται στην εικόνα 22. Η μετατόπιση στην εμφάνιση των μεγίστων στα πλάτη των δύο κυμάτων (η σχετική φάση τους) εξαρτάται από τις θέσεις του A και B ως προς το σημείο προέλευσης του αρχικού κύματος.

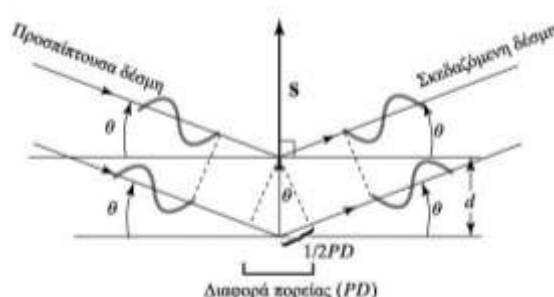


Εικόνα 22: Ενισχυτική και αναιρετική συμβολή σκεδαζόμενων κυμάτων. (α) Δύο σημεία σκέδασης που συναντούν την επιφάνεια ενός προσπίπτοντος μετώπου κύματος λειτουργούν ως σημεία διάδοσης. (β) Τα πλάτη E των προκυπτόντων κυμάτων από τα σημεία σκέδασης αθροίζονται για να διαμορφώσουν ένα νέο κύμα με πλάτος διπλάσιο του αρχικού κατά μήκος των διανυσμάτων $2E$ του (α). (γ) Τα κύματα που είναι 180° εκτός φάσης αλληλοεκμηδενίζονται, δίνοντας συνολικά πλάτος κατά μήκος των διανυσμάτων 0 των (α) (Van Holde K. E., et al., 2010).

Σε κάποιες θέσεις στον χώρο, το κύμα που διαδίδεται από το A θα ενισχύσει το σκεδαζόμενο από το B, εάν τα δύο σκεδαζόμενα κύματα έχουν την ίδια φάση (ενισχυτική συμβολή). Αντίθετα, εάν τα κύματα έχουν αντίθετη φάση, το κύμα από το A θα μειώσει το πλάτος του κύματος από το B μέσω της αναιρετικής συμβολής. Αυτό το φαινόμενο καλείται περίθλαση. Το άθροισμα των κυμάτων που διαδίδονται από το A και το B, δίνει πλάτος κύματος που εξαρτάται τόσο από τις σχετικές θέσεις του A και του B, όσο και από το σημείο παρατήρησης του νέου κύματος. Κατά συνέπεια, από τις παρατηρήσεις των πλατών του νέου μετώπου κύματος σε διαφορετικές θέσεις, να συναγάγουμε τις θέσεις των περιθλώντων σημείων A και B σχετικά με την αφετηρία του αρχικού μετώπου. Αυτός είναι ο τρόπος χρησιμοποίησης της περίθλασης των ακτίνων-X για να επιλυθεί η δομή των μορίων στους μονοκρυστάλλους κύμα (Van Holde K. E., et al., 2010).

4.5.1 Ο Νόμος του Bragg

Το 1912, ο W. L. Bragg ανέπτυξε μια απλή σχέση για να εξηγήσει, το πώς η περίθλαση σχετίζεται με τις γενικές θέσεις των σημειακών αντικειμένων στον χώρο. Για την παραγωγή του νόμου του Bragg για την περίθλαση, αρχικά απλοποιήθηκε το εννοιολογικό μοντέλο της περίθλασης, θεωρώντας τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος ως παράλληλα επίπεδα. Ένα απλό μοντέλο μονοδιάστατου κρυστάλλου προκύπτει από τη στοίβαξη διαδοχικών παράλληλων ανακλώντων επιπέδων σε ίσες αποστάσεις d , όπως φαίνεται στην εικόνα 23. Σε αυτό το μοντέλο, ένα κύμα ακτίνων- X (με μήκος κύματος λ) προσπίπτει στα ανακλώντα υπό γωνία θ . Η ανάκλαση από τα επίπεδα σκεδαρίζει το κύμα υπό την ίδια γωνία (Van Holde K. E., et al., 2010).



Εικόνα 23: Ο νόμος του Bragg για την περίθλαση. Μια δέσμη ακτίνων- X προσπίπτει σε μια περιοδική διάταξη ανακλώντων επιπέδων υπό γωνία θ και ανακλάται υπό την ίδια γωνία. Η ενισχυτική συμβολή των ανακλώμενων ή σκεδαζόμενων ακτίνων- X συμβαίνει, όταν η διαφορά πορείας PD μεταξύ των ανακλώμενων δεσμών από διαδοχικά επίπεδα (σε απόσταση d μεταξύ τους) είναι ίση με το ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος. Το διάνυσμα σκέδασης S είναι κάθετο στα ανακλώντα επίπεδα και το μέτρο του είναι ίσο με το αντίστροφο της απόστασης μεταξύ των επιπέδων ανάκλασης (Van Holde K. E., et al., 2010).

Δεδομένου, ότι η απόσταση του σημείου παρατήρησης είναι πολύ μεγάλη έναντι του d , οι ανεξάρτητες διαδρομές του σκεδαζόμενου φωτός θα είναι ουσιαστικά παράλληλες. Έχοντας ένα μεγάλο αριθμό επιπέδων, παρατηρείται ενισχυτική συμβολή μόνο όταν τα ανακλώμενα κύματα είναι ακριβώς εν φάσει (κορυφές κυμάτων που ευθυγραμμίζονται με κορυφές, κόμβοι με κόμβους, και κοιλάδες με κοιλάδες). Αυτή η συνθήκη ικανοποιείται, μόνο όταν η διαφορά μεταξύ του μήκους διαδρομής του προσπίπτοντος και του ανακλώμενου κύματος, PD , είναι ίση με ακέραιο (n) πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ακτίνων- X (Van Holde K. E., et al., 2010).

$$PD = n\lambda \quad (1)$$

Αυτή η διαφορά στα μήκη των διαδρομών συσχετίζεται με την απόσταση που χωρίζει τα ανακλώντα επίπεδα με την απλή τριγωνομετρική σχέση,

$$\frac{1}{2} PD = d \sin \theta \quad (2)$$

Αντικαθιστώντας την εξίσωση (2) στην (1), παράγεται ο νόμος του Bragg για την περίθλαση

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (3)$$

ή

$$\frac{2 \sin \theta}{\lambda} = \frac{n}{d} \quad (4)$$

Αυτή η απλή σχέση διατυπώνει δύο θεμελιώδεις προτάσεις σχετικά με τις ιδιότητες της περίθλασης. Καταρχήν, από την εξίσωση (3) αποδεικνύεται ότι οι γωνίες στις οποίες παρατηρείται η περίθλαση είναι κβαντισμένες για ακέραιες τιμές του n (0,1,2,...). Για έναν στοίχο άπειρων σκεδαστών, η μόνη προϋπόθεση για να παρατηρηθεί μια ανάκλαση, είναι να ικανοποιείται ο νόμος του Bragg. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η σκεδαζόμενη ακτινοβολία εκμηδενίζεται (Van Holde K. E., et al., 2010).

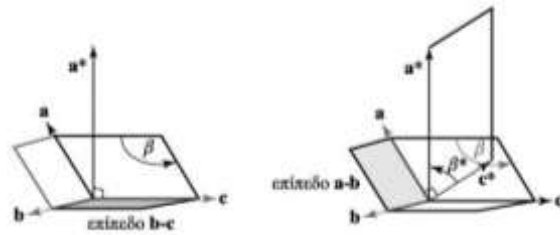
Δεύτερον, υπάρχει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της γωνίας Bragg (θ) και της ισαπόστασης μεταξύ των ανακλώντων επιπέδων (d). Αυτό σημαίνει, ότι μεγαλύτερες αποστάσεις μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μονάδων σε ένα κρύσταλλο οδηγούν σε μικρότερες γωνίες περίθλασης. Εναλλακτικά, μπορεί να μετασχηματιστεί η αντίστροφη σχέση σε ευθεία αναλογία με τον καθορισμό ενός νέου μεγέθους, του *διάνυσματος σκέδασης* (S). Το διάνυσμα σκέδασης έχει μέτρο $|S| = \frac{n}{d}$, και διεύθυνση κάθετη προς το ανακλών επίπεδο. Έτσι η εξίσωση (4) μπορεί να ξαναγραφεί ως:

$$\frac{2 \sin \theta}{\lambda} = \frac{n}{d} = |S| \quad (5)$$

όπου το S έχει μονάδες αντιστρόφου μήκους, και συνεπώς, επιτρέπει να εισαχθεί μια έννοια γνωστή ως «αντίστροφος χώρος». Το S εξετάζεται ως ένας τρόπος συσχέτισης της γεωμετρίας των ανακλώντων επιπέδων με την απόσταση που χωρίζει τις παρατηρούμενες ανακλάσεις, όπως φαίνεται και στην *εικόνα 23* (Van Holde K. E., et al., 2010).

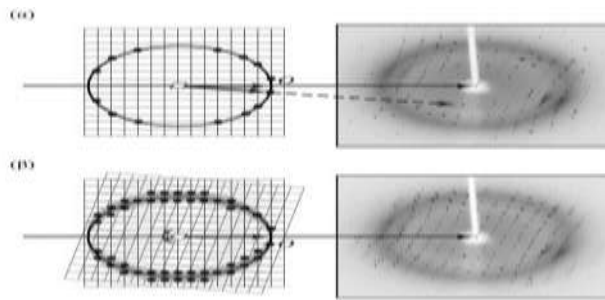
4.5.2 Ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα και η σφαίρα του *Ewald*

Το περιθλασίγραμμα χαρακτηρίζεται από κηλίδες που έχουν συγκεκριμένη γεωμετρία, συμμετρία και ένταση. Η κάθε κηλίδα χαρακτηρίζεται από τρεις συντεταγμένες που δεν είναι τίποτα άλλο από τους δείκτες *Miller* που χρησιμοποιήσαμε για να χαρακτηρίσουμε τα παράλληλα κρυσταλλογραφικά επίπεδα. Οι κηλίδες έχουν συντεταγμένες που ανήκουν σε ένα υποθετικό σύστημα συντεταγμένων, το ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα, που βοήθα στον καθορισμό της διεύθυνσης των κυμάτων. Το ανάστροφο κρυσταλλικό πλέγμα μπορούμε να το χαρακτηρίσουμε γεωμετρικά όπως και το πραγματικό. Στην *εικόνα 24* παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά μιας ανάστροφης στοιχειώδους κυψελίδας σύμφωνα με αυτά της πραγματικής.



Εικόνα 24: Κατασκευή μιας μοναδιαίας κυψελίδας του αντίστροφου χώρου (αντίστροφη μοναδιαία κυψελίδα) από μία μοναδιαία κυψελίδα του πραγματικού χώρου (Van Holde K. E., et al., 2010).

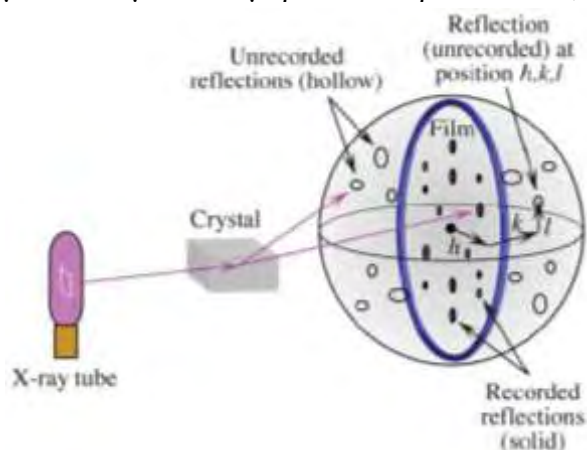
Το 1921, ο *Edwald* εισήγαγε για τη περιγραφή του φαινομένου της περίθλασης, τη χρήση μιας γεωμετρικής κατασκευής η οποία απλοποιεί σε μεγάλο ποσοστό την περιγραφή του φαινομένου. Η κατασκευή αυτή συνίσταται από μια σφαίρα με κέντρο, *O*, τον κρύσταλλο όπως φαίνεται στην *εικόνα 25*. Οι ανακλάσεις θα εισέρχονται και θα εξέρχονται από τη σφαίρα, επιτρέποντας τη μέτρηση των ανακλάσεων από διαφορετικές περιοχές του αντίστροφου πλέγματος. Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, για την παρατήρηση μιας περίθλασης το σημείο *hkl* του ανάστροφου πλέγματος πρέπει να ανήκει στη σφαίρα ανάκλασης. Αυτό επιτυγχάνεται με περιστροφή του κρυστάλλου (Van Holde K. E., et al., 2010).



Εικόνα 25: Περιθλασιγράμματα από ακίνητη και περιστροφική ταλάντωση. Περίθλαση που προκύπτει από την τομή των σημείων του αντίστροφου πλέγματος με τη σφαίρα *Ewald*. (α) Εάν ο κρύσταλλος διατηρείται ακίνητος, η πιθανότητα τομής είναι μικρή, με συνέπεια να παρατηρούνται σχετικά λίγες ανακλάσεις. (β) Όταν ο κρύσταλλος περιστρέφεται, το αντίστροφο πλέγμα περιστρέφεται επίσης (κατά την ίδια φορά αλλά περί το σημείο *O*) και τέμνει τη σφαίρα *Ewald* σε άλλα σημεία, επιτρέποντας την παρατήρηση περισσότερων ανακλάσεων (σκιασμένες περιοχές) (Van Holde K. E., et al., 2010).

Στην *εικόνα 26* αποτυπώνεται ένα θεωρητικό τρισδιάστατο περιθλασίγραμμα, με τις αντανακλάσεις που θα παραχθούν από όλες τις πιθανές κατευθύνσεις ενός κρυστάλλου που διαπερνάται από μια δέσμη ακτίνων-*X*. Παρατηρείται πως μόνο μια επιφάνεια του τρισδιάστατου μοντέλου περίθλασης υπερτίθεται πάνω στο φιλμ. Με τον κρύσταλλο στον προσανατολισμό που απεικονίζεται, οι αντανακλάσεις που απεικονίζονται στην επιφάνεια του φιλμ, στερεά σημεία, είναι οι μόνες αντανακλάσεις που παράγουν σημεία πάνω στο φιλμ. Για να είναι δυνατή η μέτρηση των κατευθύνσεων και των εντάσεων όλων των αλληπάλληλων αντανακλάσεων (απεικονίζονται ως κούφια κενά σημεία), ο κρυσταλλογράφος πρέπει να συλλέξει τα περιθλασιγράμματα από όλους τους πιθανούς προσανατολισμούς του κρυστάλλου σε ανταπόκριση με την ακτίνα-*X*. Το άμεσο αποτέλεσμα της συλλογής των κρυσταλλογραφικών δεδομένων είναι μια λίστα από εντάσεις για κάθε σημείο σε

ανταπόκριση με το τρισδιάστατο πλέγμα. Το σύνολο των δεδομένων είναι η πρώτη ύλη για τον καθορισμό των δομών των μορίων του κρυστάλλου (Rhodes G., 2006).



Εικόνα 26: Η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων, επιδεικνύουν αντανάκλασεις που μετρούνται για ένα συγκεκριμένο προσανατολισμό του κρυστάλλου (στερεό στο φιλμ) και αυτές που μπορούν να μετρηθούν σε άλλους προσανατολισμούς (κενό μέσα στη σφαίρα του φιλμ). Κάθε αντανάκλαση τοποθετείται στις συντεταγμένες των τριών διαστάσεων h , k και l .

4.6 Βελτιστοποίηση μοριακού μοντέλου

Η ποιότητα του υπολογιζόμενου χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας εξαρτάται πολύ από την ποιότητα των πειραματικών δεδομένων και από το μοντέλο. Η ποιότητα των δεδομένων δεν μπορεί να αλλάξει, εκτός και εάν πραγματοποιηθεί ανάπτυξη νέων κρυστάλλων και συλλεχθούν καλύτερα δεδομένα περίθλασης. Εντούτοις μπορεί να γίνει βελτίωση του μοντέλου με βελτιστοποίηση της δομής, ώστε να ταιριάζει καλύτερα με την ηλεκτρονική πυκνότητα. Σε αυτή την διαδικασία βελτιστοποίησης, το μοντέλο υποβάλλεται σε μικρές αλλαγές για την βελτίωση των λεπτομερειών του. Το μοντέλο θα μπορούσε να προσαρμοστεί οπτικά στους υπολογιζόμενους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας. Υπάρχει όμως ένα πρόβλημα με τους υπολογιζόμενους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας από παράγοντες δομής που προέρχονται από τις παρατηρηθείσες εντάσεις. Μόνο το $|F(S)_{obs}|$ μπορεί να προσδιοριστεί από τα δεδομένα έντασης. Οι πληροφορίες φάσεων μπορούν να υπολογιστούν μόνο από το μοντέλο, $F(S)_{calc}$. Αυτό σημαίνει ότι το μοντέλο επηρεάζει έντονα τους χάρτες (Van Holde K. E., et al., 2010).

Ένα αντικειμενικότερο κριτήριο για την αξιολόγηση του πόσο καλά ένα μοντέλο συμφωνεί με τα δεδομένα είναι ο δείκτης αξιοπιστίας R (ή παράγοντας R):

$$R = \frac{\sum | |F(S)_{obs}| - |F(S)_{calc}| |}{\sum |F(S)_{obs}|} \quad (6)$$

Σε αυτήν την περίπτωση, συγκρίνονται μόνο τα μέτρα των μετρηθέντων και υπολογισθέντων παραγόντων δομής. Γενικά, οι δείκτες αξιοπιστίας R κυμαίνονται μεταξύ του 70% (0,7) για ένα τυχαίο «ταίριασμα» και μίας τιμής που πλησιάζει το 0% για ένα ιδανικό τέλειο ταίριασμα. Ένα ιδανικό ταίριασμα δεν είναι επιτεύξιμο, πρώτιστα λόγω των εγγενών περιορισμών στην ποιότητα των δεδομένων και των ατελειών στον κρύσταλλο. Ένας γενικός κανόνας για τα μακρομόρια είναι, ότι ένα

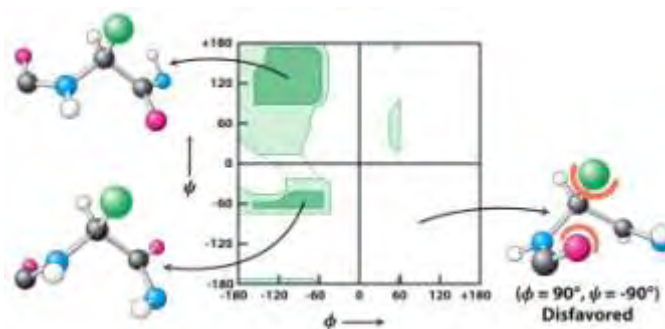
μοντέλο μπορεί να προταθεί ως μια λύση στη δομή, όταν η βελτιστοποίηση φθάσει ως έναν παράγοντα R 20% (0,2) ή καλύτερο. Για να επιτευχθεί αυτό το επίπεδο σχηματισμού μεταξύ του μοντέλου και των δεδομένων, πρέπει να ορισθεί με ακρίβεια η δομή του μακρομορίου μαζί με ένα μεγάλο ποσοστό του διαλύτη. Δυστυχώς, ένας χαμηλός παράγοντας R μπορεί να επιτευχθεί τεχνικά και για ένα ανακριβές μοντέλο, προσθέτοντας απλώς περισσότερο διαλύτη για να καλυφθεί η ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε διάφορα μέρη της μοναδιαίας κυψελίδας. Έτσι, η επίλυση της δομής ενός μακρομορίου από τα δεδομένα περίθλασης των ακτίνων-Χ εξαρτάται πολύ από την κατασκευή αλλά και από την ποιότητα των μοριακών μοντέλων. Στη διαδικασία αυτή, υπάρχει ένας αριθμός βημάτων, όπου μπορεί να παρεμφρήσει η υποκειμενική προτίμηση. Ευτυχώς, είναι διαθέσιμα διάφορα αντικειμενικά κριτήρια για την αξιολόγηση της ποιότητας των προκύπτων μοντέλων.

Πρόσφατα, οι κρυσταλλογράφοι έχουν αναγνωρίσει την ανάγκη ύπαρξης ενός μέτρου αξιολόγησης της συμβατότητας του μοντέλου, χωρίς αυτό να προκαταλαμβάνεται από το ίδιο μοντέλο. Η προσέγγιση που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η εξής: Αρχικά διαχωρίζεται ένα μέρος (περίπου 5% έως 10%) από τα συνολικά πειραματικά δεδομένα για να χρησιμοποιηθεί ως σετ δεδομένων ελέγχου. Το μοντέλο βελτιστοποιείται μόνο ως προς τα υπόλοιπα δεδομένα (σετ δεδομένων εργασίας). Κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης του μοντέλου, ο παράγοντας R υπολογίζεται τόσο για το σετ δεδομένων εργασίας όσο και για το σετ ελέγχου. Ο δεύτερος παράγοντας R καλείται R_{free} , αναγνωρίζοντας ότι θα πρέπει να είναι απαλλαγμένος από την επίδραση του μοντέλου. Εάν κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης το μοντέλο βελτιώνεται πραγματικά (αντικειμενικά), τότε ο R_{free} θα πρέπει να συνεχίσει να μειώνεται. Από κάποιο σημείο, ωστόσο, ο R_{free} θα πάψει να μειώνεται και ακόμα και αν η περαιτέρω βελτιστοποίηση ή οι προσθήκες στο μοντέλο μειώνουν τον παράγοντα R των δεδομένων εργασίας, το μοντέλο θεωρείται ότι έφθασε πλέον το επίπεδο ποιότητας που του επιτρέπουν τα δεδομένα. Με περαιτέρω προσθήκες στο μοντέλο, ο R_{free} μπορεί όντως να αρχίσει να αυξάνεται, ακόμη και όταν ο R για το σετ δεδομένων εργασίας αρχίζει να μειώνεται. Αυτό μαρτυρά, ότι τα δεδομένα είναι πλέον υπερπροσαρμοσμένα (περισσότερες μεταβλητές από ό,τι τα δεδομένα επιτρέπουν) (Van Holde K. E., et al., 2010).

4.7 Έλεγχος του δομικού μοντέλου – Διάγραμμα Ramachandran

Μετά την βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου, είναι απαραίτητος ο έλεγχος του έτσι ώστε να αποφευχθούν λάθη στην ερμηνεία της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Επίσης τα μόρια που συμμετέχουν θα πρέπει να έχουν κάποια γεωμετρικά και στερεοχημικά χαρακτηριστικά (γωνίες, μήκη δεσμών, πεπτιδικό δεσμό, κτλ) τα οποία δεν πρέπει να αποκλίνουν από τα επιτρεπτά όρια. Ο *N. G. Ramachandran*, διαπίστωσε ότι πολλοί συνδυασμοί ϕ και ψ γωνιών δεν είναι δυνατοί λόγω των στερικών συγκρούσεων μεταξύ των ατόμων. Οι τιμές που επιτρέπονται μπορούν να τοποθετηθούν σε ένα διδιάστατο σχήμα που ονομάζεται διάγραμμα *Ramachandran*. Τα τρία τέταρτα των πιθανών συνδυασμών των γωνιών ϕ και ψ είναι αδύνατο να πραγματοποιηθούν διότι δημιουργούνται τοπικές εστερικές συγκρούσεις. Ο στερικός

αποκλεισμός, δηλαδή το γεγονός ότι δύο άτομα δεν μπορούν να είναι στο ίδιο σημείο συγχρόνως, μπορεί να είναι σημαντικότερος κανόνας οργάνωσης της δομής πρωτεϊνών (Stryer L. et al., 2002). Στην περίπτωση που εξαχθεί το διάγραμμα για κάποιο μοντέλο πρέπει όλα τα κατάλοιπα να βρίσκονται σε περιοχές που είναι επιτρεπτές, διαφορετικά το μοντέλο πρέπει να επανεξεταστεί για τα κατάλοιπα που παρουσιάζουν λάθος στερεοχημεία.



Εικόνα 27: Ένα διάγραμμα *Ramachandran* που δείχνει τις γωνίες ϕ και ψ . Οι τιμές ϕ και ψ είναι περιορισμένες λόγω των συγκρούσεων μεταξύ των ατόμων. Οι επιτρεπτές τιμές ϕ και ψ φαίνονται με σκούρο πράσινο, ενώ οι οριακές τιμές φαίνονται με ανοιχτό πράσινο. Η δομή που φαίνεται δεξιά είναι εκείνη που δημιουργεί τις λιγότερες συγκρούσεις μεταξύ των ατόμων (Stryer L. et al., 2002).

5. Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχολής Επιστημών Υγείας. Η έρευνα αυτή έχει ως στόχο τη μελέτη ενζύμων του μεταβολισμού του γλυκογόνου, όπως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, για τη κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και τον σχεδιασμό πιθανών υπογλυκαιμικών ενώσεων. Ο βασικός στόχος της έρευνας αυτή είναι η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων για την παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων, κατάλληλα για διαβητικούς, που θα βοηθούν, ίσως και σε μεγάλο βαθμό, στη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα σε φυσιολογικά επίπεδα. Η εφαρμογή κρυσταλλογραφίας για την ανάλυση της τρισδιάστατης δομής των συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης/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.

Στη συγκεκριμένη εργασία, αρχικά, έγινε απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (*RMGPb*⁷) και ο προσδιορισμός της σταθεράς *Michaelis-Menten* του ενζύμου. Στη συνέχεια έγιναν κινητικές μελέτες ως προς εκχυλίσματα *Vitis vinifera*, διάφορων ποικιλιών, και *Punica granatum L.* (ποικιλίας *wonderful*) με σκοπό τον προσδιορισμό της *IC*₅₀ των εκχυλισμάτων αυτών ώστε να καταδειχθεί αν κάποιο από αυτά τα εκχυλίσματα έχει την δυνατότητα να επιφέρει αναστολή της *RMGPb*. Εφόσον προσδιορίστηκε αν κάποιο από αυτά τα εκχυλίσματα έχει αυτή τη δυνατότητα, συνεχίσαμε με κρυσταλλογραφικές μελέτες ώστε να αναδείξουμε την συγκεκριμένη φυσική ουσία η οποία προσδένεται σε κάποιο κέντρο του ενζύμου⁸ και προκαλεί την αναστολή. Εφόσον έγινε η ταυτοποίηση των συγκεκριμένων ενώσεων, συνεχίσαμε με τον προσδιορισμό της *IC*₅₀ και της σταθεράς αναστολής (*K_i*) των ενώσεων αυτών έναντι της *RMGPb*. Έπειτα μελετήσαμε μέσω κινητικών μελετών το είδος της αναστολής ως προς τα γνωστά κέντρα σύνδεσης του ενζύμου. Την διαδικασία αυτή ακολούθησαν εκ νέου κρυσταλλογραφικές μελέτες χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη φυσική ουσία που ταυτοποιήσαμε αρχικά ώστε να βρούμε αν η εν λόγω ουσία μπορεί όντως να προσδένεται στο συγκεκριμένο κέντρο του ενζύμου όπου την εντοπίσαμε αρχικά.

