

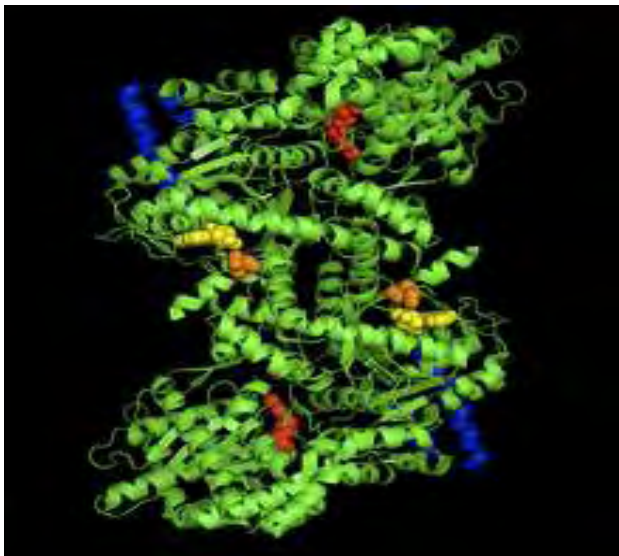


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

**Βιοχημική αξιολόγηση παραπροϊόντων χυμοποίησης  
ροδιού για υπογλυκαιμική δράση**



Λεμονάκης Άγγελος,

Λάρισα 2014

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Δρ. Στάγκος Δημήτριος

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

- Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|  |           |
|--|-----------|
| Ευχαριστίες.....   | 5         |
| Περίληψη.....  | 6         |
| Abstract.....  | 7         |
| <b>1. Εισαγωγή.....</b>  | <b>8</b>  |
| 1.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....   | 8         |
| 1.2 Τύποι σακχαρώδους διαβήτη.....                                       | 9         |
| 1.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ινσουλινο-εξαρτώμενος, IDDM).....     | 9         |
| 1.2.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (μη ινσουλινο-εξαρτώμενος, NIDDM)..... | 10        |
| 1.2.2.1 Χαρακτηριστικά και συμπτώματα της νόσου.....                     | 10        |
| 1.2.2.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....                                   | 11        |
| 1.3 Ομοιοστασία της γλυκόζης.....  | 12        |
| 1.3.1 Ινσουλίνη.....   | 12        |
| 1.3.2 Γλυκαγόνη.....   | 13        |
| 1.3.3 Σύστημα ανατροφοδότησης ινσουλίνης-γλυκαγόνης.....                 | 14        |
| <b>2. Βασικές γνώσεις.....</b>   | <b>15</b> |
| 2.1 Γλυκόζη.....   | 15        |
| 2.2 Γλυκογόνο.....   | 18        |
| 2.2.1 Ρόλος του γλυκογόνου.....  | 18        |
| 2.2.2 Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....                                   | 19        |
| 2.2.3 Ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου.....                       | 21        |
| 2.3 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP).....                                      | 22        |
| 2.3.1 Τι είναι.....  | 22        |
| 2.3.2 Η PLP συμμετέχει στη φωσφορλυτική διάσπαση του γλυκογόνου.....     | 23        |
| 2.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....                                      | 25        |
| 2.4.1 Ιστορική αναδρομή.....   | 25        |
| 2.4.2 Γενικά.....  | 26        |
| 2.4.3 Γενετικός τόπος της μυϊκής GP.....                                 | 26        |
| 2.4.4 Δομή.....  | 27        |
| 2.4.5 Μηχανισμός δράσης.....   | 28        |
| 2.4.6 Ρύθμιση.....   | 29        |