⁷ *Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase b (RMGPb)*

⁸ Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διαθέτει τουλάχιστον 6 ρυθμιστικές περιοχές. Για περισσότερες λεπτομέρειες ανατρέξτε στο εδάφιο §3.2

6. Υλικά και μέθοδοι

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Εταιρεία</i>
Acetic acid Ammonium	CARLO ERBA REACTIFS – SDS
a-D-glucose	Aldrich
AMP	Sigma
BES	SIGMA
Bradford protein assay	Bio-rad
BSA	Sigma
Caffeine	Aldrich
CH ₃ COOH	Merck
Dex	Riedel-de Haën
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	Panreac
Dodecylsulfate Na salt, SDS	SERVA
DTT	Applichem
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) Gibco®	Life technologies - Invitrogen
Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium Salt 2-hydrate, EDTA	Panreac
FBS Gibco®	Life Technologies – Invitrogen
Gallic acid monohydrate	SIGMA-ALDRICH
Glycerol	Sds
Glycogen type II from oyster	Sigma
Hydrochloric acid ruming 37%	MERCK
Imidazole	ALDRICH
IMP	Sigma
L (+) –Ascorbic acid powdered	BioChemica-AppliChem
L-Glutamine	Life Technologies – Invitrogen
molybdate tetrahydrate	BioChemica-AppliChem
NaCl	Panreac
PMSF	Serva
Potassium bicarbonate, minimum 99.5% (KHCO ₃)	AppliChem
Potassium chloride, KCl	MERCK
Sodium Carbonate Anhydrous, Na ₂ CO ₃	MERCK
Sodium Hydroxide pellets, NaOH	MERCK
Tris	Serva
Zinc acetate dehydrate	SIGMA-ALDRICH
Αιθανόλη (απόλυτη)	Prolabo
βGP	Fluka
B-μερκαπτοαιθανόλη	Aldrich
Ζωάνθρακας	Aldrich
Θειικό αμμώνιο	Chemlab
Πενικιλίνη – Στρεπταμυκίνη	Invitrogen
Σπερμίνη	Sigma
Φωσφορικά	Merck
G1P	
(CH ₃ COO) ₂ Mg	-
Triton	

6.1-6.2 Διαδικασία επεξεργασίας εκχυλισμάτων παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού και αμπελοκομίας

Σε μίγμα μεθανόλης των 200ml, MetOH/H₂O/1.0N HCl (90:9:5:0.5 v/v), εισήχθησαν 50 γραμμάρια αποξηραμένου δείγματος (σκόνη από σπόρους σταφυλιών, romace ή βόστρυχοι) και ακολούθησε επεξεργασία με υπέρηχους για 10 λεπτά σε μπανάκι υπερέχων. Ο διαλύτης διαχωρίστηκε με διήθηση τα στερεά υπολείμματα επανεκχυλίστηκαν επιπλέον τρεις φορές ακολουθώντας την ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη. Έπειτα ακολούθησε εξάτμιση των εκχυλισμάτων υπό κενό κάτι το οποίο οδήγησε στη δημιουργία ενός εναιωρήματος το οποίο στη

συνέχεια διαλυτοποιήθηκε σε 30ml MetOH/H₂O (1:1) και φυγοκεντρήθηκε για 10min σε 7000rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης ακολούθησε εκχύλιση του υπερκεείμενου υγρού με πετρελαϊκό αιθέρα (3×30ml), ώστε να απομακρυνθούν τα λιπίδια, και το υγρό συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το διάλυμα που παραλήφθηκε μετά την συμπύκνωση χύθηκε σε 30ml άλμης και εκχυλίστηκε επανειλημμένα με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc, 4×30ml). Έτσι, όλα τα σάκχαρα παρέμειναν στην υδατική φάση. Τέλος τα συνθετικά οργανικά στρώματα ξηράθηκαν με άνυδρο θειικό μαγνήσιο και εξατμίστηκαν υπό κενό. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες διεξήχθησαν απουσία ηλιακού φωτός, σε θερμοκρασίες κάτω από 35°C (Apostolou A., 2013).

6.3 Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κουνελιών ποικιλίας *oryctolagus cuniculus*

Η απομόνωση της *RMGPb* έγινε από σκελετικούς μύες κουνελιών βασιζόμενοι στη μέθοδο των *Fischer* και *Krebs* χρησιμοποιώντας β-μερκαπτοαιθανόλη έναντι L-κυστεΐνης (*Fischer and Krebs, 1962*). Οι προσδεδεμένοι νουκλεοζίτες απομακρύνθηκαν από το ένζυμο όπως περιγράφεται από τους *A. E. Melpidou* και *N. G. Oikonomakos* το 1983 (*Oikonomakos N. G. et al., 1983*)

Υλικά:

- 3 αρσενικοί κόνικλοι μετρίου μεγέθους ποικιλίας *Oryctolagus cuniculus*
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50mM β-φωσφογλυκερόλης/*HCl*, 50mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1mM *EDTA*, 0.5mM *DTT*-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (*KHCO₃*)
- Διάλυμα οξικού οξέος *CH₃COOH* 1N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90%, 3.6M
- Ρυθμιστικό διάλυμα *Tris* [τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου]/*HCl* 0.001M] (pH 7.5)
- Διάλυμα *Tris* 2.0M (αρρυθμιστου pH)
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M, (pH 7.0)
- Διάλυμα *EDTA* (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M, (pH 7.0)
- Διάλυμα *AMP* (5'-φωσφορική αδενοσίνη) 0.1M, pH 7.0
- Διάλυμα (*CH₃COO*)₂Mg 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης⁹, sigma
- dH₂O

Όργανα:

- Φυγόκεντρος,
- Πεχάμετρο, Metrohm
- Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός, Spectronic® 20 Genesys™

⁹ Οι μεμβράνες διαπίδυσης επέστησαν επεξεργασία με 1% *NaCO₃* και 10mM *EDTA* στους 100°C. Πριν την χρήση και την αποθήκευση τους έγινε έκπλυση με απιονισμένο ύδωρ. Οι μεμβράνες αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα 20% αιθανόλης στους 4°C).

- Φασματοφωτόμετρο UV, Spectronic unicam Genesys 10uv
- Αναλυτικός ζυγός, Kern
- Χρονόμετρο
- Θερμενόμενος αναδευτήρας (Stirrer), Thermolyne
- Αναδευτήρας τύπου Vortex, MS2 minishaker IKA®

Πορεία της απομόνωσης και του καθαρισμού της πρωτεΐνης:

Βήμα 1^ο: Παραλαβή του μυϊκού ιστού, κατεργασία για την εκχύλιση του ενζύμου

Από τους τρεις κονίκλους αφαιρέθηκαν οι σκελετικοί μύες, οι οποίοι αλέσθηκαν με μηχανή του κιμά και ζυγίστηκαν. Στη συνέχεια ακολούθησαν τρεις εκχυλίσεις, εν ψυχρό, με απιονισμένο ύδωρ. Οι δύο πρώτες εκχυλίσεις πραγματοποιήθηκαν με όγκο διαλύματος ισάριθμο με το βάρος των μυών ενώ η τρίτη με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Η διήθηση του εκχυλίσματος κάθε φορά έγινε μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν επιτρέπεται να ξεπερνάει τα 30min. Το εκχύλισμα που συλλέχθηκε διηθήθηκε (φιλτραρίστηκε) μέσω υαλοβάμβακα ώστε να απομακρυνθούν οι λιπαρές ουσίες και τα αιωρούμενα σωματίδια.

Βήμα 2^ο: Οξίνη καταβύθιση για την κατακρήμνιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

Το pH του διαλύματος που παραλήφθηκε από το βήμα 1 ρυθμίστηκε στο 5.1-5.2 με την προσθήκη διαλύματος CH_3COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Έπειτα το εκχύλισμα αφέθηκε για 5min σε πάγο. Σε αυτό το στάδιο η θολερότητα του διαλύματος αυξήθηκε λόγω κατακρήμνισης πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση, σε 5000rpm, για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω αντλίας κενού Buchner, εν ψυχρό, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Έπειτα ακολούθησε ρύθμιση του pH του διηθήματος στο 6.8 με κορεσμένο διάλυμα $KHCO_3$ και το διήθημα ογκομετρήθηκε.

Βήμα 3^ο: Καταβύθιση με θειϊκό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίστηκε με θειϊκό αμμώνιο κορεσμού 41%, ύστερα από την προσθήκη θειϊκού αμμωνίου 90% με όγκο ίσο προς 0.837 για κάθε λίτρο ενζυμικού διαλύματος και στη συνέχεια το διάλυμα παρέμεινε στους 4°C για περίπου 16 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών το υπερκείμενο αποχύθηκε με την χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα που λάβαμε διαλυτοποιήθηκε στον ελάχιστον δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τέλος ακολούθησε διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος *Tris* 0.001M (pH 7.5), για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Μετά το πέρας της διαπίδυσης το διάλυμα συλλέχθηκε και ακολούθησε διαύγαση με φυγοκέντρηση στις 5500rpm για 30 λεπτά στους 0-4°C. Ακολούθησε προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων:

- Διάλυμα 2-μερκαπτοαιθανόλης (β-μερκαπτοαιθανόλης;) 0.3M, pH 7.0, όγκου ίσου με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος.
- EDTA 0.1M, pH 7.0 με όγκο ίσο με 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης
- Διάλυμα αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στο 8.8.

Το μίγμα επώαστηκε στους 37°C για μία ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστέθηκε διάλυμα CH₃COOH 1N για ρύθμιση του pH στο 7.0 και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 15000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 0-4°C και το υπερκείμενο (ενζυμικό διάλυμα) ογκομετρήθηκε.

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση του ενζύμου

Η κρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 1ml AMP 0.1M (pH 7.0) και (CH₃COO)₂Mg 1M (pH 7.0) ανά 100ml υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης [το AMP και το (CH₃COO)₂Mg διευκολύνουν την κρυστάλλωση]. Το μίγμα αφέθηκε στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες ώστε να ολοκληρωθεί η κρυστάλλωση της RMGPb. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε στους 30°C με όσο το δυνατό λιγότερο όγκο διαλύματος αραιώσης (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8)

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρήθηκε στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολούθησε η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH₃COO)₂Mg, όπως ακριβώς έγινε στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφέθηκε ώστε να κρυσταλλώσει στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6 ωρών. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης διετελέστηκαν για τουλάχιστον 4 φορές, και η τελευταία ανακρυστάλλωση πραγματοποιήθηκε απουσία AMP και (CH₃COO)₂Mg.

Βήμα 6^ο: Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της RMGPb αφού συλλέχθηκαν μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση, διαλυτοποιήθηκαν με επώαση στους 30°C. Ακολούθησε προσδιορισμός της ενζυμικής συγκέντρωσης με φωτομέτρηση του δείγματος σε μήκος κύματος 280nm. Τέλος προστέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης και το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύτηκε στους -20°C.

6.4 Παρασκευή γλυκογόνου 10%

Υλικά:

- Υάλινη ράβδος
- Ζωάνθρακας
- Γλυκογόνο (Glycogen from oyster type II)
- Δηθητικό χαρτί
- Υάλινα σωληνάκια
- dH₂O
- Αιθανόλη (absolute)

Όργανα:

- Φυγόκεντρος,
- Συσκευή διήθησης υπό κενό (Buchner),
- Συσκευή λυοφιλοποίηση *rotavap*, Thermo Scientific
- Αναλυτικός ζυγός, Kern
- Θερμενόμενος αναδευτήρας (Stirrer), Thermolyne
- Αναδευτήρας τύπου Vortex, MS2 minishaker IKA®

Πορεία:

1. 45gr γλυκογόνο διαλυτοποιούνται σε 900ml απιονισμένο ύδωρ με τη βοήθεια ανάδευσης με υάλινη ράβδο
2. Στο διάλυμα προστίθενται 2gr ζωάνθρακας και αναδεύεται για 10min με υάλινη ράβδο
3. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 5000rpm στους 8°C για 10min
4. Στο υπερκείμενο διάλυμα επαναπροστίθενται 2gr ζωάνθρακας και αναδεύεται για 10min με υάλινη ράβδο
5. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 5000rpm, στους 8°C για 10min
6. Στο υπερκείμενο διάλυμα επαναπροστίθενται 2gr ζωάνθρακας και αναδεύεται για 10min με υάλινη ράβδο
7. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 5000rpm, στους 8°C για 10min
8. Το υπερκείμενο διάλυμα φιλτράρεται με συσκευή διήθησης υπό κενό
9. Το διήθημα τοποθετείται σε πάγο και προστίθεται 1.5 όγκος απόλυτης αιθανόλης (όγκος αιθανόλης = όγκος διαλύματος γλυκογόνου × 1.5) και αφήνεται σε πάγο για 15min
10. Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 5000rpm, στους 4°C για 10min
11. Το υπερκείμενο αποχύνεται (αν είναι θολό φιλτράρεται) και το ίζημα φιλτράρεται υπό κενό και ξεπλένεται με απόλυτη αιθανόλη
12. Το ίζημα τοποθετείται σε συσκευή *rotavap* και λυοφιλοποιείται
13. Ζυγίζουμε το γλυκογόνο και προσθέτουμε ανάλογο όγκο απιονισμένου ύδατος ώστε να προκύψει διάλυμα 10% w/v

6.5 Κινητικές μελέτες έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου *b* που απομονώθηκε από τους σκελετικούς μύες των κονίκλων υποβλήθηκε σε κινητικές μελέτες με σκοπό τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου, τον προσδιορισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten*, της πιθανής αναστολής από φυτικά εκχυλίσματα, μέσω υπολογισμού της *IC₅₀* και τέλος έγινε προσδιορισμός της *K_i* για τις ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες. Επιπλέον τα φυτικά εκχυλίσματα μελετήθηκαν ως προς την πιθανή ανασταλτική δράσης τους έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα *HepG2*.

Υλικά:

- *RMGPb* η οποία απομονώθηκε από σκελετικούς μύες κονίκλων όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο §6.3
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Διάλυμα AMP 50mM
- Διάλυμα α-D-Glc-1-P (G1P) 400mM
- Διάλυμα εκχυλίσματος του προς μελέτη δείγματος
- Ασκορβικό οξύ
- Μολυβδαινικό αμμώνιο
- Οξικός ψευδάργυρος
- Sodium Dodecyl Sulfate SDS 1%
- Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 100%
- Hydrochloric acid (HCl) 10M
- Sodium hydroxide (NaOH) 10M
- Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM
- Γλυκογόνο 10%
- Ιμιδαζόλιο
- EDTA
- Χλωριούχο κάλιο (KCl)
- Γαλλικό οξύ (Gallic acid Monohydrate – Sigma)
- Καφεΐνη (Sigma)
- dH₂O

Όργανα:

- Υδατόλουτρο, με θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 30°C, WiseBath, Wisd
- Πεχάμετρο, Metrohm
- Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός, Spectronic® 20 Genesys™
- Φασματοφωτόμετρο UV, Spectronic unicam Genesys 10uv
- Αντλία
- Αναδευτήρας τύπου Vortex, MS2 minishaker IKA®
- Αναλυτικός ζυγός, Kern
- Πιπέτες, LabMate
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
- Χρονόμετρο

- Θερμενόμενος αναδευτήρας, Thermolyne

6.5.1 Παρασκευή ενζυμικού διαλύματος.

Σε ένα σωληνάκι προστέθηκαν 1ml ρυθμιστικού διαλύματος αραίωσης ενζύμου 50:50:1 pH 6.8 και ~ 5 έως 10μl από το ένζυμο που είχε απομονωθεί. Στη συνέχεια με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου UV πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του ενζύμου στο σωληνάκι μετρώντας την απορρόφηση του διαλύματος στα 280nm. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος αραίωσης ενζύμου 50:50:1 pH 6.8. Η απορρόφηση που λήφθηκε από το δείγμα διαιρέθηκε με το 1.32 (συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ενζύμου) ώστε να υπολογιστεί η περιεκτικότητα του ενζύμου στο διάλυμα. Δηλαδή έχει υπολογιστεί ότι η τιμή 1.32 της απορρόφησης στα 280nm είναι ίση με 1mg/ml (Steiner R. F. et al., 1976). Η περιεκτικότητα του ενζύμου έπρεπε να ανέρχεται περίπου στα 500μg/ml. Έπειτα, κάθε φορά, ανάλογα με την περιεκτικότητα του διαλύματος υπολογιζόταν η αραίωση που έπρεπε να πραγματοποιηθεί ώστε τελικά η συγκέντρωση του ενζύμου στο ενζυμικό διάλυμα να ήταν 25μg/ml. Επομένως, το ενζυμικό διάλυμα με τελικό όγκο 1200μl έπρεπε να περιείχε:

- | | | |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - 120μl γλυκογόνο 10% - 60μl ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου 50:50:1 - Xμl RMGPb ~ 500μg/ml - (1200 – Xμl) dH₂O | | Τελικός όγκος ενζυμικού διαλύματος 1200μl |
|---|--|---|

Οι τελικές συγκεντρώσεις των παραπάνω συστατικών στον όγκο του ενζυμικού διαλύματος ήταν:

- | | | |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Γλυκογόνο 0.2% (w/v) - RMGPb 25μg/ml - Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου 5% (v/v) | | Τελικός όγκος ενζυμικού διαλύματος 1200μl |
|---|--|---|

6.5.2 Παρασκευή διαλυμάτων υπό μελέτη ουσιών.

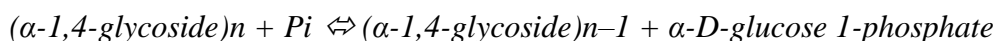
Τα φυτικά εκχυλίσματα διαλυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως (απρωτικό πολικό) διαλύτη το DMSO με σκοπό να λάβουμε ένα διάλυμα το οποίο δεν θα αποτελείται από αδιάλυτα σωματίδια. Η διαδικασία περιελάμβανε την ζύγιση ξηρής ποσότητας δείγματος, τη διαλυτοποίηση σε DMSO και τη ρύθμιση του pH στο 6-7 με τη βοήθεια πεχαμετρικού χαρτιού.

Το γαλλικό οξύ (Gallic acid monohydrate) και η καφεΐνη διαλυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως διαλύτη dH₂O. Η διαδικασία περιελάμβανε την ζύγιση ποσότητας αντιδραστηρίου, τη διαλυτοποίηση σε dH₂O και τη ρύθμιση του pH στο 6-7 με τη βοήθεια πεχαμετρικού χαρτιού.

6.5.3 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρώματος 1-φωσφορικής γλυκόζης

Η φωσφορυλάση καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου (α-1,4-glycoside)*n* προς (α-1,4-glycoside)*n*-1 με την απελευθέρωση 1-φωσφορική γλυκόζης

(α -D-glucose 1-phosphate), όπου n ο αριθμός των κατάλοιπων της γλυκόζης (Livanova N. B. 2002).



Στο πειραματικό μέρος διεξήχθη η **αντίθετη** αντίδραση κατά την οποία το ένζυμο προσθέτει μόρια 1-φωσφορική γλυκόζης στο γλυκογόνο με αποτέλεσμα την απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων (Pi) τα οποία μπορούν να προσδιοριστούν φασματοφωτομετρικά (βλ. εδάφιο §6.5.4.1).

Για την παρασκευή των υποστρωματικών διαλυμάτων GIP αρχικά έπρεπε να παρασκευαστούν δύο ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία περιείχαν τα παρακάτω:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 1: Ιμιδαζόλιο 200mM, KCl 400mM, DTT 4mM, EDTA 4mM, pH 6.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα¹⁰ 2: Ιμιδαζόλιο 135mM, KCl 270mM, DTT 2.7mM, EDTA 2.7mM, pH 6.8

Από το πυκνό διάλυμα GIP με συγκέντρωση 400mM παρασκευάστηκε GIP με συγκέντρωση 90mM χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα 1 και απιονισμένο νερό (dH_2O) σύμφωνα με τις κατάλληλες αναλογίες ώστε τελικά το διάλυμα να περιέχει ιμιδαζόλιο 135mM, KCl 270mM, DTT 2.7mM, EDTA 2.7mM, pH 6.8. Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις GIP που χρησιμοποιήθηκαν στις κινητικές μελέτες προήλθαν με αραιώση από το διάλυμα GIP με συγκέντρωση 90mM. Σε αυτή την περίπτωση η αραιώση έγινε με το ρυθμιστικό διάλυμα 2.

Πιο συγκεκριμένα:

- GIP 90mM: 225μl GIP 400mM + 675μl ρυθμιστικό διάλυμα 1 + 100μl dH_2O

Ανάλογα με πόσες διαφορετικές συγκεντρώσεις πιθανού αναστολέα ή φυτικού εκχυλίσματος θέλαμε να μελετήσουμε, παρασκευάσαμε τόσα διαλύματα υποστρωμάτων. Επίσης παρασκευάσαμε και ένα διάλυμα υποστρώματος, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως *control* και δεν περιείχε ποσότητα από το φυτικό εκχύλισμα ή τον αναστολέα και ο αντίστοιχος όγκος συμπληρώθηκε με νερό ή $DMSO$ ανάλογα με την περίπτωση, όπως θα περιγράψουμε παρακάτω. Επομένως τα διαλύματα υποστρωμάτων παρασκευάστηκαν ως εξής:

- | | | |
|---------------------------------|--|-------------|
| - 200μl α -D-Glc-1-P 5mM | | Όγκος 720μl |
| - 18μl AMP 50Mm | | |
| - 5μl υπό μελέτη ουσίας | | |
| - dH_2O έως τα 720μl | | |

Οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών των διαλυμάτων των υποστρωμάτων στον όγκο της αντίδρασης (900μl) ήταν:

- | | | |
|---------------------------|--|--------------------------------|
| - α -D-Glc-1-P 5mM | | Τελικός όγκος αντίδρασης 900μl |
|---------------------------|--|--------------------------------|

¹⁰ Το ρυθμιστικό διάλυμα 2 παρασκευάστηκε με αραιώση από το ρυθμιστικό διάλυμα 1

- AMP 1.0mM
- Ζυγ/ml υπό μελέτη ουσίας

Οι υπολογισμοί για τα φυτικά εκχυλίσματα έγιναν έτσι ώστε στον όγκο της αντίδρασης η συγκέντρωση του DMSO να είναι 2%.

6.5.4 Πειραματική διαδικασία

Το ενζυμικό διάλυμα (βλ. εδάφιο § 6.5.1) επώαστηκε για 15 λεπτά στους 30°C ενώ τα διαλύματα υποστρωμάτων (βλ. εδάφιο § 6.5.3) τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο περίπου 3 λεπτά πριν το τέλος της χρονικής διάρκειας επώασης του ενζυμικού διαλύματος. Τα διαλύματα υποστρώματος παρασκευάστηκαν κατά την διάρκεια επώασης του ενζύμου ώστε μετά το πέρας των 15 λεπτών το ένζυμο και τα υποστρώματα να είναι έτοιμα για την διεξαγωγή του πειράματος. Η 1-φωσφορική γλυκόζη προστέθηκε στα διαλύματα υποστρωμάτων λίγο πριν την τοποθέτησή τους στο υδατόλουτρο, ώστε να αποφευχθεί όσο το δυνατόν περισσότερο, η φυσική της υδρόλυση. Μετά το πέρας της επώασης μεταφέρθηκαν 180μl από το ενζυμικό μίγμα στο δοκιμαστικό σωλήνα υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Στις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση είχαμε: 5.0μg ένζυμου ανά ml, 1.0mM AMP, 0.2% (w/v) γλυκογόνο, υπόστρωμα α-D-Glc-1-P 1mM, 50mM υδροχλωρικής τριαιθανολαμίνης, 100mM KCl και 1mM DTT. Η θερμοκρασία ανερχόταν στους 30°C και το pH στο 6.8. Ανά χρονικό διάστημα ενός λεπτού έγινε λήψη δείγματος των 200μl από το μίγμα αντίδρασης και προσθήκη σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 50μl SDS 1.0% (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται) και ακολούθησε έντονη ανάδευση με vortex ώστε να επιτευχθεί η εξ ολοκλήρου αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Τέλος, επετεύχθη φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός φωσφορικών (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο του ασκορβικού οξέος, όπως αναφέρεται στο εδάφιο §6.5.4.1. Εκτός από τα δείγματα διεξήχθη προσδιορισμός και σε τυφλούς μάρτυρες ως προς α-D-Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης), φωσφορικών (λόγω της παρουσίας φωσφορικών), φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b.

Οι τυφλοί μάρτυρες παρασκευάστηκαν ως εξής:

- Νερού: 50μl SDS 1%, 200μl dH₂O
- Ενζύμου: 50μl SDS 1%, 160μl dH₂O, 40μl RMGPb με συγκέντρωση 25μg/ml
- Glc 1-phosphate: 50μl SDS 1%, 150.6 dH₂O, 44.4μl GIP με συγκέντρωση 90mM (στον προσδιορισμό της K_M) ή 9mM (στον προσδιορισμό της IC₅₀)
- Φωσφορικών: 50μl SDS 1%, 150μl dH₂O, 50μl Pi με συγκέντρωση 1mM

Για το γαλλικό οξύ και την καφεΐνη δεν πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός τυφλών μαρτύρων, διότι στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν καμία από τις δύο ουσίες δεν δίνει σήμα απορρόφησης στα 850nm. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος GraFit (βλ. εδάφιο §6.6).

6.5.4.1 Προσδιορισμός του φωσφόρου

Μέθοδος ασκορβικού οξέος (Saheki et al, 1985)

Η μέθοδος για την ανίχνευση του φωσφόρου στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850nm.

Υλικά:

(Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάστηκαν την ίδια μέρα που θα εκτελέστηκε το πείραμα):

Διάλυμα μολυβδαινίου, pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15mM και οξικό ψευδάργυρο 100mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με αμιζών HCl 10N.

Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N. Ανάμιξη 4:1 όγκου αντιδραστήριου μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος. Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από **15min** από την παρασκευή του (δλδ. ανάμιξη) και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

Πορεία:

Στα δείγματα που λάβαμε από το κινητικό πείραμα προστέθηκαν 2.5ml από το παραπάνω αντιδραστήριο. Μετά από ισχυρή ανάμιξη με vortex οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 30° C για **15min**. Ακολούθησε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος 850nm. Επίσης πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών και των υπόλοιπων τυφλών μαρτύρων που αναφέρονται στο εδάφιο §6.5.4.

(Saheki et al, 1985)

6.5.5 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας

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

6.5.6 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_M)

Πριν από περίπου 100 χρόνια οι Michaelis και Menten δημοσίευσαν την πλέον κλασική δημοσίευση (Michaelis L., Menten M. L., 1913), μέσα από την οποία έδειξαν ότι ο ρυθμός μιας ενζυματικά καταλυόμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται από την εξίσωση Michaelis-Menten, είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Οι μελέτες των Michaelis και Menten έγιναν χρησιμοποιώντας το ένζυμο ιμπερτάση (Johnson K. A., et al., 2011).

Για μία ενζυμική αντίδραση του τύπου:



Όπου:

K_D σταθερά διαστάσεως του συμπλόκου ES ¹¹ (1/mol ή 1/M)

k_{cat} σταθερά ταχύτητας καταλύσεως

E ένζυμο

S υπόστρωμα

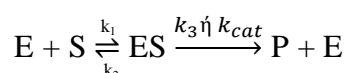
ES σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P προϊόν

Οι *Michaelis-Menten* κατέληξαν στη μαθηματική σχέση:

$$v = \frac{k_{cat}[E_0][S]}{K_D + [S]} \quad (7)$$

Στην πραγματικότητα όμως η εξίσωση που έχει βαπτιστεί ως *Michaelis-Menten* δεν είναι η παραπάνω και προέρχεται από την υπόθεση της σταθεροποιημένης καταστάσεως *Briggs* και *Haldane*, σύμφωνα με την οποία μετά την ανάμιξη των αντιδρώντων η ταχύτητα διασπάσεως του ES αυξάνει γρήγορα και πολύ σύντομα φθάνει την ταχύτητα σχηματισμού του, δημιουργώντας *σταθεροποιημένη κατάσταση*¹² (*steady-state*) για την αντίδραση



Όπου k_1 , k_2 , k_3 , οι σταθερές των αντίστοιχων αντιδράσεων

Ως σταθερά *Michaelis-Menten* (K_M) ορίζεται ο λόγος $\frac{k_2 + k_3}{k_1}$

Η εξίσωση των *Michaelis-Menten* που αποτελεί θεμέλιο της κινητικής των ενζύμων και προκύπτει από την υπόθεση της σταθεροποιημένης καταστάσεως είναι η παρακάτω:

$$v = \frac{k_3[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

¹¹ K_D , ...

¹² Στη σταθεροποιημένη κατάσταση για το σύμπλοκο ES . Το σύμπλοκο ES διατηρεί σχεδόν σταθερή τη συγκέντρωση του, ενώ για το ίδιο χρονικό διάστημα παρατηρείται σημαντική μεταβολή των απόλυτων τιμών των συγκεντρώσεων $[S]$ και $[P]$, γεγονός που συνεπάγεται ότι $d[ES]/dt = 0$.

Όπου $[E_0]$ η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου

(Κλώνης Ι., 2006)

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς των *Michaelis-Menten* αρχικά, παρασκευάσαμε το ενζυμικό διάλυμα όπως περιγράφεται στο εδάφιο §6.5.1. Το ενζυμικό διάλυμα στη συνέχεια επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 30°C για 15 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του γλυκογόνου με το ένζυμο. Η παρασκευή των διαλυμάτων υποστρώματος έγινε όπως περιγράφεται στο εδάφιο §6.5.3. Για τον προσδιορισμό της σταθεράς *Michaelis-Menten* τα διαλύματα υποστρωμάτων δεν περιείχαν ποσότητα από τις υπό μελέτη ουσίες και ο αντίστοιχος όγκος συμπληρώθηκε με dH_2O (502μl). Ο προσδιορισμός έγινε χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης: 9mM, 18mM, 27mM, 45mM και 90mM ώστε τελικά σε όγκο 900μl, όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση να έχουμε 2mM, 4mM, 6mM, 10mM, 20mM 1-φωσφορικής γλυκόζης

Glc 1-phosphate (G1-P)	G1-P 90mM	Assay buffer 2
G1-P 9mM	200μl	1800 μl
G1-P 18mM	400 μl	1600 μl
G1-P 27mM	600 μl	1400 μl
G1-P 45mM	1000 μl	1000 μl

Οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών των διαλυμάτων των υποστρωμάτων στον όγκο της αντίδρασης ήταν:

- α-D-Glc-1-P 2,4,8,10,20mM	Τελικός όγκος αντίδρασης 900μl
- AMP 1.0mM	

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτυπώνεται στο εδάφιο § 6.5.4.

6.5.7 Προσδιορισμός IC_{50} .

Με τον όρο IC_{50} εννοούμε την συγκέντρωση εκείνη του αναστολέα όπου η δραστηριότητα του ενζύμου σε μια πειραματική δοκιμή μειώνεται κατά 50%. Η τιμή της IC_{50} εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου (ή του μορίου-στόχου), του αναστολέα και του υποστρώματος (ή προσδέτη) παράλληλα με τις συνθήκες όπου πραγματοποιείται το πείραμα (Cer R. Z., et al., 2009).

6.5.7.1 Προσδιορισμός IC_{50} για τα φυτικά εκχυλίσματα

Αρχικά παρασκευάσαμε το ενζυμικό διάλυμα όπως περιγράφεται στο εδάφιο §6.5.1 και τα διαλύματα των υπό μελέτη ουσιών όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο §6.5.2. Το ενζυμικό διάλυμα στη συνέχεια επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 30°C για 15 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του γλυκογόνου με το ένζυμο. Η παρασκευή των υποστρωματικών διαλυμάτων έγινε όπως περιγράφεται στο εδάφιο §6.5.3. Ο προσδιορισμός έγινε σε σταθερή συγκέντρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης, 2mM, και διαφορετικές συγκεντρώσεις της υπό μελέτη ουσίας. Το *control* περιείχε 200μl 1-φωσφορική γλυκόζης 9mM, 18μl AMP 50mM, 484μl dH_2O και 18μl DMSO 100%. Έτσι, στον όγκο της αντίδρασης (900μl) είχαμε 2mM 1-φωσφορική γλυκόζη, 1mM

AMP και 2% DMSO. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν για κάθε εκχύλισμα αναφέρονται στον πίνακα 5 και η διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτυπώνεται στο εδάφιο §6.5.4.

Επομένως τα διαλύματα υποστρωμάτων παρασκευάστηκαν ως εξής:

- 200μl α-D-Glc-1-P 9mM		Όγκος 720μl
- 18μl AMP 50mM		
- 18μl φυτικού εκχυλίσματος Y $\frac{\mu g}{ml}$		
διαλυμένο σε DMSO 100%		

Οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών των διαλυμάτων των υποστρωμάτων στον όγκο της αντίδρασης ήταν:

- α-D-Glc-1-P 2mM		Τελικός όγκος αντίδρασης 900μl
- AMP 1.0mM		
- DMSO 2%		
- Z $\frac{\mu g}{ml}$ υπό μελέτη ουσίας		

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτυπώνεται στο εδάφιο § 6.5.4.

6.5.7.2 Προσδιορισμός IC₅₀ γαλλικού οξέος

Αρχικά παρασκευάσαμε το ενζυμικό διάλυμα όπως περιγράφεται στο εδάφιο §6.5.1 και τα διαλύματα των υπό μελέτη ουσιών όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο §6.5.2. Το ενζυμικό διάλυμα στη συνέχεια επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 30°C για 15 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του γλυκογόνου με το ένζυμο. Η παρασκευή των διαλυμάτων υποστρώματος έγινε όπως περιγράφεται στο εδάφιο §6.5.3. Ο προσδιορισμός έγινε σε σταθερή συγκέντρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης, 2mM, και διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος. Το δείγμα *control* περιείχε 200μl 1-φωσφορική γλυκόζη 9mM, 18μl AMP 50mM και 502μl dH₂O. Έτσι, στον όγκο της αντίδρασης (900μl) είχαμε 2mM 1-φωσφορική γλυκόζη και 1mM AMP. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν για το γαλλικό οξύ αναφέρονται στον πίνακα 5 και η διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτυπώνεται στο εδάφιο §6.5.4.

Επομένως τα διαλύματα υποστρωμάτων παρασκευάστηκαν ως εξής:

- 200μl α-D-Glc-1-P 9mM		Όγκος 720μl
- 18μl AMP 50mM		
- Xμl φυτικού εκχυλίσματος ΦmM		

Οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών των διαλυμάτων των υποστρωμάτων στον όγκο της αντίδρασης ήταν:

- α-D-Glc-1-P 2mM		Τελικός όγκος αντίδρασης 900μl
- AMP 1.0mM		
- ZmM γαλλικού οξέος		

6.5.8 Προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής ενός ενζύμου (K_i)

Όταν το ένζυμο βρίσκεται σε αναστολή εξακολουθεί να υπακούει στην κινητική των *Michaelis* και *Menten*, όπως απουσία αναστολέα, με τη διαφορά ότι για την σταθερά K_M και τη μέγιστη ταχύτητα V_{max} διαμορφώνονται νέες τιμές, οι οποίες ονομάζονται φαινομενικές (*apparent values*) (Κλώνης Ι., 2006) και παρακάτω θα συμβολίζονται ως $K_{M(app.)}$ και $V_{max(app.)}$. Η φαινομενικές τιμές προσδιορίζονται ώστε τελικά να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της σταθεράς αναστολής K_i (*inhibitory constant*).

6.5.8.1 Προσδιορισμός K_i γαλλικού οξέος.

Για τον προσδιορισμό της K_i του γαλλικού οξέος έπρεπε αρχικά να υπολογίσουμε τις $K_{M(app.)}$ για τις επιθυμητές συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος οι οποίες ήταν: $1mM$, $3mM$ και $7mM$. Επίσης διεξήχθη και κινητική μελέτη απουσία γαλλικού οξέος (K_M). Ο προσδιορισμός της K_i έγινε κάθε φορά σε σταθερή συγκέντρωση του αναστολέα και διαφορετικές συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης. Οι συγκεντρώσεις της 1-φωσφορικής γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκαν στις παρούσες ενζυμικές αντιδράσεις ήταν $2mM$, $4mM$, $6mM$, $10mM$, $20mM$ στον όγκο της αντίδρασης.

Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στο *εδάφιο* §6.5.4

6.5.8.2 Προσδιορισμός K_i καφεΐνης.

Για τον προσδιορισμό της K_i της καφεΐνης, αρχικά έγινε προσδιορισμός της K_M του ενζύμου και στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι $K_{M(app.)}$ σε $0.5mM$, $1mM$ και σε $2mM$ καφεΐνης. Όπως και προηγουμένως κάθε φορά η συγκέντρωση του αναστολέα διατηρούταν σταθερή ενώ οι συγκεντρώσεις της 1-φωσφορικής γλυκόζης ήταν διαφορετικές. Οι συγκεντρώσεις της 1-φωσφορικής γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτές τις ενζυμικές αντιδράσεις ήταν $2mM$, $4mM$, $6mM$, $10mM$, $20mM$ στον όγκο της αντίδρασης.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτυπώνεται στο *εδάφιο* § 6.5.4.

6.5.9 Εύρεση του είδους της αναστολής αναστολής

6.5.9.1 Έλεγχος συναγωνισμού για το κέντρο αναστολής

Μία καλά μελετημένη ουσία η οποία γνωρίζουμε ότι προσδένεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου, είναι η καφεΐνη. Επομένως, η διεξαγωγή μιας σειράς κινητικών πειραμάτων στα οποία η συγκέντρωση του ενός αναστολέα μένει σταθερή ενώ του δεύτερου αλλάζει, θα μας δείξει αν οι δυο αναστολείς συναγωνίζονται για την ίδια θέση πρόσδεσης του ενζύμου. Στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος έμενε κάθε φορά σταθερή ενώ κάθε φορά υπήρχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις καφεΐνης. Οι συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος που μελετήθηκαν ήταν: $0mM$, $0.5mM$, $1mM$, $2mM$, $4mM$. Επομένως οι κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν υπό τις εξής συνθήκες:

- α -D-Glc-1-P $2.5mM$
- AMP $1.0mM$

Τελικός όγκος αντίδρασης $900\mu l$

- 2mM γαλλικού οξέος (σταθερή κάθε φορά)
- 0.1mM, 0.2mM, 0.4mM, 0.8mM καφεΐνης

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτυπώνεται στο εδάφιο 6.5.4.

6.5.9.2 Έλεγχος συναγωνισμού για το κέντρο σύνδεσης AMP

Για να ελέγξουμε αν το γαλλικό οξύ προσδέεται στο κέντρο πρόσδεσης του AMP σχεδιάσαμε μια σειρά κινητικών πειραμάτων ώστε να δούμε αν το γαλλικό οξύ και το AMP συναγωνίζονται για την ίδια θέση πρόσδεσης στο ένζυμο. Στα πειράματα αυτά διατηρήσαμε σταθερή τη συγκέντρωση του AMP για κάθε πείραμα, ενώ υπήρχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος. Οι συγκεντρώσεις του AMP που μελετήθηκαν ήταν 0.1mM, 0.2mM και 1mM. Επομένως οι κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν υπό τις εξής συνθήκες:

- | | |
|--|--------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - α-D-Glc-1-P 2.5mM - AMP XmM (σταθερή κάθε φορά) - 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 4mM γαλλικού οξέος | Τελικός όγκος αντίδρασης 900μl |
|--|--------------------------------|

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτυπώνεται στο εδάφιο 6.5.4.

6.5.9.3 Έλεγχος συναγωνισμού για το καταλυτικό κέντρο

Για να ελέγξουμε την πιθανότητα σύνδεσης του γαλλικού οξέος στο καταλυτικό κέντρο έπρεπε να διεξάγουμε μια σειρά κινητικών πειραμάτων ώστε να δούμε αν το γαλλικό οξύ συναγωνίζεται για το καταλυτικό κέντρο την γλυκόζη, η οποία αποτελεί τον φυσικό προσδέτη του ενζύμου. Στα πειράματα αυτά η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος διατηρήθηκε σταθερή, ενώ οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης διέφεραν. Οι συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος που μελετήθηκαν ήταν 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM, 4mM. Επομένως οι κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν υπό τις εξής συνθήκες:

- | | |
|--|--------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> - α-D-Glc-1-P 2.5mM - AMP 1mM - XmM γαλλικού οξέος (σταθερό κάθε φορά) - 2.5mM, 5mM, 10mM, 20mM α-D-glucose | Τελικός όγκος αντίδρασης 900μl |
|--|--------------------------------|

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτυπώνεται στο εδάφιο 6.5.4.

6.6 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα GraFit

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της α-D-Glc-1-P και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό μείγμα) μετατράπηκαν σε μιοl φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_M , mol) χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Michaelis-Menten,

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

v : ταχύτητα

V_{\max} : μέγιστη ταχύτητα

$[S]$: συγκέντρωση υποστρώματος

K_M : σταθερά *Michaelis-Menten*.

Τέλος, γίνεται η καμπύλη $V=f([S])$, η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ του V_{\max} . Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα.

6.7 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων GPb

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

Το διάλυμα του ενζύμου υπέστη διαπίδυση έναντι διαλύματος $10mM$ *BES* (pH 6.7) για περίπου $16h$. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κατεργασία με ενεργό ζωάνθρακα για την απομάκρυνση των νουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση του ενζυμικού διαλύματος σε μήκη κύματος $260nm$ και $280nm$. Ο λόγος των δύο απορροφήσεων (A_{260}/A_{280}) πρέπει να είναι <0.53 .

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Έτσι δίδεται χρόνος στην πρωτεΐνη να οργανωθεί σε κρυστάλλους και όχι σε άμορφο ίζημα. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (*T state*) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο *batch*. Η μέθοδος *batch* 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 $P4_32_12$) εντός γυάλινων σωλήνων.

Υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα *BES*, σουλφονικό άλας του N,N -δις(2-υδροξυαιθυλο)-2-αμινοαιθανίου ($10mM$ *BES*, $1mM$ *EDTA* 2% NaN_3 , $2mM$ *DTT* pH 6.7)

- Διάλυμα *DTT* 200mM, pH 6.7
- Διάλυμα σπερμίνης 200mM, pH 6.7
- Διάλυμα *IMP* 100mM, pH 6.7
- Πυρήνες κρυστάλλωσης
- Εναιώρημα *GPb* περιεκτικότητας 20-30mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα *BES*.
- Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3mm, μήκους 3cm.

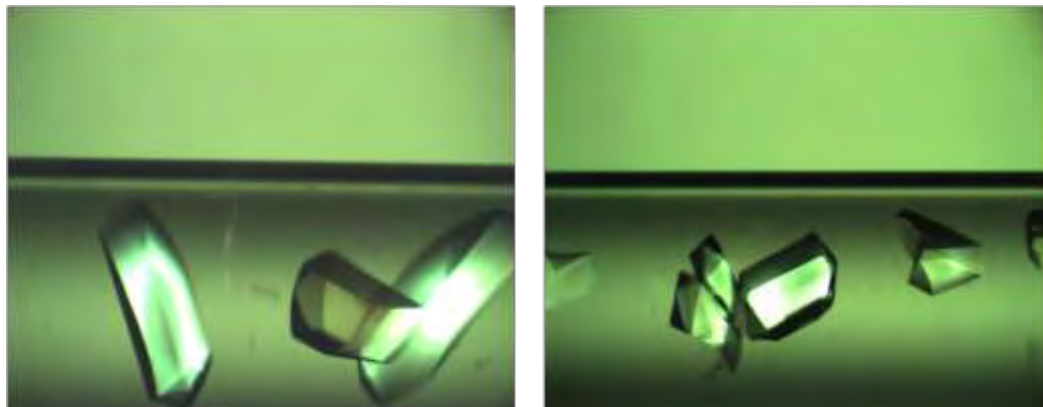
Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο *UV*

Πορεία:

Για την ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων (ομάδας συμμετρίας χώρου $P4_32_12$) της *GP* χρησιμοποιείται η στατική μέθοδος (*batch method*). Το ένζυμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από *AMP* ($A_{260}/A_{280} = 0.53$). 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 3cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3mm, των οποίων τα δύο άκρα κλείνονται με *parafilm*.

Οι κρύσταλλοι της φυσικής *T* διαμόρφωσης της *GPb* αναπτύσσονται από μίγμα 20-30mg/ml καθαρής πρωτεΐνης, 1mM σπερμίνης, 3mM *DTT*, 10mM *BES/HCl* (pH 6.7), 0.1mM *EDTA* και 0.02% (w/v) NaN_3 στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραίωσης. Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 h στους 16°C, 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 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.



Εικόνα 28: Τετραγωνικοί κρύσταλλοι της *GPb* στην *T* διαμόρφωση

Οι κρύσταλλοι αυτοί είναι ισόμορφοι με τους κρυστάλλους που αναπτύσσονται παρουσία οξικού μαγνησίου αντί σπερμίνης. Συνήθως το μέγεθος αυτών είναι 0.2-0.5mm, 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: $I = I_0 \cdot e^{-\mu t}$

6.7.1 Σχηματισμός συμπλόκου κρυστάλλου-αναστολέα για κρυσταλλογραφική μελέτη.

Υλικά:

- Διάλυμα αναστολέα
- Κρύσταλλοι *GPb*
- Ρυθμιστικό διάλυμα *BES* (10mM *BES*, 1mM *EDTA* 2% *NaN₃*, 2mM *DTT* pH 6.7)
- Τριχοειδείς σωλήνες (διαμέτρου 1.0, 2.0 mm)
- Κερί
- Σύριγγες

Όργανα:

- 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.

6.7.2 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:

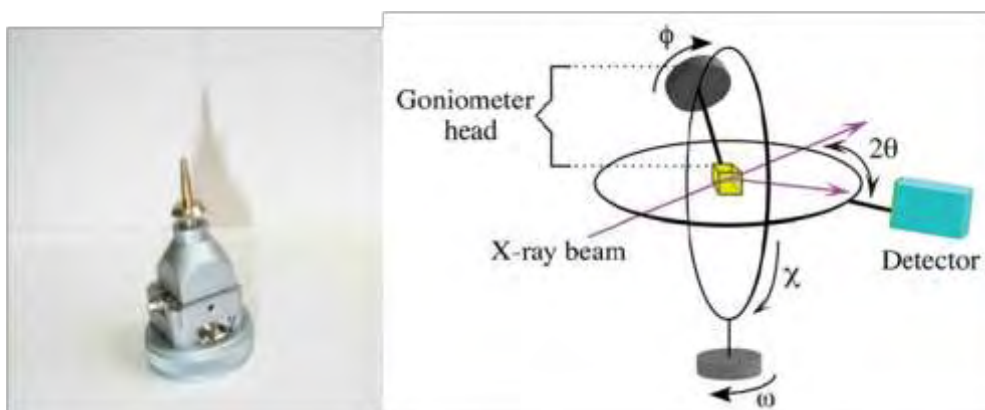
- Μονοκρύσταλλος

Όργανα:

- Πηγή ακτίνων-X
- Ανιχνευτής πεδιάς
- Γωνιόμετρο (εικόνα 29)

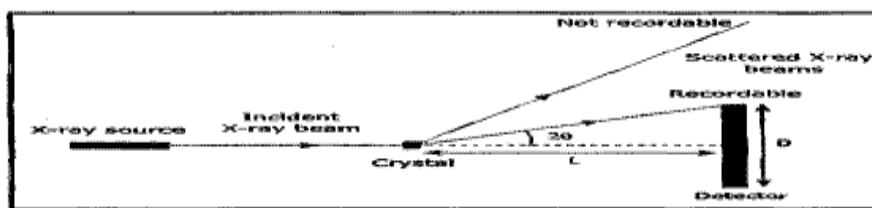
Πορεία:

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 29: Αριστερά φαίνεται ο τριχοειδής σωλήνας τοποθετημένος στο γωνιόμετρο. Δεξιά παρατηρούμε ένα σύστημα γωνιών σε πείραμα περίθλασης. Ο κρύσταλλος στο κέντρο είναι τοποθετημένος στην κορυφή (head) του γωνιομέτρου (Rhodes 2006)

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 30* παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της διάταξης του πειράματος περίθλασης ακτίνων-X.



Εικόνα 30: 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.

6.7.3 Επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων αποτελεί κυρίως τον υπολογισμό των χαρτών διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, $2F_o - F_c$, $F_o - F_c$ (F_o : ηλεκτρονιακή πυκνότητα που προκύπτει από πειραματικούς δομικούς παράγοντες, F_c : 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)

6.7.4 Κρυσταλλογραφική μελέτη του εκχυλίσματος ροδιού No.6 και του γαλλικού οξέος

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε κρυσταλλογραφική μελέτη της σύνδεσης στη φωσφορυλάση b του πολυφαινολικού εκχυλίσματος 6 από παραπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής χυμού από το φυτό ροδιά (*Punica Granatum L.*) 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 (βλ. εδάφιο §6.7) εμβαπτίστηκε (βλ. εδάφιο §6.7.1) σε διάλυμα αναστολέα που είχε αραιωθεί σε τελική συγκέντρωση 10mg/ml , 15% DMSO με $10\text{mM BES pH } 6.7$ 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.

Πίνακας 2: Στατιστικά στοιχεία συλλογής κρυσταλλογραφικών δεδομένων του συμπλόκου GPb- Εκχυλίσματος ροδιού

Πείραμα	Κρύσταλλοι GPb T διαμόρφωσης διαποτίζονται με διάλυμα 10mg/ml για 18h
Σταθμός συγχροτρικής ακτινοβολίας MAX-Lab, Lund, Σουηδία	ID911-2
Μήκος κύματος, λ (Å)	1.0402
Εύρος ταλάντωσης (°)	0.8
Αριθμός περιθλασιγραμμμάτων	70
Ομάδα χώρου συμμετρίας	P4₃2₁2
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας a, b, c (Å)	128.9, 128.9, 116.5
Αριθμός μορίων/Ασύμμετρη μονάδα	1
Ευκρίνεια (Å)	2.15
Αριθμός περιθλάσεων	242483
Αριθμός ανεξάρτητων περιθλάσεων (Εξώτ. στοιβάδα)	50751 (3660)
R_{merge} (Εξωτερική στοιβάδα)*	0.111 (0.471)
Πληρότητα (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	99.5 (99.7)
Εύρος εξωτερικής στοιβάδας (Å)	2.27-2.15
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ (Εξωτερική στοιβάδα)**	9.7 (3.7)
Πολλαπλότητα (Εξωτερική στοιβάδα)	4.5 (4.4)
Τιμή συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Wilson plot)	30.4

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

** $\sigma(I)$ είναι η τυπική απόκλιση του I .

Ακολούθησαν πολλαπλοί κύκλοι διόρθωσης του μοντέλου με το πρόγραμμα *COOT* (Lohkamp B., & Kevin Cowtan, 2005) 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, διεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πακέτο προγραμμάτων *CCP4*. Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση ατομικών συντεταγμένων (*positional refinement*) και ακολούθησε βελτιστοποίηση του ατομικού ιστροπικού 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*. Οι δείκτες αξιοπιστίας από την τελευταία βελτιστοποίηση καθώς και η γεωμετρία του τελικού μοντέλου συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3: Παρουσίαση στατιστικών χαρακτηριστικών του τελικού μοντέλου GPb-εκχυλίσματος ροδιού

Βελτιστοποίηση (Ευκρίνεια) (Å)	23.9 - 2.15
Αριθμός ανακλάσεων που χρησιμοποιούνται (παραλείπονται) κατά την βελτιστοποίηση [#]	48032 (2719)
Αμινοξέα που περιελήφθησαν	12-254, 262-314, 324-836
Αριθμός πρωτεϊνικών ατόμων	6591
Αριθμός μορίων ύδατος	86
Αριθμός ατόμων υποκαταστατών	60
Τελική τιμή δείκτη αξιοπιστίας <i>R</i> (<i>R_{free}</i>)* (%)	17.0 (20.3)
<i>R</i> (<i>R_{free}</i>) (Εξωτερική στοιβάδα) (%)	21.8 (27.5)
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) του μήκους δεσμών (Å)	0.010
Μέση απόκλιση (r.m.s.d.) της γωνίας των δεσμών (°)	1.36
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (Πρωτεϊνικά άτομα)	
Όλα τα άτομα	30.9
Ca, C, N, O	28.3
Πλευρική αλυσίδα	33.4
Μέση τιμή του συντελεστή θερμοκρασίας B (Å ²) (ετεροάτομα)	
Μόρια ύδατος	25.5
Γαλλικό οξύ	29.9

* 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 εἴρη 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 3.3Å για τους δεσμούς υδρογόνου και 4.0Å για τις αλληλεπιδράσεις *van der Waals*. Τέλος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα γραφικών *PyMOL* για την μοριακή απεικόνιση τρισδιάστατων μακρομοριακών μορίων.