|                                   |  |           |
|-----------------------------------|--|-----------|
| 2.4.7                             | Κρυσταλλική δομή και κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....                    | 34        |
| 2.5                               | Κινητική ενζύμων και ενζυμική αναστολή .....   | 38        |
| 2.6                               | Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....                          | 42        |
| 2.7                               | Φυσικά εκχυλίσματα ως πιθανές υπογλυκαιμικές ενώσεις.....                                    | 43        |
| 2.7.1                             | Γενικά.....  | 43        |
| 2.7.2                             | Εκχυλίσματα ροδιού.....  | 45        |
| 2.7.3                             | Επεξεργασία εκχυλίσματος παραπροϊόντων βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού και παραλαβή..... | 47        |
| <b>Σκοπός εργασίας</b> .....      |  | <b>48</b> |
| <b>3. Πειραματικό μέρος</b> ..... |  | <b>49</b> |
| 3.1                               | Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού.....                   | 49        |
| 3.2                               | Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....   | 53        |
| 3.2.1                             | Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου.....                                    | 53        |
| 3.2.2                             | Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ ).....                                   | 54        |
| 3.2.3                             | Προσδιορισμός $IC_{50}$ αναστολέα.....   | 56        |
| 3.3                               | Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b.....   | 57        |
| 3.4                               | Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης.....      | 58        |
| 3.5                               | Παρασκευή τυφλών.....  | 60        |
| 3.6                               | Προσδιορισμός φωσφόρου.....  | 61        |
| 3.7                               | Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit.....                           | 62        |
| 3.8                               | Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων της Grb.....  | 65        |
| <b>4. Αποτελέσματα</b> .....      |  | <b>67</b> |
| 4.1                               | Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου .....  | 67        |
| 4.2                               | Αποτελέσματα κινητικών μελετών.....  | 68        |
| 4.2.1                             | Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....                          | 68        |
| 4.2.2                             | Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού.....                           | 69        |
| 4.3                               | Συμπεράσματα.....  | 71        |
| <b>Βιβλιογραφία</b> .....         |  | <b>72</b> |

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

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

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, που μου έδωσε την δυνατότητα να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία. Οι γνώσεις του αλλά και η καθοδήγησή του υπήρξαν σημαντικές.

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

Η παρούσα εργασία δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την πολύτιμη συνεργασία και βοήθεια της υποψήφιας διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Π.Θ., Αναστασίας Καντσάδη, καθώς και του υποψήφιου διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Π.Θ., Γεώργιου Στραβοδήμου. Η υπομονή και η βοήθειά τους στο εργαστήριο ήταν καθοριστικές.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν, καθώς και την οικογένειά μου για την εμπιστοσύνη και την υπομονή της όλα αυτά τα χρόνια.

Εύχομαι σε όλους επαγγελματική και προσωπική επιτυχία.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια σοβαρή μεταβολική ασθένεια στο δυτικό κόσμο, η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης. Μπορεί να οφείλεται είτε στην ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης είτε στην ελάττωση της ευαισθησίας των σωματικών κυττάρων στην ινσουλίνη. Η θεραπευτική προσέγγιση έγκειται στη διατήρηση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα όσο το δυνατόν πιο κοντά στα φυσιολογικά. Για το σκοπό αυτό, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για την εύρεση μορίων που εκλεκτικά θα τα αυξάνουν ή θα τα μειώνουν, έτσι ώστε να είναι εφικτή η ρύθμιση των επιπέδων του σακχάρου στον οργανισμό. Προς αυτήν την κατεύθυνση, το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία, απομονώσαμε το ένζυμο φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μυς κουνελιού και μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση εκχυλισμάτων παραπροϊόντων της διαδικασίας παραγωγής χυμού από ρόδι της ποικιλίας Wonderful (Δείγμα 8, Δείγμα 9), στην ενζυμική δραστηριότητα. Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι τα εκχυλίσματα αποτελούν μέτριας ισχύος αναστολείς του ενζύμου με σταθερά αναστολής,  $IC_{50}$  8.52μg/ml και 37.12μg/ml, αντίστοιχα.

## **ABSTRACT**

Diabetes mellitus, one of the most serious metabolic diseases today, is characterized by elevated blood glucose levels (hyperglycemia) and glucose metabolism imbalance. It may be due either to reduced insulin secretion or reducing the sensitivity of somatic cells to insulin. The main goal in diabetes treating is to keep blood sugar as close as possible to normal limits. For this reason, enzymes and cellular receptors involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets in order to discover molecules, which increase or reduce them. In this way, the enzyme glycogen phosphorylase is one of the most important molecular targets for designing new hypoglycemic drugs.