6.8. Ex vivo μελέτες

Υλικά:

- Πλαστικοί σωλήνες τύπου *flacon*
- Πλαστικά σωληνάκια
- *Bradford protein assay*
- Αλβουμίνη ορού βοδιού (*Bovine serum Albumine, BSA*)

- Δεξαμεθαζόνη, (*dexamethasone*, *DEX*)
- *Dimethyl sulfoxide (DMSO)*
- Ορός νεογέννητου βοός (*fetal bovine serum*, *FBS*)
- *L-γλουταμίνη*, *L-Glutamine*
- *NaCl*
- *phenylmethylsulfonyl fluoride*, *PMSF*
- Πενικιλίνη - Στρεπταμυκίνη
- **Θρεπτικό μέσο:** *dulbecco's modified eagle's medium*. *DMEM*
- Διάλυμα Θρυψίνης
- Πλαστικά σωληνάκια τύπου *ependorf*
- Φλάσκες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων
- *Σωλήνες βαθιάς κατάψυξης (Cryotube)s*
- Τρυβλία καλλιέργειας
- Ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα, **HepG2**

Όργανα:

- Θάλαμος καθέτου νηματικής ροής μικροβιολογικής ασφάλειας επιπέδου II
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Υδατόλουτρο
- Επωαστικός κλίβανος CO_2
- Vortex
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντροι
- Φασματοφωτόμετρο *Ορατού*

6.8.1 Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα απομακρύνονται από τους $-80^{\circ}C$, όπου βρίσκονται αποθηκευμένα σε *cryotubes*, και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, στους $37^{\circ}C$, ώστε να επιτευχθεί η απόψυξή τους. Στη συνέχεια το *cryotube* απομακρύνθηκε από το υδατόλουτρο, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του εξωτερικά με χρήση αιθανόλης 70% και τέλος τοποθετήθηκε στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε πλαστικό σωλήνα τύπου *falcon*, των 15ml, και ακολούθησε φυγόκεντρωση στις 1000rpm, σε θερμοκρασία δωματίου για 5min. Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρέθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε συνολικά σε 15ml θρεπτικού μέσου *DMEM* για φλάσκα T75. Το *DMEM* που χρησιμοποιήθηκε ήταν υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4,5 mg/ml), εμπλουτισμένο με 1% v/v 200mM *L-γλουταμίνη*, 1% v/v πενικιλίνη-στρεπταμυκίνη και 10% v/v *FBS*. Τα κύτταρα αφέθηκαν να επωαστούν σε κλίβανο στους $37^{\circ}C$ με συνθήκες υγρασίας 5% CO_2 .

6.8.2 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Όταν παρατηρήσαμε, με τη βοήθεια μικροσκοπίου, ότι ο κυτταρικός πληθυσμός κάλυψε περίπου το 80% του χώρου της χρησιμοποιούμενης φλάσκας, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργειας με τη χρήση θρυψίνης. Αρχικά απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας και έγινε προσθήκη 3ml διαλύματος θρυψίνης. Στη συνέχεια η φλάσκα τοποθετήθηκε πίσω στον κλίβανο στους $37^{\circ}C$ και έμεινε εκεί

για περίπου 3-4min. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα παρατηρήσαμε στο μικροσκόπιο ότι τα κύτταρα είχα αποκολληθεί από τον πάτο της φλάσκας. Έτσι, ακολούθησε αδρανοποίηση της θρυψίνης με την προσθήκη θρεπτικού μέσου *DMEM* (σε αναλογία όγκων ~5:1, θρεπτικό υλικό:διάλυμα θρυψίνης). Το εναιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρήθηκε για 5min σε 1000rpm στους 22°C και στη συνέχεια ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε 5ml θρεπτικού μέσου *DMEM*, με καλό πιετάρισμα, και στη συνέχεια επιστρέψαμε επιθυμητή ποσότητα κυττάρων στη φλάσκα με προσθήκη κατάλληλου όγκου θρεπτικού μέσου (1/5 για T75). Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO₂.

6.8.3 Ψύξη κυττάρων

Η διαδικασία αρχικά είναι ίδια με αυτή της θρυψινοποίησης. Όμως το ίζημα των κυττάρων μετά τη φυγοκέντρωση διαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο *FBS*. Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετείται σε *cryotubes* με αναλογία *FBS:DMSO*, 9:1. Η φλάσκα ανακινείται και αποθηκεύεται στους -80°C όσο πιο γρήγορα γίνεται. Το *DMSO* χρησιμεύει ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας για την αποφυγή δημιουργίας κρυστάλλων που πιθανώς να βλάψουν τα κύτταρα.

6.8.4 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε περιγράφεται στο άρθρο των *kantsadi et al., 2014*

Τα ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα *HepG2* καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο *DMEM*, το οποίο περιείχε 25mM γλυκόζη, 10% *FBS*, 2mM γλουταμίνη, και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 37°C σε υγραμένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Για την εκτίμηση της δραστηριότητας της *GPb* τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 100mm πυκνότητας 1.5·10⁶ ανά πιάτο. Μετά την προσκόλληση των κυττάρων (16-18h), το μέσο αντικαταστάθηκε με μέσο ελεύθερο ορού το οποίο περιείχε 10nM *DEX*, 25mM γλυκόζη, 10nM ινσουλίνη, και τα κύτταρα επώαστηκαν περαιτέρω 16-18h έτσι ώστε να γεμίσουν οι αποθήκες γλυκογόνου των κυττάρων. Έπειτα, τα κύτταρα επώαστηκαν για 1.5h παρουσία και απουσία (Κύτταρα μάρτυρες, control) των ποσοτήτων του εκχυλίσματος πολυφαινολών από το φυτό *Punica granatum L.* ποικιλίας "Wonderful" σε θρεπτικό μέσο άνευ ορού συμπληρωμένο με 5mM γλυκόζης και 10nM *DEX* (μέσο ανάπτυξης χαμηλό σε γλυκόζη). Ακολούθως, τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με *PBS* 1x και 1 φορά με ρυθμιστικό διάλυμα 150mM *NaCl*, 20mM *Tris* (pH 7.5). Τα κύτταρα μαζεύτηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα 150mM *NaCl*, 20mM *Tris* (pH 7.5) και φυγοκεντρήθηκαν στα 700g για 5min. Το ίζημα των κυττάρων που προέκυψε αποθηκεύτηκε στους -80°C. Την ημέρα της δοκιμασίας της *GPb*, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 20mM *Tris* pH 7.5, 0.05% *Triton*, 1mM *PMSF* και υποβλήθηκαν σε υπερήχους στον πάγο για 3-15min ώστε να επιτευχθεί το σπάσιμο των κυττάρων. Το κυτταρόλυμμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε σε μικροφυγόκεντρο στις 12000g για 30min. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο υπερκείμενο καθορίστηκε με τη

μέθοδο Bradford (*Bradford M. M., 1976*). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με υπολογισμούς που αναφέρονται στο *εδάφιο 6.8.4.3*.

Το εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαλυμένο σε *DMSO* 100%. Οι υπολογισμοί έγιναν με τέτοιο τρόπο ώστε η συγκέντρωση του *DMSO* στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων να μη ξεπερνάει το 0.2%. Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν: 0 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$ και 100 $\mu\text{g/ml}$.

6.8.4.1 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GPb.

Παρασκευή ενζυμικών διαλυμάτων:

Ο αριθμός των ενζυμικών διαλυμάτων που παρασκευάσαμε κάθε φορά, σχετίζονταν από το πόσες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος θέλαμε να μελετήσουμε. Αν παραδείγματος χάριν θέλαμε να μελετήσουμε 5 συγκεντρώσεις αναστολέα, τότε θα προετοιμάσουμε 6 ενζυμικά διαλύματα, γιατί πραγματοποιείται μελέτη και για ένα εκχύλισμα κυττάρων που δεν περιέχει αναστολέα (control).

Σε κάθε ένα από τα ενζυμικά διαλύματα προστίθενται:

- 66.6 μl γλυκογόνο 10% w/v
- 33.3 μl ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1
- Όγκο εκχυλίσματος κυττάρων, ανάλογα με το πόσο όγκο είχαμε κάθε φορά (~60-90 μl), στη συγκεκριμένη περίπτωση είχαμε 65 μl
- dH_2O ώστε ο όγκος να φτάσει τα 220 μl , στη συγκεκριμένη περίπτωση προσθέσαμε 55.1 μl

Παράλληλα με τα παραπάνω, παρασκευάσαμε και ένα δείγμα ελέγχου (τυφλό-*GIP*) το οποίο περιείχε:

- 66.6 μl γλυκογόνο 10% w/v
- 33.3 μl ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1
- 120 μl ddH_2O

Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στον όγκο της αντίδρασης (550 μl : 330 μl διαλύματος υποστρώματος + 220 μl ενζυμικού διαλύματος) ήταν 1.2%.

Διάλυμα υποστρώματος:

Το διάλυμα υποστρώματος αποτελείται από 1-φωσφορική γλυκόζη και dH_2O . Ανάλογα με το πόσες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος θέλουμε να μελετήσουμε, υπολογίζουμε και τον όγκο που θα έχει το διάλυμα υποστρώματος. Για κάθε ενζυμικό διάλυμα χρειαζόμαστε 330 μl διαλύματος υποστρώματος.

Η τελική συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στον όγκο της αντίδρασης (550 μl : 330 μl διαλύματος υποστρώματος + 220 μl ενζυμικού διαλύματος) ήταν 30mM.

Πορεία:

Το διάλυμα υποστρώματος και το ενζυμικό διάλυμα τοποθετήθηκαν στο υδατόλουτρο στους 30°C και το ενζυμικό διάλυμα επώαστηκε για 15min. Μετά το πέρας των 15 λεπτών μεταφέρθηκαν 330μl από το διάλυμα υποστρώματος στο πρώτο ενζυμικό διάλυμα. Ανά 4 λεπτά λαμβάναμε 100μl από το μίγμα (ενζυμικό διάλυμα μαζί με διάλυμα υποστρώματος, 550μl) τα οποία τα προσθέταμε σε σωληνάκι με 12.5μl SDS 10% και στη συνέχεια έγινε έντονο *vortex*, ώστε να σταματήσει η αντίδραση λόγω μετουσίωσης της πρωτεΐνης. Οι χρόνοι στους οποίους λαμβάναμε δείγμα για να σταματήσουμε την αντίδραση, μετά την έναρξη της ήταν: 0min, 4min, 8min, 12min και 16min. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία για το πρώτο ενζυμικό διάλυμα, τότε τοποθετήσαμε στο υδατόλουτρο το δεύτερο ενζυμικό διάλυμα, έγινε επώαση για 15min και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα ενζυμικά διαλύματα αλλά και για το τυφλό της 1-φωσφορικής γλυκόζης.

Εκτός των δειγμάτων έγινε και προσδιορισμός τυφλών μαρτύρων ως προς τα φωσφορικά. Οι τυφλοί μάρτυρες παρασκευάστηκαν ως εξής:

- Τυφλός μάρτυρας νερού: 100μl dH₂O + 12.5μl sds 10%
- Τυφλοί μάρτυρες φωσφορικών (×2): 50μl dH₂O + 12.5μl sds 10% +50μl PO₄ 1mM

Αφού η διαδικασία ολοκληρώθηκε για όλα τα ενζυμικά διαλύματα, παρασκευάστηκε διάλυμα φωτομέτρησης, όπως περιγράφεται στο *εδάφιο* §6.5.4.1. Όμως, σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 625μl διαλύματος φωτομέτρησης.

6.8.4.2 Ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης σε κάθε κυτταρικό εκχύλισμα - Bradford.

Η μέθοδος *Bradford* (*Bradford 1976*) χρησιμοποιήθηκε για τον καθορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης που βρίσκεται στο κυτταρικό εκχύλισμα. Η μέθοδος *Bradford* είναι μια χρωματική μέθοδος που βασίζεται στο εύρος των απορροφήσεων της χρωστικής *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Υπό όξινες συνθήκες, η εν λόγω χρωστική αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής *Commassie*, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595nm. Τυχόν αύξηση της απορρόφησης στα 595nm είναι ενδεικτική της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη.

Αρχικά, παρασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων διαλυμάτων πρωτεΐνης *BSA* γνωστής συγκεντρώσεως. Σε όγκο 20μl από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα (0-20mg/ml) προστέθηκαν 980μl αντιδραστηρίου *Bradford 1×* (πίνακας 4). Τα διαλύματα (όγκου 1ml) αναδεύτηκαν και αφέθηκαν προς επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Μετά το πέρας 30min έγινε καλή ανάδευση των διαλυμάτων και ακολούθησε η φασματοφωτομέτρησή τους σε λ=595nm

Πίνακας 4: Προσδιορισμός πρότυπης καμπύλης *Bradford*

Συγκεντρώσεις	Lysis buffer*(μ l)	BSA (μ l)	Bradford (μ l)
0	20	0	980
0.2	19.6	0.4	980
0.4	19.2	0.8	980
0.6	18.8	1.2	980
0.8	18.4	1.6	980
1	18	2	980
1.2	17.6	2.4	980

*Το *lysis buffer* περιείχε 20mM Tris pH 7.5, 0.05% Triton, 1mM PMSF

Η πρότυπη καμπύλη σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος *Excel* τοποθετώντας στον άξονα *x* τις τιμές συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης και στον άξονα *y* τις τιμές των απορροφήσεων. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών των δειγμάτων προσδιορίστηκε από την εξίσωση της ευθείας που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη.

6.8.4.3 Επεξεργασία αποτελεσμάτων:

Από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης που προέκυψε από το προηγούμενο βήμα βρήκαμε τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης για το κάθε δείγμα. Τη συγκέντρωση αυτή την πολλαπλασιάζουμε με το συντελεστή αραιώσης που προκύπτει από την αραιώση που κάναμε στη δοκιμασία της *bradford*. Ο συντελεστής αραιώσης στην περίπτωση μας ήταν ίσος με 10, διότι πήραμε 5 μ l από το κυτταρικό εκχύλισμα και το αραιώσαμε με 50 μ l *lysis buffer* (αραιώση 1/10). Έπειτα από τα 50 μ l πήραμε 20 μ l και προσθέσαμε 980 μ l αντιδραστήριο Bradford ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση.

Στη συνέχεια για να υπολογίσουμε τη πρωτεϊνική συγκέντρωση στον όγκο της αντίδρασης εφαρμόσαμε τον νόμο της αραιώσης ως εξής: $C_1V_1 = C_2V_2 \Leftrightarrow C_2 = \dots$

Όπου C_1 είναι η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που βρέθηκε παραπάνω

V_1 : Όγκος της αντίδρασης (550 μ l)

V_2 : Ο όγκος από το εκχύλισμα των κυττάρων που βάλαμε στο ενζυμικό διάλυμα, στην περίπτωση μας ήταν 65 μ l

Στην συνέχεια υπολογίσαμε:

$$f = \frac{\text{limit}}{\text{assay volume} \cdot C_{\text{πρωτεΐνης στον τελικό όγκο της αντίδρασης}}}$$

Το limit ισούται με :

$$\text{limit} = 0.78 \cdot [G1P] \cdot \text{assay volume} = 2.34, \text{ Όπου:}$$

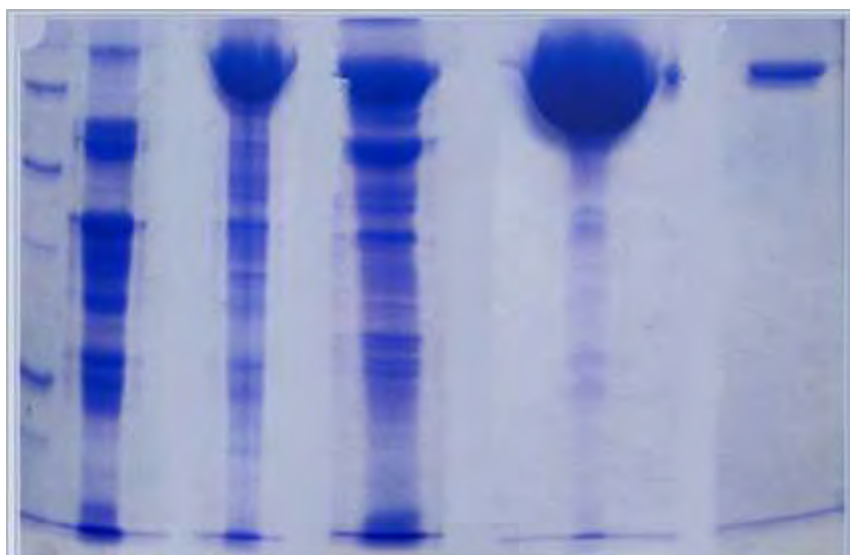
[G1P] είναι η συγκέντρωση της 1-φωσφορική γλυκόζης στην αντίδραση και ισούται με 30mM

Assay volume είναι ο όγκος που παίρνουμε για να σταματήσουμε την αντίδραση και ισούται με 100 μ l

7. Αποτελέσματα - Συζήτηση

7.1 Απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b

Η μέθοδος με την οποία απομονώθηκε η φωσφορυλάση του γλυκογόνου b αναφέρθηκε στο εδάφιο §6.5.6. Στην εικόνα 31 φαίνονται τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των πρωτεϊνικών δειγμάτων που λήφθηκαν από κάθε στάδιο καθαρισμού και απομόνωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b.



Εικόνα 31: 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 τη θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

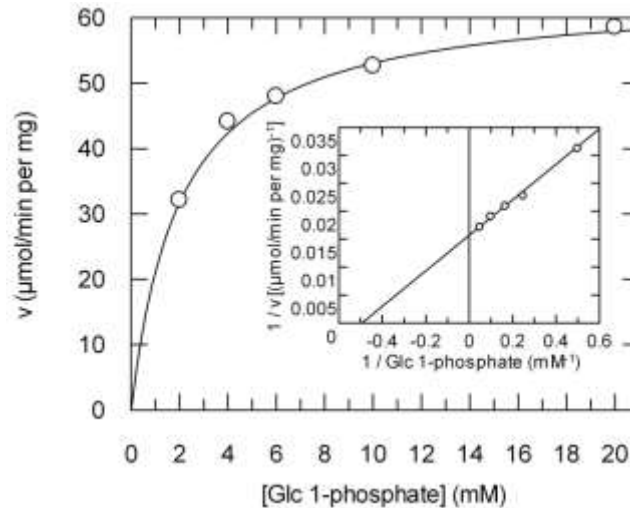
7.2 Προσδιορισμός της σταθεράς *Michaelis-Menten*

Η σταθερά *Michaelis-Menten* μπορεί να θεωρηθεί ως η συγκέντρωση εκείνη του υποστρώματος που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρεί με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας. Έτσι, όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή της K_M , τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να πετύχουμε τη μισή από τη μέγιστη ταχύτητα, ή με άλλα λόγια τόσο μικρότερη είναι η ικανότητα του υποστρώματος να αντιδράσει με το ένζυμο. Τα παραπάνω ισχύουν αν στη σχέση 9 αντικαταστήσουμε την v με $\frac{V_{max}}{2}$, γιατί τότε προκύπτει ότι:

$$K_M = [S] \quad (10)$$

(Γεωργιάτσος Ι. Γ., και συν., 2001)

Η γραφική παράσταση *Michaelis-Menten*, της ταχύτητας (v) συναρτήσεως της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων $[S]$ οδηγεί σε ορθογώνια υπερβολή:



Διάγραμμα 1: Γραφική παράσταση *Michaelis-Menten* της ταχύτητας (v) ως προς την 1-φωσφορική γλυκόζη. Εσωτερικά του διαγράμματος παρουσιάζεται το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου (*Lineweaver-Burk*), $1/v$ ως προς $1/G1-P$

Η σταθερά *Michaelis-Menten* υπολογίζεται με τη μέθοδο των *Lineweaver-Burk*, που είναι γνωστή και σαν μέθοδος του διπλού αντιστρόφου όπως φαίνεται στο *διάγραμμα 1*. Απαραίτητη είναι η προσεκτική επιλογή των τιμών των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων $[S]$, ώστε οι αντίστοιχες αντίστροφες τιμές να είναι ομοιόμορφα κατανομημένες στον άξονα των τετμημένων (*Γεωργιάτσος Ι. Γ., και συν., 2001; Κλώνης Ι., 2006*)

Η εξίσωση των *Michaelis-Menten* που προκύπτει από την υπόθεση της σταθεροποιημένης κατάστασης είναι η παρακάτω, όπως αναλύθηκε στο *εδάφιο §6.5.6*:

$$v = \frac{k_3[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Αν η παραπάνω σχέση γραφτεί με τη μορφή διπλού αντιστρόφου και ληφθεί υπ' όψιν ότι $V_{max} = k_3[E_0]$, τότε λαμβάνεται η σχέση:

$$\frac{1}{V_{max}} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (11)$$

Η σχέση (8) περιγράφει την ευθεία η οποία λαμβάνεται από τη γραφική παράσταση των *Lineweaver-Burk* (1934), και η οποία προκύπτει εάν παραστήσουμε γραφικά τις τιμές $1/v$ στον άξονα των τεταγμένων και $1/[S]$ στον άξονα των τετμημένων όπως φαίνεται εσωτερικά του διαγράμματος 1. Η κλίση της ευθείας ισούται με K_M/V_{max} , το σημείο στο οποίο η ευθεία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων ισούται με $1/V_{max}$ και το σημείο στο οποίο τέμνει τον άξονα των τετμημένων ισούται με $-1/K_M$. Απαραίτητη είναι η προσεκτική επιλογή των τιμών των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων $[S]$, ώστε οι αντίστοιχες αντίστροφες τιμές να είναι ομοιόμορφα κατανομημένες στον άξονα των τετμημένων (*Κλώνη Ι., 2006*).

Η σταθερά Michaelis-Menten και η μέγιστη ταχύτητα για την *RMGPb* ως προς την 1-φωσφορική γλυκόζη υπολογίστηκαν¹³:

$$K_M: 2.0252 \pm 0.1876 \text{ mM}$$

$$V_{max}: 63.7916 \pm 1.0260$$

Η μέγιστη ταχύτητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου και δεν αποτελεί σταθερά όπως η K_M (Κλώνης Ι., 2006).

7.3 Προσδιορισμός της IC_{50} των φυτικών εκχυλισμάτων και του γαλλικού οξέος

Τα εκχυλίσματα παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού και αμπελοκομίας καθώς και το γαλλικό οξύ μελετήθηκαν ως προς την πιθανή υπογλυκαιμική τους δράση έναντι της αναστολής της *RMGPb*. Για τον υπολογισμό και την εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *GraFit* (Leatherbarrow R. J., 1998). Στον πίνακα 5 αναγράφονται τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της IC_{50} καθώς και η τιμή της IC_{50} .

Πίνακας 5: Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή μελετών για τον προσδιορισμό των IC_{50} των υπό μελέτη εκχυλισμάτων

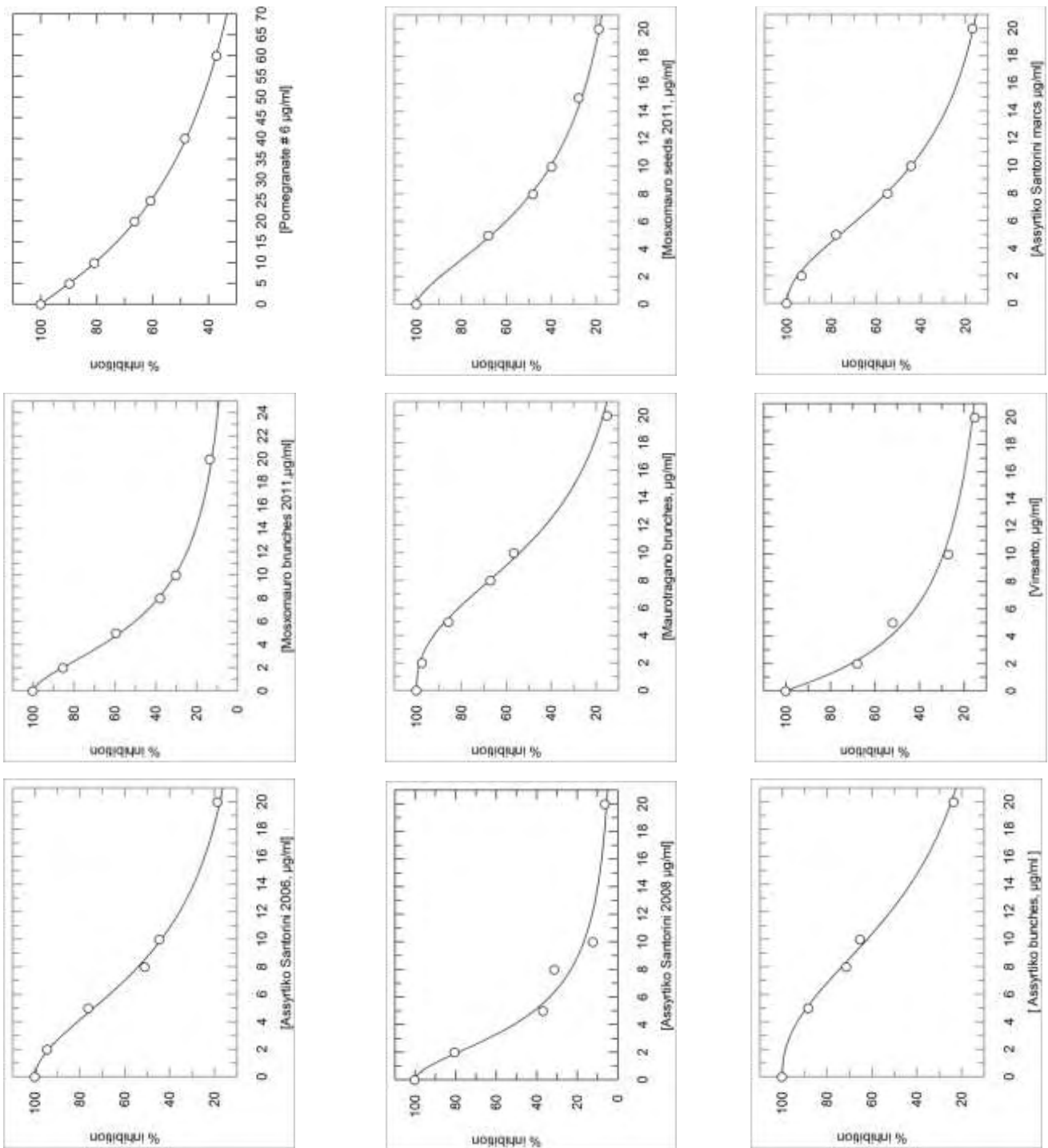
Εκχύλισμα	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} ($\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)
Ρόδι No. 6	5,10,20,25,40,60	37.1 ± 0.2
Μοσχόμαυρο γίγαρτα 2011	58,10,15,20	7.8 ± 0.1
Μοσχόμαυρο βόστρυχοι 2011	2,5,8,10,20	6.0 ± 0.1
Μαυροτράγανο βόστρυχοι	2,5,8,10,20	10.7 ± 0.2
Ασύρτικο Σαντορίνη 2006	2,5,8,10,20	8.7 ± 0.2
Ασύρτικο Σαντορίνη 2008	2,5,8,10,20	4.1 ± 0.35
Ασύρτικο Σαντορίνη Στέμφυλα	2,5,8,10,20	8.9 ± 0.1
Ασύρτικο βόστρυχοι	5,8,10,20	12.4 ± 0.4
Vinsanto	2,5,10,20	4.5 ± 0.4
Ουσία	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (mM)	IC_{50} (mM)
Γαλλικό οξύ	1,2,3,5,7	1.97 ± 0.1

Οι πειραματικές συνθήκες και ο προσδιορισμός των IC_{50} αναφέρονται στην ενότητα 6. Η ενζυμική αντίδραση έλαβε χώρα σε σταθερές συγκεντρώσεις AMP (1mM), γλυκογόνου (0.2%), 1-φωσφορικής γλυκόζης (2mM) και διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα.