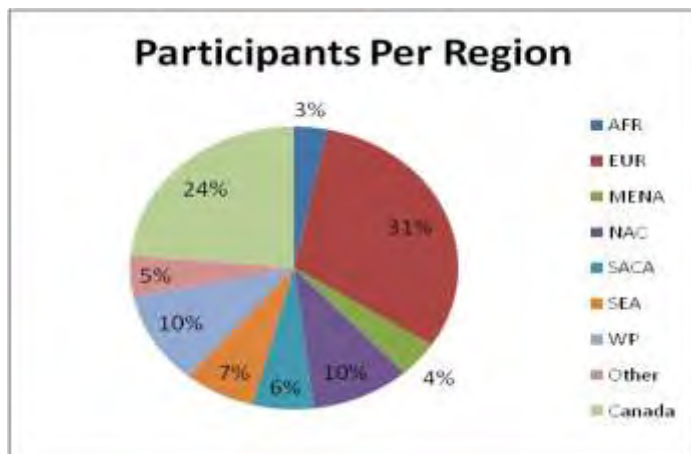
In the present study, we isolated the enzyme glycogen phosphorylase b from rabbit skeletal muscles and studied with kinetic experiments, the effect of polyphenolic extracts (Sample 8, Sample 9) from the byproducts of the industrial production of juice from pomegranates on its enzymatic activity. The kinetic experiments, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that the extracts are moderate inhibitors of the enzyme with  $IC_{50}$  value of  $8.52\mu\text{g/ml}$  και  $37.12\mu\text{g/ml}$ , respectively.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη ασθένεια, κυρίως στις κοινωνίες “δυτικού τύπου” και σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Διαβήτη πλήττει πάνω από 370 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως, με συχνότητα περίπου 8% (**Εικόνα 1**). Μάλιστα μελέτες δείχνουν ότι ο αριθμός των νοσούντων αναμένεται να φτάσει στα 550 εκατομμύρια μέχρι το 2030.

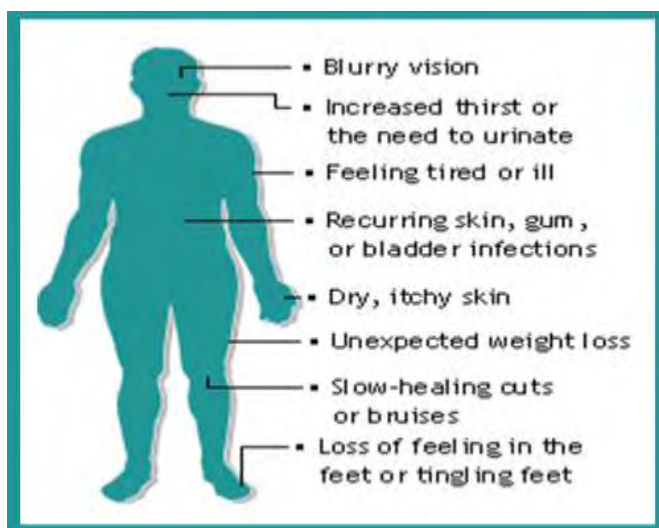
Πρόκειται για μια μεταβολική διαταραχή , όπου είτε παρουσιάζεται μειωμένη ή μηδενική ικανότητα του παγκρέατος για παραγωγή ινσουλίνης , είτε παρατηρείται ανικανότητα των σωματικών κυττάρων να εισάγουν στο εσωτερικό τους την ινσουλίνη (αντίσταση στην ινσουλίνη). Άμεσο αποτέλεσμα είναι η αύξηση του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) με δραματικές συνέπειες στη φυσιολογική λειτουργία των ιστών. Στην ουσία, ο διαβήτης αντιπροσωπεύει ένα σύνολο πολλών διαφορετικών διαταραχών στον οργανισμό, με κοινό γνώρισμα όλων τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα.



**Εικόνα 1.** Συχνότητα νοσούντων του διαβήτη ανά τον πλανήτη

Τα κλασικά συμπτώματα που παρατηρούνται είναι: αυξημένη δίψα, πολουρία, κούραση, έντονη πείνα και πολυφαγία, απώλεια σωματικού βάρους, θολωμένη όραση, σεξουαλικές διαταραχές και ευπάθεια σε λοιμώξεις. Επίσης μπορεί να οδηγήσει σε αμφιβληστροειδοπάθεια, νευροπάθεια, νεφροπάθεια καθώς και σε εμφάνιση αρτηριοσκλήρυνσης (στεφανιαία νόσος, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια). (**Εικόνα 2**).





**Εικόνα 2.** Συμπτώματα του διαβήτη

## 1.2 Τύποι Σακχαρώδους Διαβήτη

Οι κύριες κατηγορίες του σακχαρώδους διαβήτη είναι ο διαβήτης τύπου 1 (νεανικός ή ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης), ο διαβήτης τύπου 2 (μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης) και ο διαβήτης κύησης.

### 1.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ινσουλινοεξαρτώμενος IDDM)

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 προκύπτει από την αυτοάνοση καταστροφή των κυττάρων β του παγκρέατος που παράγουν την ορμόνη ινσουλίνη. Αυτό έχει αποτέλεσμα την έκκριση ελάχιστης ή καθόλου ποσότητας ινσουλίνης, επομένως ο ασθενής παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα σακχάρου στο αίμα και στα ούρα (υπεργλυκαιμία και γλυκοζουρία αντίστοιχα), λόγω της ανικανότητας των κυττάρων να προσλάβουν τη γλυκόζη. Υπό αυτή την έννοια, ο ασθενής με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I είναι απόλυτα εξαρτημένος από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης προκειμένου τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα του να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα.