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό της IC_{50} .

¹³ Όλοι οι απαραίτητοι υπολογισμοί για τον υπολογισμό της K_M και της V_{max} του ενζύμου έγιναν με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος *GraFit* (Leatherbarrow R. J., 1998).

Γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό των IC_{50} των εκχυλισμάτων *Vitis vinifera* και *Punica granatum L.* έναντι της φωσφορυλάσης του *RMGPb*



Η ικανότητα αναστολής έναντι της *RMGPb* από τα φυτικά εκχυλίσματα αξιολογήθηκε με κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο εδάφιο §6.5.7.1. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι 6 από τα 8 εκχυλίσματα *Vitis vinifera* που μελετήθηκαν εμφανίζουν ανασταλτικό δυναμικό έναντι της *RMGPb* με IC_{50} από 10µg/ml με το εκχύλισμα *Ασσύρτικο Σαντορίνη 2008* να δίνει την καλύτερη αναστολή, με IC_{50} ίση με $(4.1 \pm 0.3)\mu\text{g/ml}$. Η ποικιλία *Ασσύρτικο* θεωρείται ως το πιο ενδιαφέρον ελληνικό λευκό σταφύλι, το οποίο προέρχεται από το ελληνικό νησί

Σαντορίνη. Η εν λόγω ποικιλία είναι καλά προσαρμοσμένη στο ηφαιστειογενές έδαφος και στις κλιματολογικές συνθήκες της Σαντορίνης (Kechagia D., 2008). Σε αντίθεση με το Ασύρτικο Σαντορίνη αλλά και τις υπόλοιπες ποικιλίες εκχυλισμάτων κρασιών που μελετήθηκαν, το εκχύλισμα ροδιού δεν έδειξε ισχυρή ανασταλτική δράση μιας και η IC_{50} για το δείγμα εκχυλίσματος ροδιού βρέθηκε $37.1\mu\text{g/ml} \pm 0.2$. Ωστόσο πραγματοποιήθηκαν κρυσταλλογραφικές μελέτες για τον εντοπισμό της/των βιοδραστικών ενώσεων που είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση της αναστολής.

7.4 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικών μελετών: *Punica granatum L.*

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες διεξήχθησαν μέσα στο γενικότερο πλαίσιο των ερευνητικών ενδιαφερόντων του εργαστηρίου Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχολής Επιστημών Υγείας και περιελάμβαναν την ταυτοποίηση βιοδραστικών ουσιών ως προς τα φυτικά εκχυλίσματα. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες στα εκχυλίσματα *vitis vinifera* έδειξαν ότι το μόριο το οποίο προσδένεται στη *RMGPb* και επιφέρει αναστολή είναι η κερσετίνη (Kantsadi A. L., et al., 2014) αλλά τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν αποτελούν μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

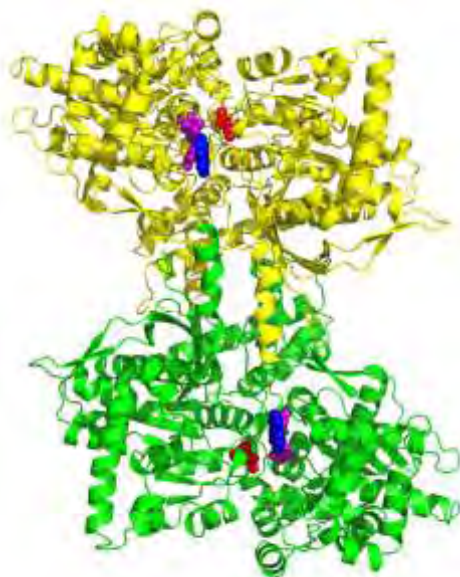
Κρυσταλλογραφικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν και για τα δείγματα εκχυλισμάτων ροδιού (*Punica granatum L.*). Για την ταυτοποίηση της βιοδραστικής ουσίας ήταν απαραίτητο να γνωρίζουμε τα συστατικά του εν λόγω εκχυλίσματος. Ο προσδιορισμός αυτών των συστατικών επετεύχθη με φασματοσκοπία μάζας *NMR* και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6: Σύσταση σε πολυφαινόλες των εκχυλισμάτων ροδιού

Μονομερείς Πολυφαινόλες	Συγκέντρωση Μονομερών Πολυφαινόλων (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	189,92	269,05	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	43,67
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

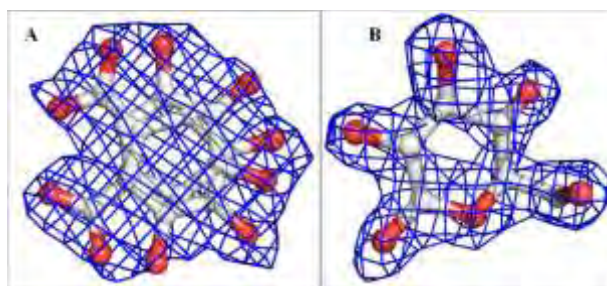
Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες για το δείγμα ροδιού No. 6 έδειξαν ότι στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b προσδένεται η γλυκόζη και στο κέντρο αναστολής του ενζύμου προσδένεται ενδεχομένως το γαλλικό οξύ (GLA) με δυο πιθανές διαφορετικές διαμορφώσεις. Αυτό σημαίνει ότι σε ορισμένες μονάδες ενζύμου το γαλλικό οξύ θα έχει την Α' (GLA`A) διαμόρφωση ενώ στις υπόλοιπες την Β' (GLA`B). Ωστόσο στα αποτελέσματα παρουσιάζονται και οι δυο πιθανές διαφορετικές διαμορφώσεις τοποθετημένες πάνω σε μια μονάδα ενζύμου. Στην εικόνα 32 παρουσιάζεται η κρυσταλλική δομή της διμερούς μορφής της

φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b στην οποία συνδέονται το γαλλικό οξύ (μπλε χρώμα), η γλυκόζη (κόκκινο χρώμα) και η φωσφορική πυριδοξάλη (μοβ χρώμα).



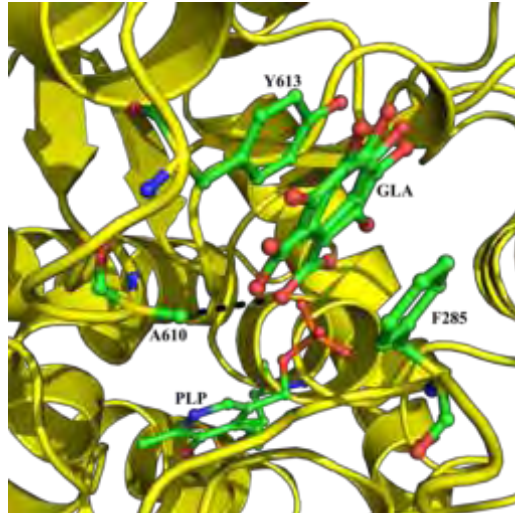
Εικόνα 32: Τρισδιάστατη δομή της βιολογικά ενεργής διμερούς μορφής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Με κόκκινο χρώμα αποτυπώνεται το μόριο της γλυκόζης το οποίο προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο, με μπλε χρώμα παρουσιάζονται τα μόρια του γαλλικού οξέος τα οποία προσδένονται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου και με μοβ ο συμπαράγοντας του ενζύμου, η φωσφορική πυριδοξάλη.

Η ηλεκτρονιακές πυκνότητες των μορίων του γαλλικού οξέος και του μορίου της γλυκόζης παρουσιάζονται στις εικόνες 33 και 34 παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο προσδένονται τα μόρια του γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής του ενζύμου, καθώς και ο δεσμός υδρογόνου που δημιουργείται μεταξύ του *GLA`B* και της *A610*.

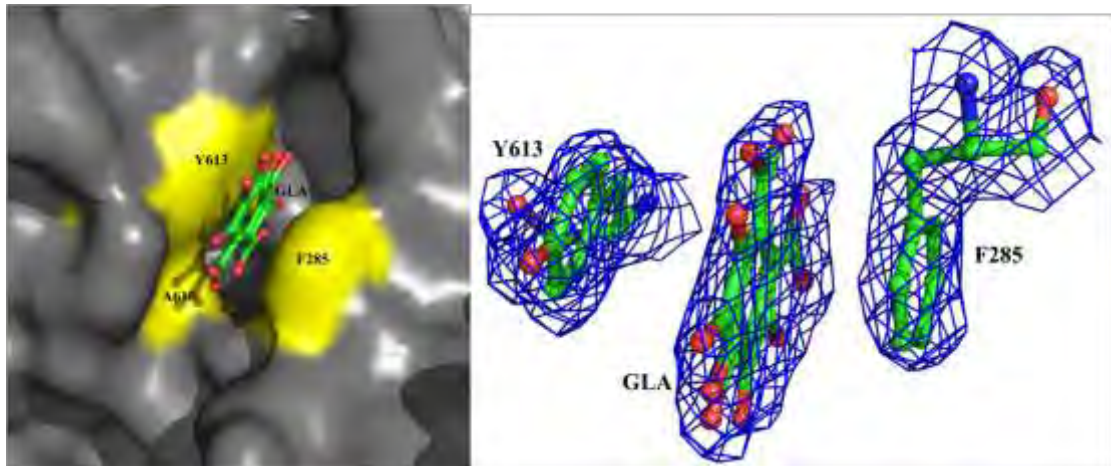


Εικόνα 33: Στην εικόνα A παρουσιάζεται η ηλεκτρονική πυκνότητα των δύο μορίων του γαλλικού οξέος ενώ στην εικόνα B η ηλεκτρονική πυκνότητα της γλυκόζης. Οι χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το REFMAC.

Στην εικόνα 34 παρουσιάζεται το κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, που αποτελείται από την *Y613* και *F285*. Μεταξύ των δύο αυτών αμινοξέων εδράζονται τα μόρια του γαλλικού οξέος. Το ένα από τα δύο μόρια γαλλικού οξέος, και συγκεκριμένα το *GLA`B*, δημιουργεί ένα δεσμό υδρογόνου με την *A610*.



Εικόνα 34: Σύνδεση γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής. Με διακεκομμένες γραμμές αναπαριστάται ο δεσμός 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



Εικόνα 35: Στην **αριστερή** εικόνα παρουσιάζεται η μοριακή επιφάνεια της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b όπου φαίνεται η σύνδεση των μορίων του γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Τα κατάλοιπα που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τα μόρια του γαλλικού οξέος καταγράφονται στην επιφάνεια. Στην **δεξιά** εικόνα παρουσιάζεται διάγραμμα του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας 2Fo-Fc, διαμορφωμένο σε 1msd, που παρεμβάλλεται μεταξύ των καταλοίπων Phe285 και Tyr613 τα οποία σχηματίζουν το κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b. Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το REFMAC.

Στην *εικόνα 35* παρουσιάζεται ξανά το κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b όπου προσδένονται τα μόρια του γαλλικού οξέος. Παρατηρούμε την μοριακή επιφάνεια της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b αλλά και το διάγραμμα της ηλεκτρονιακής πυκνότητας της Y613, της F285 και των μορίων του γαλλικού οξέος.

Οι πολικές αλληλεπιδράσεις των μορίων του γαλλικού οξέος και της γλυκόζης με τα αμινοξικά κατάλοιπα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b στα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Με **έντονη** γραφή αποτυπώνεται ο δεσμός υδρογόνου που δημιουργεί το GLA`B με την αλανίνη 610(A610).

Πίνακας 7: Πολικές αλληλεπιδράσεις του γαλλικού οξέος και της γλυκόζης με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb κατά τη σύνδεση τους στα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου.

Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)	
		BGC	Gallic acid
O1	Asn284 ND2	2.97	-
	Tyr 573 OH	3.12	-
O2	Glu672 OE1	3.23	-
	Asn284 ND2	3.02	-
O3	Ala673 N	3.26	-
	Ser674 N	2.93	-
	Gly675 N	3.07	-
	Glu672 OE1	2.90	-
O4	Gly675 CA	3.26	-
	Gly675 N	2.81	-
O6	Gly675 N ?	2.67	-
	His377 ND1	2.74	-
C6	Asn484 OD1	3.19	-
OAA[O]	Ala610 CB	-	3.21

Οι αλληλεπιδράσεις *van der Waals* που δημιουργούν τα μόρια του γαλλικού οξέος και το μόριο της γλυκόζης στα κέντρα σύνδεσης παρουσιάζονται στον πίνακα 8 και πίνακα 9.

Πίνακας 8: Αλληλεπιδράσεις *van der Waals* της γλυκόζης με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb κατά τη σύνδεση τους στα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου

Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)	Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)
		BGC			BBG
C1	Asn284 ND2	3.89	C3	Gly675 N	3.81
	His377 O	3.88		Glu672 OE1	3.38
O1	Leu136 CB	3.99	O3	Gly675 CA	3.99
	Asn284 ND2	2.97		Ala673 CA	3.76
C2	Glu672 OE1	3.87		Ala673 C	3.81
	Asn284 ND2	3.99		Ser674 N	2.93
	His377 O	3.39		Ser674 CA	3.79
O2	Glu672 OE1	3.23		Ser674 C	3.81
	Asn284 ND2	3.02		Gly675 N	3.07
	Tyr573 OH	3.12		Glu672 CG	3.70
	His377 O	3.94		Glu672 CD	3.67
	Asn284 CG	3.86		Glu672 OE1	2.90
O5	Asn284 OD1	3.94		Glu672 C	3.86
	His377 ND1	3.42		Ala673 N	3.26
	Leu136 N	3.59	Ala673 CB	3.72	
	Leu136 CA	3.83	Gly135 C	3.83	
	Leu136 CB	3.85	Gly135 O	3.75	
C5	His377 CB	3.87	C6	His377 ND1	3.51
	His377 CG	3.98		His377 CE1	3.98
	Gly135 C	3.76		Asn484 OD1	3.19
C4	Leu136 N	3.84	O6	Val455 CG1	3.99
	Gly675 N	3.77		Asn484 CG	3.71
O4	Gly675 CA	3.26		Val455 CG2	3.89
	Gly675 C	3.39		His377 ND1	2.74
	Gly675 O	3.67		His377 CE1	3.31
	Thr676 N	3.89		Asn484 OD1	2.67
	Ser674 CB	3.55		His377 CG	3.96
	Ser674 C	3.84			
	Gly675 N	2.81			
	Asn484 OD1	3.56			

Πίνακας 9: Αλληλεπιδράσεις van der Waals του γαλλικού οξέος με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb κατά τη σύνδεση τους στα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου. Με κανονική γραφή αναφέρονται τα αμινοξέα με τα οποία σχηματίζει δεσμούς το GLA`A, ενώ με **έντονη** γραφή αναφέρονται τα αμινοξέα που σχηματίζει δεσμούς το GLA`B.

Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)	Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)	
		Gallic acid			Gallic acid	
OAE	Tyr613 CE1	3.67	CAH	Phe285 CD2	3.79	
	Tyr613 CZ	3.64		Phe285 CZ	3.98	
	Tyr613 OH	3.77		Phe285 CE2	3.55	
CAL	Tyr613 CD1	3.79		Tyr613 CG	3.78	
	Tyr613 CE1	3.64		Tyr613 CD2	3.52	
	Tyr613 CZ	3.84		Tyr613 CB	3.93	
	Phe285 CD1	3.70		Phe285 CB	3.50	
	Phe385 CE1	3.76		Phe285 CG	3.49	
	Phe385 CE1	3.77		Phe285 CD1	3.95	
	Phe285 CZ	3.81		Phe285 CD2	3.84	
CAI	Tyr613 CG	3.79		OAB	Asn282 OD1	3.50
	Tyr613 CD1	3.93			Phe285 CD2	3.76
	Tyr613 CZ	3.92			Phe285 CE2	3.88
	Tyr613 CE2	3.76			His571 CE1	3.98
	Tyr613 CD2	3.68			Asp283 O	3.85
	Phe285 CG	3.65	Tyr613 CE2		3.65	
	Phe285 CD1	3.34	Tyr613 CD2		3.39	
	Phe285 CE1	3.81	Phe285 CB		3.38	
	Phe285 CZ	3.66	Phe285 CG		3.76	
	Phe285 CE2	3.88	Gly612 C		3.80	
OAC	Tyr613 CZ	3.79	OAA	Phe285 CE2	3.76	
	Tyr613 CE2	3.42		Gly612 O	3.56	
	Tyr613 CD2	3.65		Ala610 CB	3.21	
	Phe285 CB	3.78		Asn282 OD1	3.61	
	Phe285 CG	3.88		Phe285 CB	3.71	
	Phe285 CD1	3.67		Phe285 CG	3.81	
	Gly612 O	3.54		Phe285 CD2	3.81	
CAF	Tyr613 CG	3.73	CAG	Phe285 CE1	3.77	
	Tyr613 CD2	3.86		Phe285 CZ	3.72	
	Tyr613 CB	3.93		Tyr613 CG	3.76	
	Phe285 CB	3.90		Tyr613 CD1	3.72	
	Phe285 CG	3.37		Tyr613 CE1	3.84	
	Phe285 CD1	3.48		Tyr613 CZ	3.96	
	Phe285 CD2	3.61		Tyr613 CE2	3.98	
	Phe285 CE1	3.83		Tyr613 CD2	3.86	
	Phe285 CE2	3.95		Phe285 CG	3.90	
	Tyr613 CB	3.79		Phe285 CD1	3.46	
	Phe285 CD2	3.74		Phe285 CE1	3.68	
	Phe285 CZ	3.83		Tyr613 CD1	3.87	
	Phe285 CE2	3.65		Tyr613 CE1	3.99	
CAK	Tyr613 CB	3.94	CAJ	Phe285 CE1	3.74	
	Phe285 CG	3.96		Tyr613 CD1	3.85	
	Phe285 CD1	3.96		Tyr613 CE1	3.92	
	Phe285 CD2	3.79		Phe285 CD1	3.89	
	Phe285 CE1	3.82		Phe285 CE1	3.61	
	Phe285 CZ	3.66	OAD	Tyr613 CE1	3.98	
	Phe285 CE2	3.64				
	Tyr613 CG	3.59				
	Tyr613 CD1	3.98				
	Tyr613 CD2	3.75				
	Tyr613 CB	3.80				
	Phe285 CG	3.54				
	Phe285 CD1	3.60				
	Phe285 CD2	3.77				
	Phe285 CE1	3.91				

7.4.1 Γαλλικό οξύ

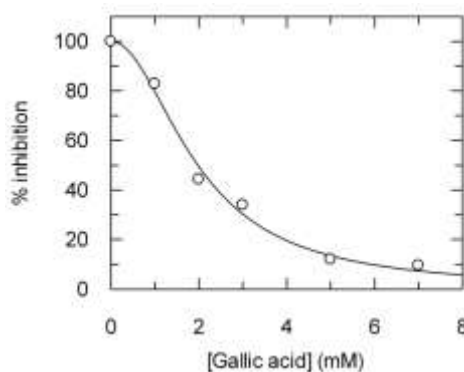
Το γαλλικό οξύ (3,4,5-τριωροξυβενζοϊκό οξύ) βρίσκεται σε μεγάλη ποικιλία φυτών και χρησιμοποιείται εκτενώς σε χρώματα μελανίων καθώς επίσης και στην παρασκευή χάρτου. Επιπλέον η χαρακτηριστική ομάδα του γαλλικού είναι ένας παράγοντας κλειδί που υπάρχει σε πολλά τρόφιμα και ποτά. Παραδείγματος χάριν, η σημαντική πολυφαινόλη *EGCG* περιέχει δυο μονάδες γαλλικού (*gallate moieties*). Η

πολυφαινόλη *EGCG* αλλά και άλλες συγγενικές πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες για την αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιϊκή δράση μερικών από τα πιο ευρέως σε κατανάλωση ποτά στον κόσμο, όπως είναι το πράσινο τσάι. Οι τρεις αρωματικές φαινοξυλικές ομάδες του γαλλικού οξέος είναι επιρρεπείς σε οξείδωση σχηματίζοντας υπεροξειδίου του υδρογόνου, κινόνες και ημικινόνες (Eslami A. C., et al., 2010).

Πρόσφατε μελέτες έδειξαν ότι το γαλλικό οξύ και το ελλαγικό οξύ που βρίσκονται στο φυτό *Lagerstroemia speciosa* L., το οποίο είναι γνωστό με την ονομασία *μπανάνα*, προκαλούν αναστολής της αντίστροφης μεταγραφάσης και της πρωτεάσης του ιού *HIV*. Κατά συνέπεια οι δύο αυτοί παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων αντι-*HIV* παραγόντων (Nutan et al., 2013).

7.5 Προσδιορισμός της IC_{50} και της K_i του γαλλικού οξέος

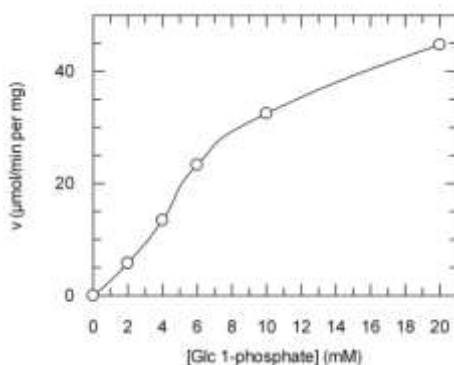
Τα κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα έδειξαν ότι το γαλλικό οξύ ενδεχομένως προσδένεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου ενώ η γλυκόζη στο καταλυτικό κέντρο. Προκειμένου να μελετήσουμε αν η αναστολή οφείλεται μόνο στη γλυκόζη ή αν επιφέρει και το γαλλικό οξύ αναστολή, έπρεπε να διεξάγουμε κινητικές μελέτες χρησιμοποιώντας το γαλλικό οξύ ως καθαρή ουσία. Το γαλλικό οξύ το προμηθευτήκαμε από την Sigma (Gallic acid – monohydrate, Sigma) και αρχικά πραγματοποιήσαμε κινητική μελέτη έναντι της *RMGPb* με σκοπό τον υπολογισμό της IC_{50} ώστε στη συνέχεια να επιλέξουμε σε ποιές συγκεντρώσεις του πιθανού αναστολέα θα διεξάγουμε μελέτες για τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής K_i . Το *διάγραμμα 2* προέκυψε από τον προσδιορισμό της IC_{50} του γαλλικού οξέος έναντι της *RMGPb* και η τιμή της βρέθηκε στα $1.9783\text{mM} \pm 0.0995$.



Διάγραμμα 2: Αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b από το γαλλικό οξύ. Όλες οι απαραίτητες πληροφορίες για τον τρόπο διεξαγωγής των πειραμάτων βρίσκονται στην ενότητα 6. Ο προσδιορισμός της IC_{50} έγινε σε σταθερές συγκεντρώσεις *AMP* (1mM), γλυκογόνου (0.2%), 1-φωσφορική γλυκόζη (2mM) και διάφορες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος όπως φαίνεται στον πίνακα 5.

Εφόσον επετεύχθη ο υπολογισμός της IC_{50} του γαλλικού οξέος ως προς την *RMGPb*, διεξήχθησαν κινητικές μελέτες για τον υπολογισμό της K_i του γαλλικού οξέος ως προς την *RMGPb*. Όλες οι πειραματικές συνθήκες και ο τρόπος διεξαγωγής των πειραμάτων περιγράφονται στα *εδάφια* §6.5.1 έως §6.5.4 καθώς επίσης και στο *εδάφιο* §6.5.8.1

Όπως αναφέρθηκε και στο εδάφιο §6.5.8 για τον υπολογισμό της K_i του γαλλικού οξέος έναντι της *RMGPb* έπρεπε αρχικά να προσδιορίσουμε τις φαινομενικές τιμές που έλαβε η K_M και η V_{max} σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αναστολέα. Οι συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος που μελετήθηκαν ήταν $0mM$, $1mM$, $3mM$ και $7mM$. Κατά τον προσδιορισμό της $K_{M(app.)}$ στα $7mM$ γαλλικού οξέος παρατηρήσαμε ότι η γραφική παράσταση δεν ακολουθεί τον νόμο των *Michaelis* και *Menten* καθώς στο *διάγραμμα 3* έχει σιγμοειδή μορφή.



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα ταχύτητας προς συγκέντρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η $K_{M(app.)}$ σε συγκέντρωση $7mM$ γαλλικού οξέος φαίνεται πως δεν υπακούει στο νόμο Michaelis-Menten εφόσον η καμπύλη της γραφικής αυτής παράστασης είναι σιγμοειδής

Επομένως, για την αξιολόγηση της σταθεράς αναστολής του γαλλικού οξέος χρησιμοποιήσαμε το πρότυπο του *Hill* το οποίο προηγήθηκε χρονολογικά έναντι όλων των άλλων, αν και έχει περιορισμένη γενική ισχύ στα φαινόμενα συνέργειας. Ο *Hill* πρότεινε ένα φαινόμενο που εξηγεί ικανοποιητικά το φαινόμενο της θετικής ομότροπης συνέργειας και της σιγμοειδούς καμπύλης που παρατηρείται κατά τη δέσμευση του οξυγόνου στο μόριο της μη καταλυτικής πρωτεΐνης αιμοσφαιρίνης. Η εξίσωση του *Hill* που περιγράφεται παρακάτω ισχύει για ένζυμο που φέρει n όμοιες θέσεις δεσμεύσεως μεταξύ των οποίων αναπτύσσεται θετική ομότροπη συνέργεια.

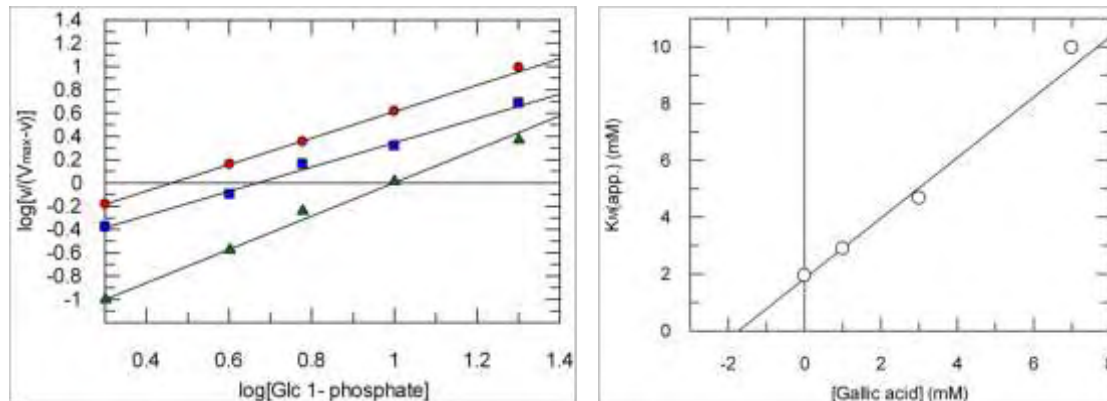
$$\log K_B + n \cdot \log[S] = \log\left(\frac{Y}{1-Y}\right)$$

Η γραφική παράσταση $\log[Y/(1-Y)]$ έναντι $\log[S]$, γνωστή και ως γραφική παράσταση του *Hill*, δίνει ευθεία η οποία τέμνει τον άξονα των τεταγμένων στο σημείο $\log K_B$ και έχει κλίση n που ονομάζεται συντελεστής του *Hill*. Το n δίνει τον ελάχιστον αριθμό θέσεων δέσμευσης και συνήθως είναι ίσο ή μικρότερο από αυτόν τον αριθμό, οπότε στρογγυλοποιείται στον αμέσως επόμενο ακέραιο αριθμό

- Αν $n=1$, τότε δεν υπάρχουν φαινόμενα συνέργειας. Η γραφική παράσταση u_0 έναντι $[S]$ ή Y έναντι $[S]$ είναι υπερβολή ενώ το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου είναι ευθεία
- Αν $n>1$, τότε λειτουργεί φαινόμενο θετικής συνέργειας. Η γραφική παράσταση u_0 έναντι $[S]$ ή Y έναντι $[S]$ δίνει σιγμοειδή καμπύλη ενώ το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου, αντί ευθείας, δίνει κυρτή καμπύλη.

- Αν $n < 1$, τότε ενδεχομένως λειτουργεί φαινόμενο αρνητικής συνέργειας. Η γραφική παράσταση u_0 έναντι $[S]$ ή Y έναντι $[S]$ δίνει σιγμοειδή καμπύλη ενώ το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου, αντί ευθείας, δίνει κυρτή καμπύλη.

Το φαινόμενο της αρνητικής συνέργειας δεν εξασφαλίζεται. Οπότε το πρότυπο του *Hill* είναι καλύτερο να χρησιμοποιείται και την ύπαρξη ή όχι φαινομένου θετικής συνέργειας (Κλώνης Ι., 2006).



Διάγραμμα 4: Κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της αναστολής που προκαλεί το γαλλικό οξύ στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου b. **Αριστερά** φαίνεται η γραφική παράσταση Hill του $\log[v/(V_{max}-v)]$ ως προς τον $\log[\text{glucose 1-phosphate}]$ σε 1mM AMP, 0.2% γλυκογόνο και διάφορες συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος 1mM(●), 3mM(■) και 7mM(▲). Οι συγκεντρώσεις της 1-φωσφορικής γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2mM, 4mM, 6mM, 10mM και 20mM. **Δεξιά** παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της σταθεράς αναστολής K_i του γαλλικού οξέος. Το διάγραμμα αποτελείται από τις $K_{M(app)}$ ως προς τις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος. Η K_i του γαλλικού οξέος υπολογίστηκε $1.7330 \pm 0.1619mM$.

Τα φαινόμενα αλλοστερικών αλληλεπιδράσεων, όπως η *συνέργεια*, έχουν αναλυθεί στο *εδάφιο* §3.3. Σε πολλά ολιγομερή ένζυμα παρατηρείται το φαινόμενο της *συνέργειας*, κατά το οποίο η δέσμευση ενός μορίου-δεσμευτή σε μια περιοχή δέσμευσης επηρεάζει τη συγγένεια κάποιας άλλης θέσης δέσμευσης του ενζύμου για το δεσμευτή, κάτι το οποίο προϋποθέτει την δυνατότητα επικοινωνίας μεταξύ των περιοχών δέσμευσης. Αυτό συμβαίνει επειδή τα άτομα σε ένα τυπικό ένζυμο βρίσκονται κοντά το ένα στο άλλο, ακόμα και μικρές μεταβολές στη στερεοδιάταξη των πλευρικών ομάδων των αμινοξικών κατάλοιπων σε μία υπομονάδα, είναι δυνατόν να μεταφερθούν, μέσω της τριτοταγούς δομής, και να επιφέρουν στεροδιατακτικές μεταβολές σε κάποια άλλη μακρινή περιοχή του ενζυμικού μορίου (Κλώνης Ι., 2006).

Σύμφωνα με το πρότυπο MWC, κάθε μονομερές διαθέτει μία εξειδικευμένη θέση δεσμεύσεως για κάθε δεσμευτή. Η ύπαρξη σιγμοειδούς καμπύλης οφείλεται στην υπόθεση ισοροπίας μεταξύ της T- και R- διαμόρφωσης. Η T-στερεοδομή αποτελεί δομικό απόθεμα για παραγωγή R-στερεοδομής. Το πρότυπο των MWC εξηγεί μόνο την θετική *συνέργεια* όπως άλλωστε συμβαίνει με το πρότυπο του *Hill*. Αυτό δεν αποτελεί σύμπτωση μιας και το πρότυπο των MWC οδηγεί στο πρότυπο του *Hill*. Επίσης το πρότυπο των MWC εξηγεί ικανοποιητικά την αλλοστερική ενεργοποίηση και αναστολή (θετικό και αρνητικό αλλοστερισμό, αντίστοιχα). Σύμφωνα με το πρότυπο οι αλλοστερικοί ενεργοποιητές δεσμεύονται στην R-στερεοδομή, τη

σταθεροποιούν και μειώνουν την τιμή του λόγου $[T]/[R]$. Αντίθετα οι αλλοστερικοί αναστολείς δεσμεύονται στην T-στερεοδομή, τη σταθεροποιούν και αυξάνουν την τιμή του λόγου $[T]/[R]$. Σε κάθε περίπτωση η δέσμευση του τροποποιητή (ενεργοποιητή/αναστολέα) επηρεάζει την ισορροπία $T \rightleftharpoons R$ και οδηγεί σε εμφάνιση σιγμοειδούς συμπεριφοράς (Κλώνης I., 2006)

Για να υπολογίσουμε την σταθερά αναστολής και τον τύπο της συνέργειας (θετική/αρνητική) πρέπει αρχικά να υπολογίσουμε τη φαινομενική σταθερά *Michaelis-Menten* για κάθε συγκεντρώση γαλλικού οξέος που μελετήθηκε.

Πίνακας 10: Πορεία προσδιορισμού της K_i του γαλλικού οξέος. Παρουσιάζονται οι $K_{M(app.)}$ και οι τιμές του παράγοντα του Hill

Γαλλικό οξύ (mM)	$K_{M(app.)}$ (mM)	Παράγοντας του Hill
0	1.9432 ± 0.0616	$1.0003 \approx 1$
1	2.8956 ± 0.0184	$1.1383 > 1$
3	4.6714 ± 0.2509	$1.0434 > 1$
7	9.9712 ± 0.3293	$1.4351 > 1$

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι στα 0mM γαλλικού οξέος ο παράγοντας του Hill ισούται περίπου με ένα (1), κάτι απολύτως λογικό, διότι απουσία αναστολέα δεν μπορεί να εμφανιστεί το φαινόμενο συνέργειας. Αντίθετα στις συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος 1mM, 3mM, 7mM ο παράγοντας του Hill είναι μεγαλύτερος του ένα (1) κάτι το οποίο δηλώνει λειτουργία θετικής συνέργειας. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι η πρόσδεση του γαλλικού οξέος σε κάποιο κέντρο του ενζύμου στη μία υπομονάδα οδηγεί, λόγω θετικής συνεργατικότητας, στη διευκόλυνση της πρόσδεσης ενός άλλου μορίου γαλλικού οξέος στη δεύτερη υπομονάδα.

Στο *διάγραμμα 4* παρουσιάζεται το *διάγραμμα του Hill* και το *διάγραμμα* που προέκυψε από τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής του γαλλικού οξέος έναντι της *RMGPb*.

Η σταθερά αναστολής υπολογίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος GraFit:

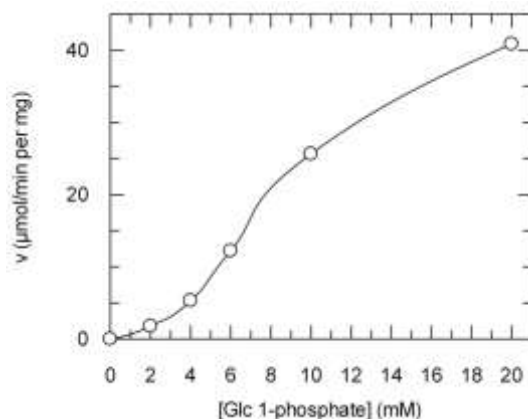
$K_i: 1.7 \pm 0.2 \text{ mM}$.

7.6 Προσδιορισμός της K_i της καφεΐνης

Όλες οι πειραματικές συνθήκες και ο τρόπος διεξαγωγής των πειραμάτων περιγράφονται στα *εδάφια* §6.5.1 έως §6.5.4 καθώς επίσης και στο *εδάφιο* §6.5.8.2

Όπως αναφέρθηκε και στο *εδάφιο* §6.5.8 για τον υπολογισμό της K_i της καφεΐνης έναντι της *RMGPb* έπρεπε αρχικά να προσδιορίσουμε τις φαινομενικές τιμές που λαμβάνει η K_M και η V_{max} σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αναστολέα. Οι συγκεντρώσεις καφεΐνης που μελετήθηκαν ήταν 0mM, 0.5mM, 1mM και 2mM. Κατά τον προσδιορισμό της $K_{M(app.)}$ στα 1mM καφεΐνης παρατηρήσαμε ότι η γραφική

παράσταση δεν ακολουθεί τον νόμο των *Michaelis* και *Menten* καθώς στο *διάγραμμα 5* έχει σιγμοειδή μορφή¹⁴.



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα ταχύτητας προς συγκέντρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η $K_{M(app.)}$ σε συγκέντρωση 1mM καφεΐνης φαίνεται πως δεν υπακούει στο νόμο των *Michaelis-Menten* εφόσον η καμπύλη της γραφικής αυτής παράστασης είναι σιγμοειδής.

Για να υπολογίσουμε την σταθερά αναστολής και τον τύπο της συνέργειας (θετική/αρνητική) πρέπει αρχικά να υπολογίσουμε τη φαινομενική σταθερά *Michaelis-Menten* για κάθε συγκέντρωση καφεΐνης που μελετήθηκε.

Πίνακας 11: Πορεία προσδιορισμού της K_i του γαλλικού οξέος. Παρουσιάζονται οι $K_{M(app.)}$ και οι τιμές του παράγοντα του *Hill*

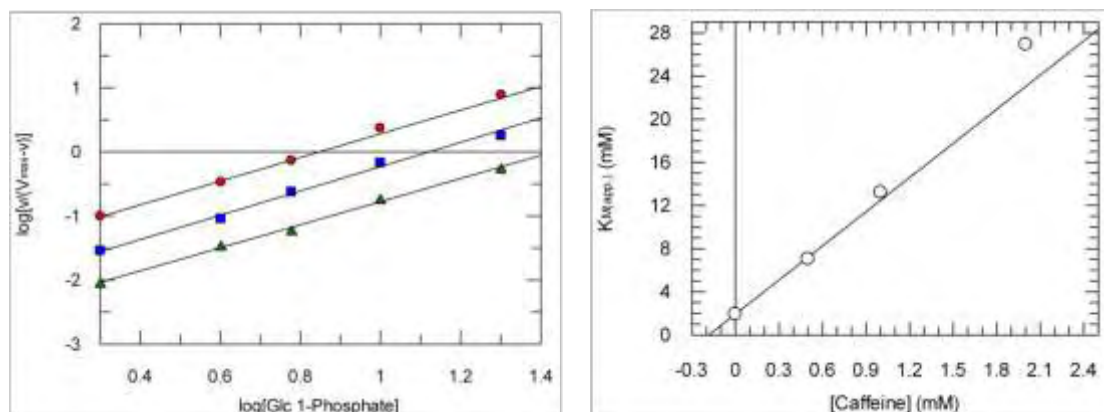
Καφεΐνη (mM)	$K_{M(app.)}$ (mM)	Παράγοντας του <i>Hill</i>
0	1.9432 ± 0.0616	$1.0003 \approx 1$
0.5	7.0428 ± 0.1818	$1.8476 > 1$
1	13.2178 ± 1.2453	$1.8975 > 1$
2	26.9359 ± 1.9905	$1.8021 > 1$

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι στα 0mM γαλλικού οξέος ο παράγοντας του *Hill* ισούται περίπου με ένα (1), κάτι που απολύτως λογικό, διότι απουσία αναστολέα δεν μπορεί να εμφανιστεί το φαινόμενο συνέργειας. Αντίθετα στις συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος 0.5mM, 1mM και 2mM ο παράγοντας του *Hill* είναι μεγαλύτερος του ένα (1) κάτι το οποίο δηλώνει λειτουργία θετικής συνέργειας. Στο *διάγραμμα 6* παρουσιάζεται το *διάγραμμα του Hill* και το *διάγραμμα* που προέκυψε από τον υπολογισμό της σταθεράς αναστολής της καφεΐνης έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b.

Η σταθερά αναστολής υπολογίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος GraFit:

K_i : $0.1830\text{mM} \pm 0.0133$

¹⁴ Τα φαινόμενα αλλοστερικών αλληλεπιδράσεων, όπως η *συνέργεια*, έχουν αναλυθεί στο *εδάφιο* §3.3 και §7.2.3.



Διάγραμμα 6: Κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό της αναστολής που προκαλεί η καφεΐνη στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου b. **Αριστερά** φαίνεται η γραφική παράσταση Hill του $\log[v/(V_{\max}-v)]$ ως προς τον $\log[\text{glucose 1-phosphate}]$ σε 1mM AMP, 0.2% γλυκογόνο και διάφορες συγκεντρώσεις της καφεΐνης: 0.5mM(●), 1mM(■) και 2mM(▲). Οι συγκεντρώσεις της 1-φωσφορικής γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2mM, 4mM, 6mM, 10mM και 20mM. **Δεξιά** παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της σταθεράς αναστολής K_i της καφεΐνης. Το διάγραμμα αποτελείται από τις $K_{M(\text{app})}$ ως προς τις συγκεντρώσεις της καφεΐνης. Η K_i της καφεΐνης υπολογίστηκε στα $0.1830\text{mM} \pm 0.0133$

7.7 Έλεγχος συναγωνισμού ως προς τα διάφορα κέντρα πρόσδεσης του ενζύμου

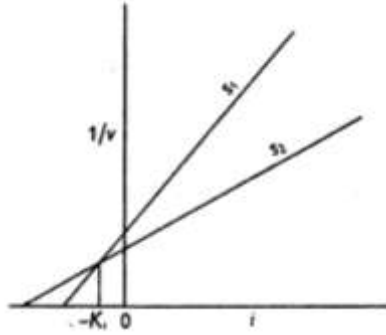
Διαγράμματα Dixon (1952):

Η σταθερά αναστολής K_i , δηλαδή η σταθερά ισορροπίας μεταξύ του ενζύμου και ενός συναγωνιστικού αναστολέα που συνδέεται με αντιστρεπτό τρόπο, συνήθως υπολογιζόταν με υπολογισμούς βασισμένους στην εξίσωση των *Michaelis-Menten* για ένα συναγωνιστικό σύστημα:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) + [S]} \quad (A)$$

Όπου $[i]$ η συγκέντρωση του αναστολέα

Για τον υπολογισμό της K_i υπάρχει μια απλή μέθοδος μέσω γραφικών παραστάσεων που πρωτοδιατυπώθηκε από τον *Dixon M.* το 1952 (*Dixon M., 1952*). Εάν απεικονίσουμε διάγραμμα $1/v$ προς $[i]$, διατηρώντας τη συγκέντρωση του υποστρώματος σταθερή, θα παρατηρήσουμε ότι δημιουργείται μια ευθεία γραμμή. Εάν σε ένα διάγραμμα με τον ίδιο τρόπο απεικονίσουμε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, οι γραμμές θα τέμνονται σε ένα σημείο αριστερά του κάθετου άξονα όπως φαίνεται στο *διάγραμμα 11*, με το σημείο τομής στον άξονα των τετημένων προσδιορίζει την τιμή $-K_i$.



Διάγραμμα 7: Προσδιορισμός της K_i – Συναγωνιστική αναστολή.

Η απόδειξη είναι η παρακάτω. Κάθε γραμμή σύμφωνα με την εξίσωση A παίρνει τη μορφή:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{1}{v} + \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{[i]}{K_i} \quad (B)$$

Στο σημείο της διασταύρωσης το $1/v$ και το $[i]$ όπως επίσης και η V_{max} θα είναι ίδια και για τις δύο γραμμές, όταν πρόκειται για συναγωνιστική αναστολή. Ως εκ τούτου:

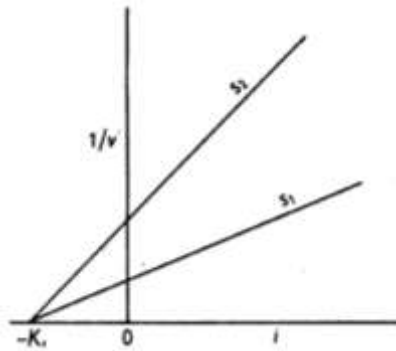
$$\frac{K_M}{[S_1]} + 1 + \frac{K_M}{[S_1]} \cdot \frac{[i]}{K_i} = \frac{K_M}{[S_2]} + 1 + \frac{K_M}{[S_2]} \cdot \frac{[i]}{K_i}, \quad \text{ή} \quad \frac{1}{[S_1]} \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) = \frac{1}{[S_2]} \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) \quad (Γ)$$

Τα παραπάνω μπορούν να ισχύουν μόνο αν $[S_1] = [S_2]$ ή $[i] = -K_i$

Επίσης μπορούμε να υπολογίσουμε και την K_M από το ίδιο διάγραμμα (διάγραμμα 11) όταν έχει βρεθεί η K_i . Αυτό συμβαίνει διότι κάθε γραμμή κόβει τη βασική γραμμή στην τιμή $[i]$ που είναι ίση με $-K_i([S]/K_M + 1)$

Στην περίπτωση της μη-συναγωνιστικής αναστολής, που παρουσιάζεται στο διάγραμμα 12, οι γραμμές δεν διασταυρώνονται, αλλά συναντώνται σε ένα σημείο που δίνει ξανά την τιμή $-K_i$. Αυτό φαίνεται εύκολα όταν βάλουμε $1/v = 0$ στην reciprocal μη-συναγωνιστική εξίσωση:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{K_M}{[S]}\right) \left(1 + \frac{[i]}{K_i}\right) \quad (Δ)$$



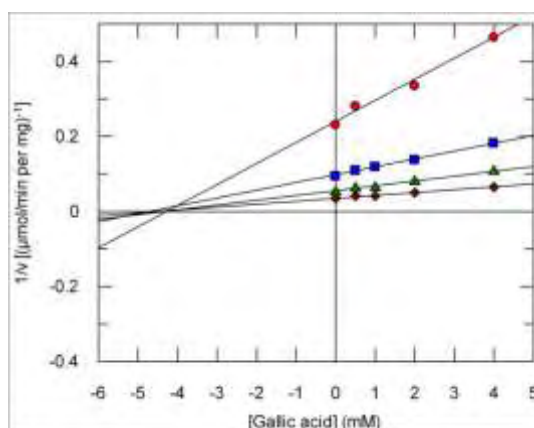
Διάγραμμα 8: Προσδιορισμός τη K_i σε μη-συναγωνιστική αναστολή

(Dixon M., 1953)

Από όλα τα παραπάνω εξάγεται επίσης το συμπέρασμα ότι στη συναγωνιστική αναστολή μειώνεται η φαινομενική συγγένεια του ενζύμου έναντι του υποστρώματος, χωρίς όμως να επηρεάζεται η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου, δηλαδή την ταχύτητα διάσπασης του συμπλόκου ES, επομένως $V_{\max(\text{app.})} = V_{\max}$. Αντίθετα στη μη συναγωνιστική αναστολή, που αποτελεί μια υποπερίπτωση της μικτής αναστολής, η K_M παραμένει αμετάβλητη. Συνεπώς το αποτέλεσμα που επιφέρει ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας είναι η μείωση της φαινομενικής καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου, χωρίς να επηρεάζει τη φαινομενική συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα (Κλώνης Ι., 2006)

7.7.1 Έλεγχος συναγωνισμού για το κέντρο αναστολής ως προς την καφεΐνη

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε καθώς και οι πειραματικές συνθήκες όπου έλαβε χώρα η συγκεκριμένη μελέτη αναφέρονται στα εδάφια §6.5.1, §6.5.3, §6.5.4., §6.5.9 και §6.5.9.1. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος *GraFit* και προέκυψε το διάγραμμα 7.

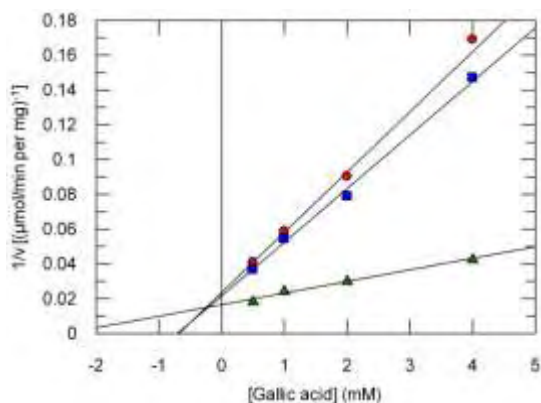


Διάγραμμα 9: Διάγραμμα Dixon του αντιστρόφου της ταχύτητας προς διάφορες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος για τον έλεγχο της ύπαρξης συναγωνισμού μεταξύ του γαλλικού οξέος και της καφεΐνης για το κέντρο αναστολής της φωσφορυλάση του γλυκογόνου b σε σταθερές συγκεντρώσεις AMP (1mM), γλυκογόνου (0.2%) και 1-φωσφορικής γλυκόζης (2.5mM). Οι συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM και 4mM ενώ οι συγκεντρώσεις της καφεΐνης ήταν 0.8mM(●), 0.4mM(■), 0.2mM(▲) και 0.1mM(◆).

Σύμφωνα με το διάγραμμα το γαλλικό οξύ και η καφεΐνη δεν συναγωνίζονται για την ίδια θέση πρόσδεσης του ενζύμου, διότι δεν εντοπίζεται συναγωνιστικότητα για το κέντρο αναστολής όπου προσδένεται η καφεΐνη.

7.7.2 Έλεγχος συναγωνισμού για το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης ως προς το AMP.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε καθώς και οι πειραματικές συνθήκες όπου έλαβε χώρα η συγκεκριμένη μελέτη αναφέρονται στα εδάφια §6.5.1, §6.5.3, §6.5.4., §6.5.9 και §6.5.9.2. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος *GraFit* και το διάγραμμα που προέκυψε απεικονίζεται στο *διάγραμμα 8*.

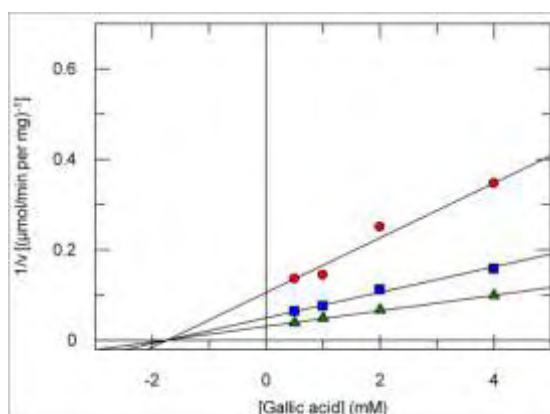


Διάγραμμα 10: Διάγραμμα Dixon του αντιστρόφου της ταχύτητας προς διάφορες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος για τον έλεγχο της ύπαρξης συναγωνισμού μεταξύ του γαλλικού οξέος και του AMP για το κέντρο σύνδεσης του AMP της φωσφορυλάση του γλυκογόνου b σε σταθερές συγκεντρώσεις γλυκογόνου (0.2%) και 1-φωσφορικής γλυκόζης (2.5mM). Οι συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM και 4mM ενώ οι συγκεντρώσεις του AMP ήταν 0.1mM(●), 0.2mM(■), 1mM(▲).

Σύμφωνα με το διάγραμμα το γαλλικό οξύ και το AMP συναγωνίζονται για την ίδια θέση πρόσδεσης του ενζύμου, διότι παρατηρείται συναγωνιστική αναστολή για το αλλοστερικό κέντρο.

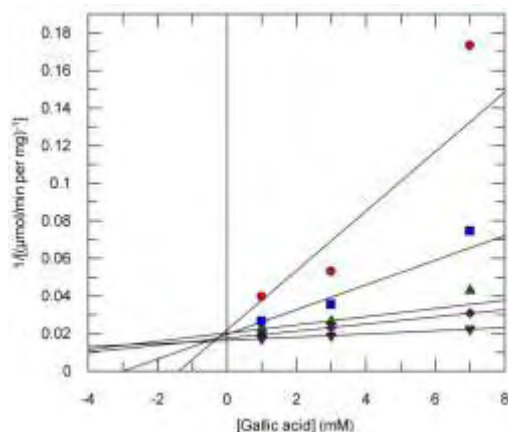
7.7.3 Έλεγχος συναγωνισμού για το καταλυτικό κέντρο ως την 1-φωσφορική γλυκόζη και την καφεΐνη

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε καθώς και οι πειραματικές συνθήκες όπου έλαβε χώρα η συγκεκριμένη μελέτη αναφέρονται στα εδάφια §6.5.1, §6.5.3, §6.5.4., §6.5.9 και §6.5.9.3. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος *GraFit* και το διάγραμμα που προέκυψε απεικονίζεται στο **διάγραμμα 9**.



Διάγραμμα 11: Παρουσιάζεται το Διάγραμμα *Dixon* του αντιστρόφου της ταχύτητας προς διάφορες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος για τον έλεγχο της ύπαρξης συναγωνισμού μεταξύ του γαλλικού οξέος και της α-D-γλυκόζης για το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάση του γλυκογόνου b σε σταθερές συγκεντρώσεις AMP (1mM), γλυκογόνου (0.2%) και 1-φωσφορικής γλυκόζης (2.5mM). Οι συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM και 4mM ενώ οι συγκεντρώσεις της α-D-γλυκόζης ήταν 10mM(●), 5mM(■) και 2.5mM(▲).