Μια οξεία επιπλοκή που παρατηρείται απουσία της ινσουλίνης είναι η συσσώρευση των υποπροϊόντων της διάσπασης των λιπών και των μυικών πρωτεϊνών στο αίμα, που οδηγεί στην παραγωγή ουσιών που ονομάζονται κετόνες. Όταν τα επίπεδα των κετονών αυξηθούν σε μεγάλο βαθμό ο ασθενής θα υποστεί κετοοξεϊκό κώμα.

Ο τύπος αυτός αποτελεί την κυριότερη αιτία διαβήτη σε παιδιά (νεανικός διαβήτης ως απόδοση όρου παλαιότερα), μπορεί όμως να προσβάλλει και τους ενήλικες. Πρόκειται για τον σπανιότερο από τους 2 τύπους (περίπου 10% των διαβητικών) και όταν εμφανιστεί συνήθως εκδηλώνεται απότομα με έντονα κλινικά συμπτώματα, όπως πολυουρία, πολυδιψία, πολυφαγία, μεγάλη απώλεια βάρους σε σύντομο χρονικό διάστημα, καθώς και ευαισθησία στις λοιμώξεις.

Εξακολουθεί να παραμένει άγνωστη η αιτία της εκλεκτικής και ποσοτικής καταστροφής των β-κυττάρων που χαρακτηρίζει αυτόν τον τύπο. Πιθανοί παράγοντες ενεργοποίησης θεωρούνται η κληρονομικότητα, διάφοροι ιοί που διεγείρουν την ανοσολογική διέγερση των T κυττάρων και το στρες.

## **1.2.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (μη ινσουλινοεξαρτώμενος NIDDM)**

### **1.2.2.1 Χαρακτηριστικά και συμπτώματα της νόσου**

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, παλαιότερα αποκαλούμενος ως μη ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης είναι ο πιο συχνός τύπος διαβήτη (αποτελεί το 90-95% των περιπτώσεων σακχαρώδη διαβήτη) και προσβάλλει κυρίως ενήλικα άτομα. Χαρακτηρίζεται από το συνδυασμό ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης και ελαττωμένης ευαισθησίας των κυττάρων στη δράση της (αντίσταση στην ινσουλίνη). Σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου 1 που έχουμε παντελή έλλειψη ινσουλίνης (ή σε ίχνη), το πάγκρεας παράγει ινσουλίνη, η οποία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τους ιστούς.

Σημαντικός προδιαθεσικός παράγοντας για την ανάπτυξη της ασθένειας είναι η παχυσαρκία πιθανόν λόγω της παραγωγής από το λιπώδη ιστό ουσιών που ελαττώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Υψηλό κίνδυνο εκδήλωσης παρουσιάζουν και άτομα με κλινικά στοιχεία του μεταβολικού συνδρόμου (υπέρταση, αύξηση της περιμέτρου της κοιλιάς, διαταραχές των λιπιδίων του αίματος). Πιθανότατα όμως προκαλείται από πολλούς παράγοντες.

Στον διαβήτη τύπου 2, τα συμπτώματα είναι πιο ήπια και η πιθανότητα εμφάνισης διαβητικής κετοξέωσης είναι μικρή. Παρ' όλ' αυτά, ο κίνδυνος απώτερων και σοβαρών επιπλοκών παραμένει υψηλός. Τα συμπτώματα διαφέρουν από ασθενή σε ασθενή αλλά τα κυριότερα είναι: Τα συμπτώματα διαφέρουν από ασθενή σε ασθενή αλλά τα κυριότερα είναι: αυξημένη