Σύμφωνα με το διάγραμμα το γαλλικό οξύ και η α-D-γλυκόζη δεν συναγωνίζονται για την ίδια θέση πρόσδεσης του ενζύμου, διότι δεν εντοπίζεται συναγωνιστικότητα για το καταλυτικό κέντρο όπου προσδένεται η γλυκόζη.

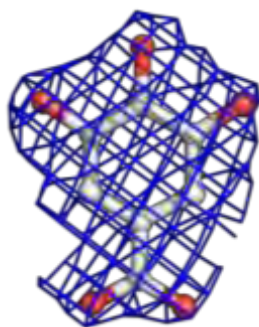


Διάγραμμα 12: Παρουσιάζεται το Διάγραμμα Dixon του αντιστρόφου της ταχύτητας προς διάφορες συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος για τον έλεγχο της ύπαρξης συναγωνισμού μεταξύ του γαλλικού οξέος και της 1-φωσφορικής γλυκόζης για το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάση του γλυκογόνου b σε σταθερές συγκεντρώσεις AMP (1mM) και γλυκογόνου (1%). Οι συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0mM, 0.5mM, 1mM, 2mM και 4mM ενώ οι συγκεντρώσεις της 1-φωσφορικής γλυκόζης ήταν 2mM(●), 4mM(■), 6mM(▲), 10mM(◆) και 20mM(▼).

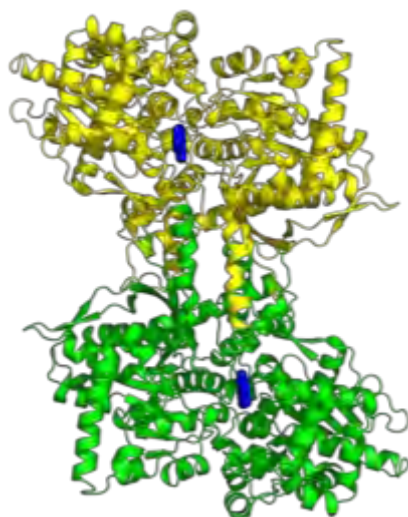
Αντίθετα όπως φαίνεται στο *διάγραμμα 10*, το γαλλικό οξύ συναγωνίζεται την 1-φωσφορική γλυκόζη, που αποτελεί υπόστρωμα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, για την πρόσδεση στο καταλυτικό κέντρο. Αυτό είναι πιθανό να συμβαίνει γιατί οι ενώσεις που προσδένονται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου κλείνουν το κανάλι που φέρει το γλυκογόνο κοντά στο καταλυτικό κέντρο.

7.8 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφικών μελετών από το γαλλικό οξύ.

Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι το γαλλικό οξύ, ως καθαρή ουσία, φαίνεται να προσδένεται στο αλλοστερικό κέντρο όπου προσδένεται το AMP. Για να δούμε όμως τι συμβαίνει στην πραγματικότητα έπρεπε να εκτελέσουμε κρυσταλλογραφική μελέτη έναντι κρυστάλλων GPb εμποτισμένους με διάλυμα γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα των κρυσταλλογραφικών μελετών έδειξαν ότι το γαλλικό οξύ συνδέεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου, κάτι το οποίο επιβεβαιώνει τα κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη για το δείγμα 6 του εκχυλίσματος ροδιού.

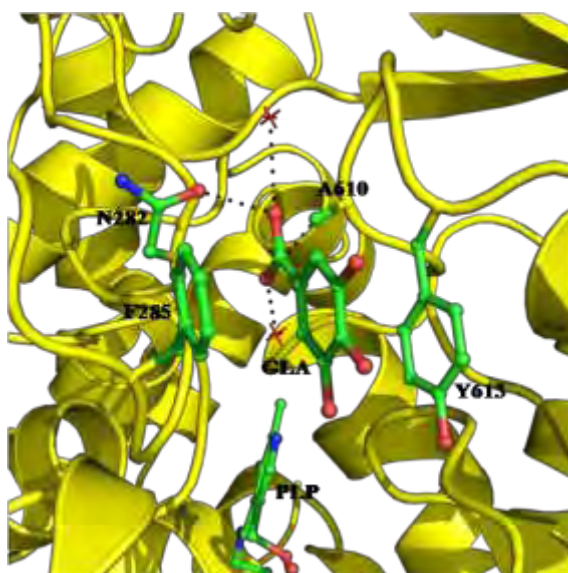


Εικόνα 37: Ηλεκτρονιακή πυκνότητα του μονομερούς του γαλλικού οξέος

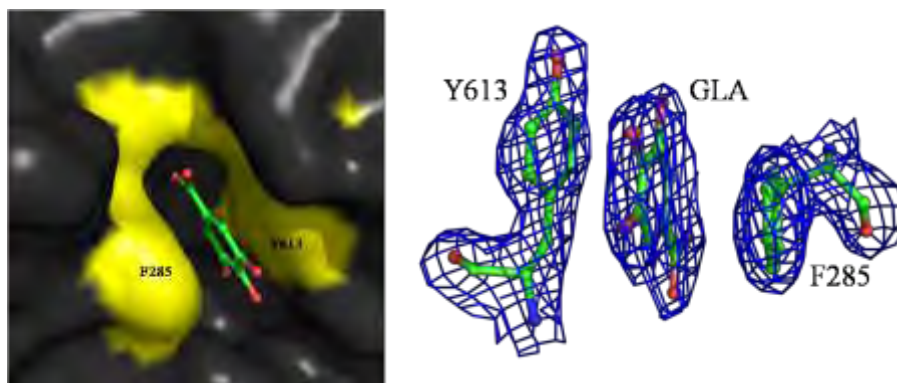


Εικόνα 36: Τρισδιάστατη δομή της βιολογικά ενεργής διμερούς μορφής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Με μπλε χρώμα αποτυπώνεται το μόριο του γαλλικού οξέος το οποίο προσδένεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου.

Στην *εικόνα 37* φαίνεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του γαλλικού οξέος, ενώ στην *εικόνα 38* παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο προσδένεται το μόριο του γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής του ενζύμου, καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται και οι οποίοι περιγράφονται στον *πίνακα 12*. Στον *πίνακα 13* παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις van der Waals που δημιουργούνται μεταξύ του γαλλικού οξέος, των καταλοίπων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b, και των μορίων του νερού



Εικόνα 38: Σύνδεση γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής. Με διακεκομμένες γραμμές φαίνονται οι δεσμοί υδρογόνου.



Εικόνα 39: Στην **αριστερή** εικόνα παρουσιάζεται η μοριακή επιφάνεια της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b όπου φαίνεται η σύνδεση του μορίου του γαλλικού οξέος στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Τα κατάλοιπα που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τα μόρια του γαλλικού οξέος καταγράφονται στην επιφάνεια. Στην **δεξιά** εικόνα παρουσιάζεται διάγραμμα του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας 2Fo-Fc, διαμορφωμένο σε 1,08msd, που παρεμβάλλεται μεταξύ των καταλοίπων Phe285 και Tyr613 τα οποία σχηματίζουν το κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b. Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το REFMAC.

Πίνακας 12: Πολικές αλληλεπιδράσεις του γαλλικού οξέος με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb και τα μόρια του νερού κατά τη σύνδεση στα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου

Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)
		Gallic acid
OAB[O]	Asn282 OD1[O]	3.03
	Water258 OW0[O]	3.29
OAA[O]	Ala610 CB[C]	3.07
	Water36 OW0[O]	2.50

Πίνακας 13: Αλληλεπιδράσεις van der Waals του γαλλικού οξέος με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb και τα μόρια του νερού κατά τη σύνδεση τους στα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου

Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)	Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)	
		Gallic acid			Gallic acid	
OAE[O]	Tyr613 CE1[C]	3.90	OAA[O]	Asn282 CA[C]	3.97	
CAL[C]	Tyr613 CD1[C]	3.82		Ala610 CB[C]	3.07	
	Tyr613 CE1[C]	3.81		Asn282 CB[C]	3.85	
	Phe285 CD1[C]	3.81		Phe285 CB[C]	3.58	
	Phe285 CE1[C]	3.69		Phe285 CG[C]	3.90	
CAI[C]	Tyr613 CD1[C]	3.97		Phe285 CD2[C]	3.91	
	Phe285 CE1[C]	3.74		Asn282 CG[C]	3.92	
CAF[C]	Phe285 CZ[C]	3.78		Asn282 OD1[O]	3.36	
	Tyr613 CB[C]	3.91		Water36 OW0[O]	2.50	
	Tyr613 CG[C]	3.94		CAG[C]	Tyr613 CE2[C]	3.64
	Phe285 CD2[C]	3.81	Tyr613 CD2[C]		3.38	
	Phe285 CZ[C]	3.79	Tyr613 CG[C]		3.73	
Phe285 CE2[C]	3.69	Phe285 CB[C]	3.59			
CAK[C]	Tyr613 CD2[C]	3.79	Phe285 CG[C]		3.41	
	Tyr613 CB[C]	3.82	Phe285 CD1[C]		3.52	
	Tyr613 CG[C]	3.73	Phe285 CD2[C]		3.98	
	Phe285 CB[C]	3.92	Water36 OW0[O]		3.86	
	Phe285 CG[C]	3.46	CAJ[C]		Tyr613 CD1[C]	3.98
	Phe285 CD1[C]	3.83			Tyr613 CE1[C]	3.85
	Phe285 CD2[C]	3.51		Tyr613 CZ[C]	3.65	
	Phe285 CE2[C]	3.91		Tyr613 CE2[C]	3.58	
CAH[C]	Ala610 CB[C]	3.43		Tyr613CD2[C]	3.71	
	Tyr613 CB[C]	3.99		Tyr613 CG[C]	3.92	
	Phe285 CB[C]	3.91		Phe285 CG[C]	3.93	
	Phe285 CG[C]	3.73		Phe285 CD1[C]	3.51	
	Phe285 CD2[C]	3.50		Phe285 CE1[C]	3.91	
	Asn282 OD1[O]	3.59		Tyr613 CE1[C]	3.96	
	Water36 OW0[O]	3.66	Tyr613 CZ[C]	3.41		
OAB[O]	Ala610 CB[C]	3.39	OAD[O]	Tyr613 OH[O]	3.56	
	Phe285 CD2[C]	3.70		Tyr613 CE2[C]	3.50	
	Asn282 CG[C]	3.94		Phe285 CD1[C]	3.97	
	Asn282 OD1[O]	3.03				
	Water258 OW0[O]	3.29				

7.9 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου όπως αναφέραμε υπακούει στο πρότυπο των MWC (εδάφιο §3.3) οι οποίοι πρότειναν το *συμμετρικό πρότυπο* για την ερμηνεία των συνεργειακών φαινομένων. Το πρότυπο αυτό βασίζεται σε δύο βασικές παραδοχές:

α) Το πρωτεϊνικό μόριο ισορροπεί μεταξύ των δομικών καταστάσεων T και R, χωρίς δυνατότητα ύπαρξης ενδιάμεσων υβριδικών καταστάσεων TR.

β) Η μεταβολή της στερεοδομής κάποιου μονομερούς του ενζύμου, λόγω της πρόσδεσης ενός προσδέτη, έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή όλων των μονομερών του ενζυμικού μορίου, ώστε σε κάθε περίπτωση να υπάρχουν μόνο T και R στερεοδομές. Επίσης το πρότυπο δέχεται ότι υποστρώματα και ενεργοποιητές έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για την R στερεοδιαμόρφωση, οπότε δεσμεύονται σε αυτή και μετακινούν την ισορροπία $T \rightleftharpoons R$ προς την R στερεοδομή. Αντίθετα, μόρια αναστολεις έχουν μεγαλύτερη συγγένεια έναντι της T-στερεοδομής, οπότε δεσμεύονται σε αυτή και μετακινούν την ισορροπία προς της κατεύθυνση της T-στερεοδομής.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων:

Το γαλλικό οξύ φαίνεται να μη συναγωνίζεται την καφεΐνη η οποία είναι γνωστό ότι προσδέεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Αντίθετα το γαλλικό οξύ φαίνεται να συναγωνίζεται την 1-φωσφορική γλυκόζη και να μη συναγωνίζεται την γλυκόζη, αν και οι δύο ενώσεις προσδέονται στο καταλυτικό κέντρο. Επίσης το γαλλικό οξύ φαίνεται πως συναγωνίζεται το AMP, το οποίο προσδέεται στο αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης του ενζύμου.

Ο όρος συναγωνιστική αναστολή χρησιμοποιείται για να περιγράψει δύο πιθανές καταστάσεις:

α) Ο αναστολέας και το υπόστρωμα συναγωνίζονται για την ίδια θέση δέσμευσης στο υπόστρωμα, έτσι η δέσμευση του ενός στο ένζυμο να αποκλείει την δέσμευση του άλλου

β) Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει όταν ο αναστολέας δεσμεύεται κοντά στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος, όχι ακριβώς σε αυτή, σε τρόπο ώστε να παρεμποδίζεται στερεοχημικά η προσέγγιση και δέσμευση του υποστρώματος

(Κλώνης Ι., 2006)

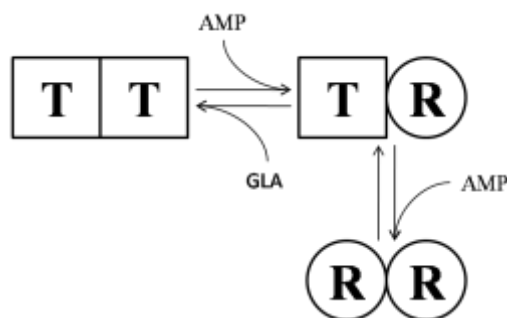
Όπως αναφέραμε, το γαλλικό οξύ όταν προσδέεται στο κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης δημιουργεί φαινόμενο αλλοστερισμού και συνεργατικότητας αφού το γράφημα ταχύτητας προς τη συγκέντρωση υποστρώματος δίνει σιγμοειδή καμπύλη και ο παράγοντας του *Hill* είναι μεγαλύτερος του 1 ($n > 1$). Επίσης, η πρόσδεση του γαλλικού οξέος στη μια υπομονάδα, λόγω θετικής συνεργατικότητας, διευκολύνει την πρόσδεση του γαλλικού οξέος στη δεύτερη υπομονάδα σταθεροποιώντας το ένζυμο

στην T-στερεοδομή. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει στην T-στερεοδομή δεσμεύονται αλλοστερικοί αναστολείς ενώ στην R-στερεοδομή δεσμεύονται αλλοστερικοί ενεργοποιητές. Έτσι λοιπόν, λόγω του φαινομένου του αλλοστερισμού το AMP δεν μπορεί να προσδεθεί στο ένζυμο, εφόσον το ένζυμο βρίσκεται σταθεροποιημένο στην T-στερεοδομή, λόγω πρόσδεσης του γαλλικού οξέος. Αντίθετα, αν το AMP προσδεθεί στο αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης, τότε το ένζυμο μεταπίπτει στην R-στερεοδομή στην οποία δεν μπορεί να προσδεθεί το γαλλικό οξύ με αποτέλεσμα να φαίνεται πως το γαλλικό οξύ συναγωνίζεται το AMP, εφόσον η πρόσδεση του ενός μορίου στο ένζυμο δεν επιτρέπει την πρόσδεση του άλλου. Επομένως, το AMP και το γαλλικό οξύ καθορίζουν την ισορροπία μεταξύ της T και της R στερεοδομής του ενζύμου με το γαλλικό οξύ να δεσμεύεται και να σταθεροποιεί την T-στερεοδομή.

Για τον ίδιο λόγο φαίνεται πως το γαλλικό οξύ συναγωνίζεται την 1-φωσφορική γλυκόζη για το κέντρο αναστολής. Η T-στερεοδομή έχει μικρή συγγένεια για το υπόστρωμα ενώ η R-στερεοδομή έχει μεγάλη συγγένεια για το υπόστρωμα. Επομένως η πρόσδεση του γαλλικού οξέος και η σταθεροποίηση της T-στερεοδομής δεν επιτρέπει την σύνδεση του υποστρώματος.

Επίσης βλέπουμε πως η γλυκόζη και το γαλλικό οξύ δεν συναγωνίζονται. Αυτό είναι απόλυτα λογικό γιατί τόσο το γαλλικό οξύ όσο και η γλυκόζη σταθεροποιούν την T-διαμόρφωση. Δηλαδή η σταθεροποίηση της T-στερεοδομής λόγω πρόσδεσης του γαλλικού οξέος δεν επηρεάζει την πρόσδεση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο. Επιπλέον, τα κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα από το εκχύλισμα ροδιού έδειξαν ότι και η γλυκόζη και το γαλλικό οξύ μπορούν να συνδέονται ταυτόχρονα πάνω στους κρυστάλλους της φωσφορυλάσης στην T-στερεοδομή, χωρίς η πρόσδεση του ενός να επηρεάζει την πρόσδεση του άλλου.

Το γεγονός ότι η καφεΐνη δεν δείχνει να συναγωνίζεται το γαλλικό οξύ για πρόσδεση στο κέντρο αναστολής του ενζύμου μπορεί να εξηγηθεί βασιζόμενοι στο πρότυπο KNF (Koshland, Nimethy και Filmer). Σύμφωνα με αυτό το πρότυπο η μετάβαση από την T- στην R- στερεοδομή κατά την πρόσδεση του δεσμευτή, διέρχεται μέσω ενδιάμεσων υβριδικών στερεοδομών TR. Με απουσία δεσμευτή, η πρωτεΐνη βρίσκεται σε μία κατάσταση (T) και όχι σε ισορροπία μεταξύ δύο καταστάσεων (T και R). Επιπλέον, η πρόσδεση του δεσμευτή σε ένα μονομερές, οδηγεί σε στερεοδιατακτική μεταβολή αυτού του μονομερούς. Η νέα στερεοδιάταξη αυτού του μονομερούς, επηρεάζει το γειτονικό μονομερές κατά τρόπο ώστε να μεταβάλλεται η ικανότητα για δέσμευση υποστρώματος ή τροποποιητή.



Διάγραμμα 13: Το πρότυπο KNF

Αρχικά λοιπόν, όλο το ένζυμο βρίσκεται στην T-στερεοδομή. Προσθήκη αλλοστερικού αναστολέα, όπως το AMP οδηγεί το ένζυμο σε μια μεταβατική κατάσταση στην οποία στην μια υπομονάδα σταθεροποιείται η R διαμόρφωση, ενώ η άλλη εξακολουθεί να βρίσκεται στην T-στερεοδομή. Σε αυτό το σημείο η πρόσδεση του AMP στην άλλη υπομονάδα θα οδηγήσει σε μετατροπή της υπομονάδας από την T- στην R-στερεοδομή έτσι ώστε το ένζυμο να αποκτά συνολικά R-στερεοδομή. Αντίθετα, αν στο μεταβατικό στάδιο προλάβει να συνδεθεί το γαλλικό στην T-στερεοδομή, τότε λόγω των φαινομένων που περιγράψαμε παραπάνω (αλλοστερισμός, συνέργεια) το ένζυμο αποκτά T-στερεοδομή. Η καφεΐνη ουσιαστικά προσδένεται στο ένζυμο μόνο όταν αυτό έχει T-στερεοδομή. Επομένως, το γαλλικό οξύ και η καφεΐνη δεν συναγωνίζονται για την πρόσδεση στην ίδια στερεοδομή του ενζύμου, διότι το γαλλικό οξύ προσδένεται στην μεταβατική κατάσταση (T/R) ενώ η καφεΐνη συνδέεται μόνο στην T-διαμόρφωση.

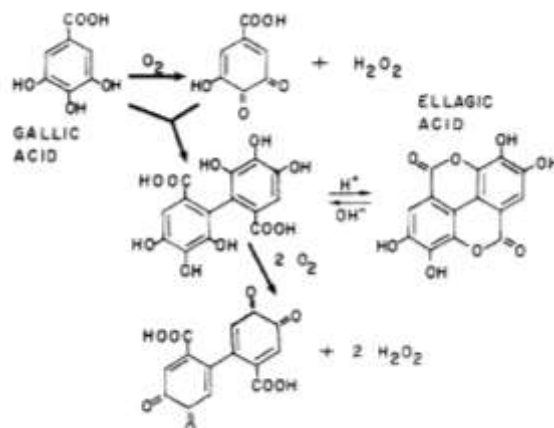
7.10 Αποτελέσματα ex vivo μελετών

Οι μελέτες αποτελεσματικότητας της ανασταλτικής δράσης εκχυλίσματος του ροδιού νο. 6 στη δραστηριότητα της ενδογενούς φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ηπατοκαρκινικών κύτταρων HepG2 δεν έδωσαν στατιστικά σημαντική αναστολή στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν. Πιθανόν η συγκέντρωση των αναστολέων στο μίγμα του εκχυλίσματος να είναι τόσο χαμηλή που να μην επιτρέπει τον προσδιορισμό της πιθανής ανασταλτικής δράσης. Επιπλέον μελέτες απαιτούνται για τη διερεύνηση των απαιτούμενων συγκεντρώσεων ικανών για την επίτευξη πιθανής αναστολής και τον χαρακτηρισμό των ενεργών μορίων στο μίγμα του εκχυλίσματος.

8. Μελλοντικές μελέτες

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες για το δείγμα του εκχυλίσματος ροδιού εκτός από το γαλλικό οξύ έδειξαν έναν ακόμα υποψήφιο για την σύνδεση στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Η ένωση αυτή ονομάζεται ελλαγικό οξύ. Ο λόγος που δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε με ακρίβεια αν είναι τα δύο μόρια του γαλλικού οξέος ή το ελλαγικό οξύ η ένωση η οποία προσδένεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου είναι ότι η δομή του ελλαγικού οξέος μοιάζει με τη αυτή των δύο μορίων του γαλλικού οξέος.

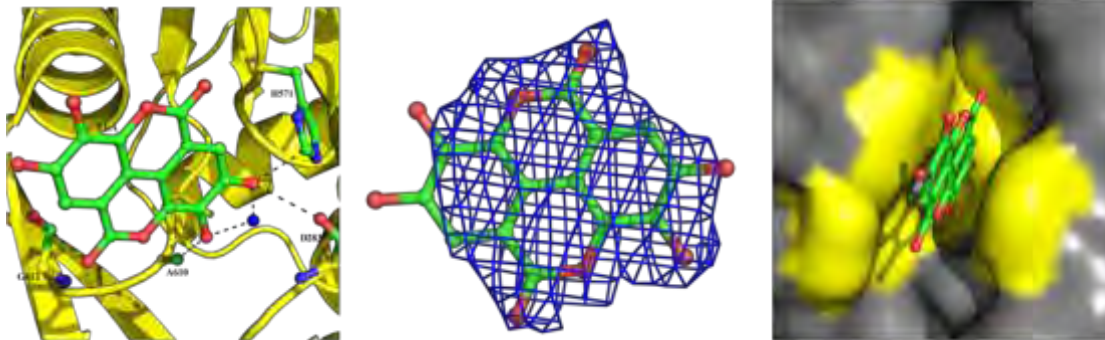
Επιπλέον το ελλαγικό οξύ μπορεί να προέλθει από διμερισμό του γαλλικού οξέος μέσω της αυτο-οξειδωσης του, όπως φαίνεται στην *εικόνα 40*.



Εικόνα 40: Αυτο-οξειδωση του γαλλικού οξέος, διμερισμός (πρόδρομο μόριο του ελλαγικού οξέος) και επαναοξειδωση με συζευγμένη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (Tulyathan V., 1989)

Το ελλαγικό οξύ έχει ήδη μελετηθεί ως προς την ανασταλτική του ισχύ έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (RMGPb) αλλά και ως προς την φωσφορυλάση του γλυκογόνου a. Αντίθετα με το γαλλικό οξύ, το ελλαγικό οξύ, που αποτελεί διμερές του γαλλικού οξέος, φαίνεται να έχει μια ισχυρή αναστολή έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b αλλά και έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου a. Σύμφωνα με τους Somsák L., et al., 2008, η IC_{50} του ελλαγικού οξέος έναντι της RMGPb βρέθηκε στα 12.1 μM , ενώ έναντι της RMGPα βρέθηκε στα 3.2 μM (Somsák L., et al., 2008).

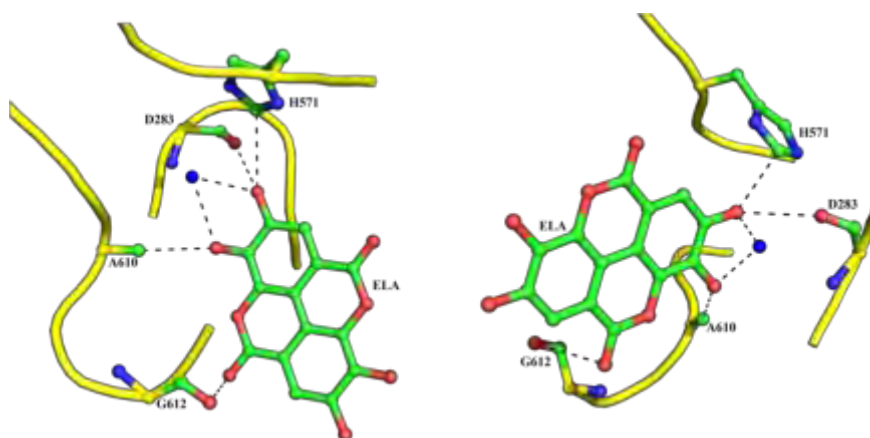
Στις επιμέρους εικόνες που παρουσιάζονται στην *εικόνα 41* παρατηρούμε ότι το ελλαγικό οξύ μπορεί όντως να συνδέεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Η εικόνα προέρχεται από ανάλυση δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X που προήλθαν από εμβάπτιση κρυστάλλου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b και διάλυμα εκχυλίσματος του δείγματος ροδιού No. 6. Φαίνεται λοιπόν πως το ελλαγικό οξύ ενσωματώνεται καλά στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα και μπορεί να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου καθώς και αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα γειτονικά αμινοξέα. Οι δεσμοί υδρογόνου φαίνονται στον πίνακα 14 και στις *εικόνες 41* και *42* ενώ οι αλληλεπιδράσεις van der Waals παρουσιάζονται στον πίνακα 15.



Εικόνα 41: Ελλαγικό οξύ από εκχύλισμα ροδιού

Πίνακας 14: Πολικές αλληλεπιδράσεις του ελλαγικού οξέος και της γλυκόζης από το εκχύλισμα του ροδιού με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb και τα μόρια του νερού κατά τη σύνδεση στα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου

Ατομο αναστολέα	Άτομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)	
		Ellagic acid	BGC
OAE[O]	Ala610 CB[C]	3.10	-
	Water36 OW0[O]	2.88	-
OAD[O]	Asp283 O[O]	3.02	-
	His571 CE1[C]	3.12	-
	Water36 OW0[O]	2.56	-
OAA[O]	Gly612 O[O]	3.28	-
O1[O]	Asn284 ND2[N]	-	2.95
O2[O]	Tyr573 OH[O]	-	3.11
	Glu672 OE1[O]	-	3.21
	Asn284 ND2[N]	-	3.02
	Water321 OW0[O]	-	2.77
O4[O]	Gly675 CA[C]	-	3.28
	Gly675 N[N]	-	2.81
	Water133 OW0[O]	-	2.57
O3[O]	Ala673 N[N]	-	3.26
	Ser674 N[N]	-	2.93
	Gly675 N[N]	-	3.09
	Glu672 OE1[O]	-	2.87
C6[C]	Asn484 OD1[O]	-	3.21
O6[O]	Asn484 OD1[O]	-	2.69
	His377 ND1[N]	-	2.73
C5[C]	Water133 OW0[O]	-	3.28
C4[C]	Water133 OW0[O]	-	3.30



Εικόνα 42: Δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ του ελλαγικού οξέος και των γειτονικών αμινοξέων του κέντρου αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b.

Πίνακας 15 : Αλληλεπιδράσεις van der Waals του ελλαγικού οξέος, από το εκχύλισμα ροδιού No. 6 με τα αμινοξικά κατάλοιπα της GPb και τα μόρια του νερού κατά τη σύνδεση τους στα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου

Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)	Ατομο αναστολέα	Ατομο πρωτεΐνης	Απόσταση (Å)
		Ellagic acid			Ellagic acid
OAE[O]	Ala610 CB[C]	3.10	CAP[C]	Tyr613 CE1[C]	3.74
	Asn282 OD1[O]	3.59		Tyr613 CZ[C]	3.97
	Phe285 CB[C]	3.65		Phe285 CE1[C]	3.93
	Phe285 CG[C]	3.89	OAB[O]	Tyr613 CE1[C]	3.92
	Phe285 CD2[C]	3.94	Tyr613 CZ[C]	3.86	
	Water36 OW0[O]	2.88		Tyr613 OH[O]	3.82
CAM[C]	Tyr613 CG[C]	3.83	CAT[C]	Phe285 CE1[C]	3.94
	Tyr613CD2[C]	3.63	CAU[C]	Phe285 CE1[C]	3.69
	Tyr613 CB[C]	3.93		Phe285 CZ[C]	3.62
	Phe285 CB[C]	3.50	CAV[C]	Tyr613 CG[C]	3.83
	Phe285 CG[C]	3.43		Tyr613 CD1[C]	3.84
	Phe285 CD1[C]	3.90		Phe285 CG[C]	3.86
	Phe285 CD2[C]	3.70		Phe285 CD1[C]	3.58
Water36 OW0[O]	3.62	Phe285 CE1[C]		3.53	
	Tyr613 CG[C]	3.95	Phe285 CZ[C]	3.76	
	Tyr613 CE2[C]	3.56	Phe285 CE2[C]	4.00	
CAL[C]	Tyr613 CD2[C]	3.38	CAS[C]	Tyr613 CG[C]	3.78
	Phe285 CB[C]	3.41		Tyr613 CB[C]	3.72
	Phe285 CG[C]	3.61		Phe285 CG[C]	3.57
	Phe285 CD1[C]	3.80		Phe285 CD1[C]	3.81
	Water36 OW0[O]	3.50		Phe285 CD2[C]	3.53
OAD[O]	His571 ND1[N]	3.68	OAI[O]	Phe285 CE2[C]	3.77
	His571 CE1[C]	3.12		Tyr613 CB[C]	3.86
	Asp283 O[O]	3.02		Phe285 CD2[C]	3.63
	Tyr613 CE2[C]	3.77	Phe285 CE2[C]	3.64	
	Tyr613 CD2[C]	3.73	CAO[C]	Gly612 C[C]	3.76
	Phe285 CB[C]	3.48		Phe285 CE2[C]	3.73
Water36 OW0[O]	2.56	Gly612 O[O]		3.61	
CAH[C]	Tyr613 CZ[C]	3.62	OAA[O]	Gly612 CA[C]	3.70
	Tyr613 CE2[C]	3.40		Gly612 C[C]	3.40
	Tyr613 CD2[C]	3.59		Gly612 O[O]	3.28
	Phe285 CG[C]	3.91	CAQ[C]	Phe285 CZ[C]	3.77
	Phe285 CD1[C]	3.58		Phe285 CE2[C]	3.95
CAR[C]	Tyr613 CG[C]	3.94	CAG[C]	Gly612 O[O]	3.85
	Tyr613 CD1[C]	3.79		Gly612 O[O]	3.77
	Tyr613CE1[C]	3.77			
	Tyr613 CZ[C]	3.86			
	Tyr613 CE2[C]	3.99			
	Phe285 CD1[C]	3.46			
	Phe285 CE1[C]	3.66			

Επομένως είναι φανερό ότι χρειάζεται να πραγματοποιήσουμε μια σειρά μελετών ώστε να προσδιορίσουμε αν το ελλαγικό οξύ έχει την ικανότητα να προσδένεται στο κέντρο αναστολής του ενζύμου. Έτσι, ο επόμενος στόχος είναι η διεξαγωγή κρυσταλλογραφικών μελετών χρησιμοποιώντας το ελλαγικό οξύ ως την υπό μελέτη ουσία. Παράλληλα κινητικές μελέτες θα μας βοηθήσουν να προσδιορίσουμε την σταθερά αναστολής του ελλαγικού οξέος. Επίσης, θα διεξάγουμε και μελέτες για την εύρεση του είδους της αναστολής ως προς τα διάφορα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου ώστε να ταυτοποιήσουμε, και με κινητικές μελέτες, την θέση πρόσδεσης του ελλαγικού οξέος, αν αυτή υπάρχει, όπως ακριβώς κάναμε για το γαλλικό οξύ.

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που πραγματοποιείται στο εργαστήριο Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχολής επιστημών υγείας που έχει ως στόχο την εύρεση και τον χαρακτηρισμό υπογλυκαιμικών ενώσεων που προέρχονται από φυτικά εκχυλίσματα. Οι μελέτες θα επεκταθούν και στη μελέτη και άλλων φυτικών εκχυλισμάτων με στόχο την εύρεση επιπλέον βιοδραστικών ενώσεων με πιθανή υπογλυκαιμική δράση. Όλες οι μελέτες αποσκοπούν στη παραγωγή

σκευασμάτων που θα έχουν ως συστατικά τους, μεταξύ άλλων, φυσικές ενώσεις με υπογλυκαιμική δράση που θα είναι κατάλληλα για διαβητικούς και ίσως ακόμα να μπορούν να αποτελούν και μια εναλλακτική θεραπεία για τον έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα στα αρχικά στάδια του σακχαρώδους διαβήτη. Ακόμα και σε προχωρημένα στάδια του σακχαρώδους διαβήτη, ενδέχεται τέτοια σκευάσματα να βοηθούν τους διαβητικούς ασθενείς να ρυθμίζουν την περιεκτικότητα του αίματος σε γλυκόζη σε συνδυασμό με την χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής. Η σημασία τέτοιων σκευασμάτων θα είναι ιδιαίτερα σημαντική για διαβητικούς ασθενείς καθώς πολλές από τις ενώσεις που έχουν αναφερθεί ως αναστολείς της φωσφορυλάσης b, που προέρχονται από φυτά, είναι και αντιοξειδωτικά. Ένα τέτοιο γεγονός θα μπορούσε να συμβάλει και στην καλύτερη κατάσταση του κυκλοφορικού συστήματος των διαβητικών ασθενών, μιας και ένα σημαντικό πρόβλημα που επιφέρει ο σακχαρώδης διαβήτης είναι οι βλάβες στο κυκλοφορικό σύστημα.

Για να μπορέσουν όμως να υλοποιηθούν όλα τα παραπάνω πρέπει να γίνουν πολλές μελέτες *in vitro* αλλά και *ex vivo* και στη συνέχεια *in vivo* για να καθοριστεί το κατά πόσο αυτές οι φυσικές ουσίες μπορούν να επιφέρουν μείωση των επιπέδων γλυκόζης είτε ελέγχοντας τη μείωση της δραστηριότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε κυτταρικές σειρές, είτε ελέγχοντας την μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα των οργανισμών.

Βιβλιογραφία

Agius L., *New hepatic targets for glycaemic control in diabetes*, Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, Elsevier (2007), doi:10.1016/j.beem.2007.09.001, Vol. 21, No. 4, pp. 587–605,

Al-Hasani H., Yver D. R., Cushman S. W., *Overexpression of the glucose transporter GLUT4 in adipose cells interferes with insulin-stimulated translocation*, Federation of European Biochemical Societies (1999), PII: S 0014 -5793(99)01369-1

Apostolou A., Stagos D., Galitsiou E., Spyrou A., Haroutounian S., Portesis N., Trizoglou I., Hayes A. W., Tsatsakis A. M., Kouretas D., *Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of Vitis vinifera stem extracts*, Food and Chemical Toxicology (2013), Article in Press

Arzu Akpinar-Bayazit, Tulay Ozcan and Lutfiye Yilmaz-Ersan (2012). *The Therapeutic Potential of Pomegranate and Its Products for Prevention of Cancer*, Cancer Prevention - From Mechanisms to Translational Benefits, Dr. Alexandros G. Georgakilas (Ed.), ISBN: 978-953-51-0547-3, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/cancer-prevention-from-mechanisms-to-translational-benefits/thetherapeutic-potential-of-pomegranate-and-its-products-for-prevention-of-cancer> διαθέσιμο στις 11/2/2014

Atkinson M. A., Eisenbarth G. S., Michels A. W., *Type 1 diabetes*, The Lancet (2013), S0140-6736(13)60591-7

Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N., *The allosteric transition of glycogen phosphorylase*, Nature (1989) 340, 609-616.

Berg J. M., Tymoczko J. L., and Stryer L., *Biochemistry 5th edition*, W. H. Freeman (2002), ISBN-10: 0-7167-3051-0

Bollen M., Keppens S. and Stalmans W., *Specific features of glycogen metabolism in the liver*, Biochem. J. (1998), 336, 19-31

Bonora E., Tuomileht J., *The Pros and Cons of Diagnosing Diabetes With A1C*, Diabetes Care (2011), Volume 34, (184-190)

Bradford M. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem (1976). 72, 248–254.

Cer R. Z., Mudunuri U., Stephens R., Lebeda F. J., *IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding*, Nucleic Acids Research (2009)

Cell <http://www.cell.com/cellpress/nobelprize2012> διαθέσιμο στις 11/8/2013

Chiasson J-L., Aris-Jilwan N., Bélanger R., Bertrand S., Beaugard H., Ékoé J-M., Fournier H., Havrankova J., *Diagnosis and treatment of diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state*, CMAJ (2003), 68(7):859-866

Chiu S-L., Cline H. T., *Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function*, (2010), Chiu and Cline Neural Development

Coats W. S., Brownersli M. F., Flettericks R. J., and Newgard C. B., *An Engineered Liver Glycogen Phosphorylase with AMP Allosteric Activation*, The journal of Biological Chemistry (1991) Vol. 266, No. 24, pp. 16113-16119

Danaei G., Finucane M. M., Lu Y., Singh G. M., Cowan M. J., Paciorek C. J., Lin J. K., Farzadfar F., Khang Y.-H., Stevens G. A., Rao M., Ali M. K., Riley L. M., Robinson C. A., Ezzati M., **National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2-7 million participants**, Lancet (2011), DOI:10.1016/S0140-6736(11)60679-X

De Veciana M., **Diabetes ketoacidosis in pregnancy**, Seminars In Perinatology (2013), Elsevier (26–273)

Dixon M., **The Determination of Enzyme Inhibitor Constants**, Biochem. J. (1953), 55 (170–171)

Eslami A. C., Pasanphan W., Wagner B. A., Buettner G. R., **Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study**, Chemistry Central Journal (2010)

Fischer E.H., Krebs E.G., 1962. **Muscle Phosphorylase-B. Methods Enzymol.** 5, 369–373.

Fletterick R. J., Madsen N. B., **The structures and related functions of phosphorylase α** , Annu. Rev. Biochem., (1980), 49, 31-61

Godfrey K. J., Mathew B., Bulman J. C., Shah O., Clement S. and Gallicano G. I., **Stem cell-based treatments for Type 1 diabetes mellitus: bone marrow, embryonic, hepatic, pancreatic and induced pluripotent stem cells**, Diabet. Med. (2012), DOI: 10.1111/j.1464-5491.2011.03433.x (14–23)

Gonzalez-Franquesa A., De Nigris V., Lerin C., and Garcia-Roves P. M., **Skeletal Muscle Mitochondrial Function/Dysfunction and Type 2 Diabetes**, InTech (2012), Chapter 12 (257-292)

Gunton J. E., Delhanty P. J. D., Takahashi S-I., and Bacter R. C., **Metformin Rapidly Increases Insulin Receptor Activation in Human Liver and Signals Preferentially through Insulin-Receptor Substrate-2**, J Clin Endocrinol Metab, (2003), 88(3):1323–1332

Guyton A. C., Hall J. E., **Ιατρική Φυσιολογία**, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου (2008), ISBN 978-960-394-513-0

Hayes J. M., Kantsadi A. L., Leonidas D. D., **Natural Products as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: Potential Treatment For Type 2 Diabetes, 2014, in press**

International Diabetes Federation, <http://www.idf.org/diabetesatlas> διαθέσιμο στις 12/8/13

Johnson K. A., Goody R. S., **The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis –Menten Paper**, Biochemistry (2011), 50, 8264–8269,

Johnson L. N., **Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors**, The FASEB Journal (1992), Vol. 6 (2274-2282)

Kantsadi A. L., Apostolou A., Theofanous S, Stravodimos G. A., Kyriakis E., Gorgogietas V. A., Chatzileontiadiou D. S.M., Pegiou K., Skamnaki V. T., Stagos D., Kouretas D., Psarra A-M. G., Haroutounian S. A., Leonidas D.D., **Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of Vitis vinifera extracts against glycogen phosphorylase**, Food and Chemical Toxicology, Elsevier (2014), *In press*

Kato A.Nasu N.,Takebauashi K., Adachi I., Minami Y., Sanae F., Asano N., Watson A. A., J. Nash R. J., **Structure-Activity Relationships of Flavonoids as Potential Inhibitors of Glycogen Phosphorylase**, J. Agric. Food Chem. (2008), 56, 4469–4473

Van Holde K. E., Johnson W. C., Ho P. S., **Αρχές Φυσιικής Βιοχημείας**, Έμβρυο (2010), ISBN 978-960-8002-55-5

Kechagia D., Paraskvopoulos Y., Symeou E., Galiotou-Panayotou M., Kotseridis Y., ***Influence of Prefermentative Treatments to the Major Volatile Compounds of Assyrtiko Wines***, *J. Agric. Food Chem.* (2008), Vol. 56, No. 12

Kunutsor S. K., Apekey T. A., Walley J., Kain K., ***Ferritin levels and risk of type 2 diabetes mellitus: an updated systematic review and meta-analysis of prospective evidence***, (2013), John Wiley & Sons, accepted article

Leatherbarrow R. J., ***GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd.***, Staines, UK (1998)

Laios K., Karamanou M., Saridaki Z., Androutsos G., ***Aretaeus of Cappadocia and the first description of diabetes***, *Hormones* (2012), *11(1):109-113*

Lee J., Romero R., Dong Z., Lee D. C., Dong Y., Mittal P., Chaiworapongsa T., Hassan S. S., and Kim C. J., ***Glycogen phosphorylase isoenzyme BB plasma concentration is elevated in pregnancy and preterm preeclampsia***, *Hypertension* (2012), doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.177444, 59(2): 274–282.

Lee J., Romero R., Dong Z., Lee D-C., Dong Y., Mittal P., Chaiworapongsa T., Hassan S. S., and Kim C. J., ***Glycogen phosphorylase isoenzyme BB plasma concentration is elevated in pregnancy and preterm preeclampsia***, *NIH* (2012), doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.177444., 59(2): 274–282

Le Roith D., Zick Y., ***Recent Advances in Our Understanding of Insulin Action and Insulin Resistance***, (2001) *Diabetes Care*, Volume 24, number 3, (588-597)

Lillpopp L., Tzikas S., Ojeda F., Zeller T., Baldus S., Bickel C., Sinning C. R., Wild P. S., Genth-Zotz S., Warnholtz A., Lackner K. J., Münzel T., Blankenberg S., and Keller T., ***Prognostic Information of Glycogen Phosphorylase Isoenzyme BB in Patients With Suspected Acute Coronary Syndrome***, *The American Journal of Cardiology* (2012), Elsevier, (110:1225–1230)

Livanova N. B., Chebotareva N. A., Eronina T. B., and Kurganov B. I., ***Pyridoxal 5'-Phosphate as a Catalytic and Conformational Cofactor of Muscle Glycogen Phosphorylase b***, *Biochemistry (Moscow)* (2002), Vol. 67, No. 10, 2002, pp. 1089-1098

Lohkamp B., Emsley P. & Cowtan K., ***Coot News. CCP4 Newsletter*** (2005), 42, Contribution 7.

Maehra R., Chena S., Snitowa M., Ludwig T., Yagasakia L., Golandc R., Leibelc R. L., and Melton D. A., ***Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes***, *PNAS* (2009), vol. 106, no. 37, (15768–15773)

Mahmood K., Naeem M., Rahimnajjad N. A., ***Metformin: The hidden chronicles of a magic drug***, *European Federation of Internal Medicine*. Published by Elsevier (2012), (20–26)

Mansour-Ghanaei R., Joukar F., Soati F., and Khanegha A. G., ***Association between knowledge, locus of control and health belief with self-management, Hb A1c level and number of attendances in type 1 diabetes mellitus patients***, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, (2013), PMID: PMC3703118 ,6(6): (470–477).

Mayhew C. N., and Wells J. M., ***Converting human pluripotent stem cells into b-cells: recent advances and future challenges***, *Current Opinion in Organ Transplantation* (2010), (15:54–60)

Melpidou A. E. and Oikonomakos N. G., ***Effect of glucose-6-P on the catalytic and structural properties of glycogen phosphorylase a***, *Febs Letters* (1983), Volume 154, number 1

Michaelis L. and Menten M. L., ***Die Kinetik der Invertinwirkung***, *Biochemistry (1913)*. Z. 49, 333–369

Monod J., Changeux J-P., and Jacob F., *Allosteric Proteins and Cellular Control Systems*, *J. Mol. Biol.* (1963), (6, 306-329)

Monod J., Wyman J., Changeux J-P., *On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model*, *J. Mol. Biol.* (1965), (12, 88-118)

Murshudov G. N., Vagin A. A., and Dodson E. J., *Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method*, *Acta Crystallogr.*, (1997) D53, 240-255 EU Validation contract: BIO2CT-92-0524

Muzaffar M., Ahmad A., *The Mechanism of Enhanced Insulin Amyloid Fibril Formation by NaCl Is Better Explained by a Conformational Change Model*, *PLoS ONE* (2011), Volume 6, Issue 11, e27906

Nutan, Modi M., Goel T., Das T., Malik S., Suri S., Rawat A. K., Srivastava S. K., Tuli R., Malhotra S., Gupta S. K., *Ellagic acid & gallic acid from Lagerstroemia speciosa L. inhibit HIV-1 infection through inhibition of HIV-1 protease & reverse transcriptase activity*, *Indian J Med Res.* (2013), 137(3):540-8.

Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., & Johnson, L.N., *Rabbit muscle glycogen phosphorylase b. The structural basis of activation and catalysis (review)*. In *Post-Translational Modification of Proteins*, (1992), (Harding, J.J. and Crabbe, M.J.C, eds.), pp. 81-151, CRC Press Inc

Oikonomakos N. G., Acharya K. R., Stuart D. I., Melpidou A. E., McLaughlin P. J., and Johnson L. N., *Uridine(S)diphospho(D)-a-glucose A binding study to glycogen phosphorylase b in the crystal*, *Eur. J. Biochem.* (1988), FEBS, 173, 569-578

Oikonomakos N. G., Schnier J. B., Zographos S. E., Skamnaki V. T., Tsitsanou K. E., and Johnson L. N., *Flavopiridol Inhibits Glycogen Phosphorylase by Binding at the Inhibitor Site*, *The journal of Biological Chemistry* (2000), Vol. 275, No. 44, pp. 34566–34573, 2000

Oikonomakos N. G., Skamnaki V. T., Tsitsanou K. E., Gavalas N. G., and Johnson L. N., *A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions*, *Structure* (2000), No.6, (Vol 8:575–584)

Oikonomakos N. G., Tsitsanou K. E., Zographos S. E., Skamnaki V. T., Goldmann S., and Bischoff H., *Allosteric inhibition of glycogen phosphorylase a by the potential antidiabetic drug 3-isopropyl 4-2-chlorophenyl-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate*, *Protein Science* (1999), 8:1930–1945

Orhan N., Aslan M., Orhan D. D., Ergun F., Yeşilada E., *In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (Vitis vinifera) in diabetic rats*, *Journal of Ethnopharmacology* 108 (2006) 280–286

Palm D. C., Rohwer J. M., and Hofmeyr J-H. S., *Regulation of glycogen synthase from mammalian skeletal muscle – a unifying view of allosteric and covalent regulation*, *FEBS Journal* (2013), doi:10.1111/febs.12059, 280 (2–27)

Palm D., Klein H. W., Schinzel R., Buehner M., and Helmreich E. J. M., *The Role of Pyridoxal 5'-Phosphate in Glycogen Phosphorylase Catalysis*, *Biochemistry* (1990), (1099-1106).

Pugliese A., *The multiple origins of Type 1 diabetes*, *Diabetic Medicine* (2012), DOI: 10.1111/dme.12081 (135-146)

Rhodes C. J., *Type 2 Diabetes - a Matter of b-Cell Life and Death?*, *Science* (2005) Vol 307 Scinece, (380-384)

Rhodes G., *Crystallography made crystal clear – 3rd ed.*, Elsevier (2006), ISBN 0-12-587073-6 (alk. paper)

Roach P. J., Depaoli-Roach A. A., Hurley T. D. and Tagliabracci V. S., *Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes*, *Biochem. J.* (2012) 441, 763–787

Scognamiglio V., *Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years*, *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier (2013), (12–25)

Saheki S., Takeda A. & Shimazu T., *Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity*, *Anal. Biochem* (1985), 148, 277-281.

Stallforth P., Clardy J., *One size fits most*, *Nature*, vol 495, 2013

Steiner R. F., Greer L., Gunther C. and Hora C., *The interaction of phosphorylase b with AMP*, *Biochimica et Biophysica Acta* (1976), Elsevier, 445, 610-621

Somsák L., Czifrák K., Tóth M., Bokor É., Chrysina E. D., Alexacou K-M., Hayes J. M., Tiraidis C., Lazoura E., Leonidas D. D., Zographos S. E., Oikonomakos N. G., *New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents*, *Current Medicinal Chemistry* (2008), 15, 2933-2983

Takahashi K., and Yamanaka S., *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*, *Cell* (2006), DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024 (126,663–676)

The International Expert Committee, *International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes*, *Diabetes Care* (2009), Volume 32, Number 7, (1327-1334)

Tsitsanou K. E., Hayes J. M., Keramioti M., Mamais M., Oikonomakos N. G., Kato A., Leonidas D. D., Zographos S. E., *Sourcing the affinity of flavonoids for the glycogen phosphorylase inhibitor site via crystallography, kinetics and QM/MM-PBSA binding studies: Comparison of chrysin and flavopiridol* *Food and Chemical Toxicology* (2013), Article in press

Tsitsanou K. E., Skamnaki V. T., Oikonomakos N. G., *Structural Basis of the Synergistic Inhibition of Glycogen Phosphorylase a by Caffeine and a Potential Antidiabetic Drug*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2000), Vol. 384, No. 2, pp. 245–254, 2000 doi:10.1006/abbi.2000.2121

Tulyathan V., Boulton R. B., Singleton V. L., *Oxygen Uptake by Gallic Acid as a Model for Similar Reactions in Wines*, *J. Agric. Food Chem.*, (1989), Vol. 37, No. 4,

Usher-Smith J. A., Thompson M., Ercole A., Walter F. M., *Variation between countries in the frequency of diabetic ketoacidosis at first presentation of type 1 diabetes in children: a systematic review*, *Diabetologia* (2012), DOI 10.1007/s00125-012-2690-2, (55:2878–2894)

Van Greevenbroek M.M.J., Schalkwijk C.G., Stehouwer C.D.A., *Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequence*, *The Netherlands journal of medicine* (2013), Vol. 71, No 4, (174-187)

Viollet B., Guigas B., Sanz Garcia N., Leclerc J., Foretz M., and Andreelli F., *Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview*, *Clin Sci (Lond)*, (2012), doi: 10.1042/CS20110386.

Wasserman S. R., Koss J. W., Sojitra S. T., Morisco L. L., Burley S. K., *Rapid-access, high-throughput synchrotron crystallography for drug discovery*, *Trends in Pharmacological Sciences*, Elsevier, (2012)

Witters L. E. , Avruch J., *Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase*, *Biochemistry* (1978), 17 (3), pp 406–410, DOI: 10.1021/bi00596a004

Xu K., Morgan K. T., Gehris A. T., Elston T. C., Gomez S. M.. *A Whole-Body Model for Glycogen Regulation Reveals a Critical Role for Substrate Cycling in Maintaining Blood Glucose Homeostasis*, *PLoS Computational Biology*, (2011)

Yan W., Li X., *Impact of diabetes and its treatments on skeletal diseases*, *Front. Med.* (2012) DOI 10.1007/s11684-013-0243-9

Youngren J. F., *Regulation of insulin receptor function*, *Cell. Mol. Life* (2007), Sci. 64, DOI 10.1007/s00018-007-6359-9, (873-891)

Zhang L., Chen X., Liu J., Zhu Q., Leng Y., Luo X., Jiang H., Liu H., *Discovery of novel dual-action antidiabetic agents that inhibit glycogen phosphorylase and activate glucokinase*, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2012), 58, 624e639

Zick Y., *Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling*, *Trends in Cell Biology* (2001), Vol.11 No.11, (437-441)

Γεωργάτσος Ι. Γ., Γιουψάνης Τ. Α., Κυριακίδης Δ. Α., *Ενζυμολογία*, Εκδόσεις Ζήτη (2001), ISBN 960-431-748-2

Καραϊσκάκης Γ., *Φυσικοχημεία*, εκδόσεις Π. Τραυλός (1998), ISBN 960-7122-31-3

Κλώνης Ι., *Ενζυμολογία*, Έμβρυο (2007), ISBN 960-8002-44-9, Κεφάλαιο 8: Ρύθμιση δραστηριότητας των ενζύμων, 211-250