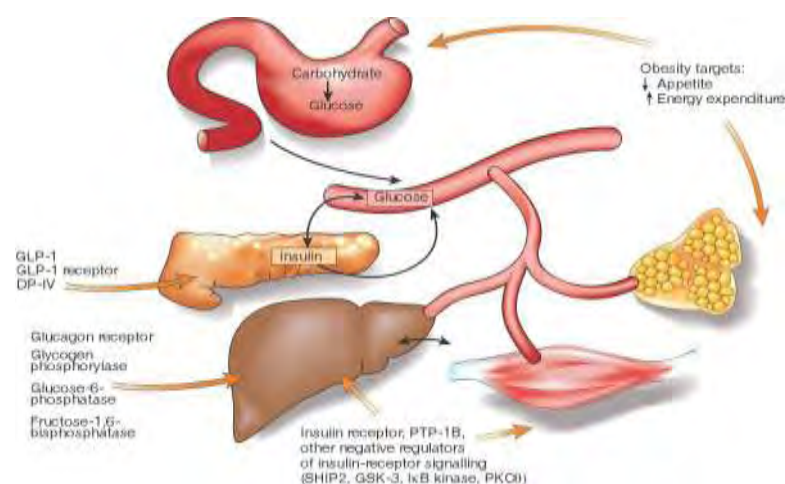
δίψα, αυξημένη όρεξη, ξερό στόμα, ναυτία η και έμετοι, πολυουρία, κούραση, εξάντληση, διαταραχές της όρασης, μουδιάσματα η μυρμηγκιάσματα σε χέρια και πόδια, συχνές φλεγμονές του δέρματος, του ουροποιητικού και του κόλπου.

Ο ασθενής που θα διαγνωστεί αρχικά είναι υποχρεωμένος να αλλάξει τον τρόπο ζωής με στόχο την απώλεια βάρους, την υγιεινή διατροφή και τη σωματική άσκηση. Εάν κριθεί απαραίτητο, χορηγούνται αντιδιαβητικά φάρμακα.

### 1.2.2.2 Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Οι τρέχουσες θεραπείες για τη νόσο αυτή αναπτύχθηκαν απουσία καθορισμένων μοριακών στόχων ή με σκοπό την κατανόηση της παθογένεσης της νόσου. Η αναδυόμενη γνώση των βασικών παθογενετικών μηχανισμών, όπως η ανεπάρκεια της έκκρισης ινσουλίνης που διεγείρεται απ' τη γλυκόζη και ο ρόλος της «λιπτοτοξικότητας» ως πιθανή αιτία της ηπατικής και μυϊκής αντοχής στην ινσουλίνη που επιδρά στο μεταβολισμό της γλυκόζης, έχει οδηγήσει σε μια σειρά νέων μοριακών στόχων φαρμάκων. Αρκετοί από αυτούς έχουν επιβεβαιωθεί μέσω της γενετικής μηχανικής σε ποντίκια ή της προκαταρκτική χρήση βασικών συστατικών και θεραπευτικών παραγόντων σε ζώα και ανθρώπους.<sup>[1]</sup>

Πιθανοί στόχοι φαρμάκων περιλαμβάνουν τον υποδοχέα γλυκαγόνης (ανταγωνιστές), τη φωσφορυλάση γλυκογόνου (αναστολείς), και άλλα ρυθμιστικά ένζυμα όπως η φωσφατάση της 6-P γλυκόζης και η φωσφατάση της 1,6 -διφωσφορικής φρουκτόζης (αναστολείς). **(Εικόνα 3)**<sup>[1]</sup>



**Εικόνα 3.** Η κατανόηση των διαταραχών που σχετίζονται με διάφορα βασικά συστήματα οργάνων έχει οδηγήσει σε δημιουργία νέων στόχων φαρμάκων για τον διαβήτη τύπου 2.<sup>[1]</sup>

### 1.3 Ομοιοστασία της γλυκόζης

Ο οργανισμός διαθέτει αυστηρούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς για τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης στο αίμα, λειτουργία γνωστή ως ομοιοστασία της γλυκόζης. Φυσιολογικά η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα κατά τις περιόδους νηστείας και μεταγευματικά διατηρείται σε στενό σχετικά εύρος ορίων μεταξύ 60-120 mg/dL. Η ομοιοστασία της γλυκόζης εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ (γλυκονεογένεση) και της χρησιμοποίησής της (γλυκόλυση), τόσο από ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο λιπώδης και ο μυϊκός ιστός, όσο και από μη ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος και ο νεφρικός ιστός.

Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα ελέγχεται από το πάγκρεας μέσω της παραγωγής ινσουλίνης ( β κύτταρα) και γλυκαγόνης ( α κύτταρα). Η πρώτη διεγείρει την πρόσληψη της γλυκόζης απ' τους ιστούς και συμβάλλει στη μείωσή της στο αίμα, ενώ η δεύτερη αυξάνει τα επίπεδά της στο αίμα. Η ινσουλίνη είναι η βασική ρυθμιστική ορμόνη σε φυσιολογικά εύρη των τιμών της γλυκόζης. <sup>[2]</sup>

Η ρύθμιση της παραγωγής και της κατανάλωσης της γλυκόζης επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους:

α) Την ικανότητα του παγκρέατος να εκκρίνει ινσουλίνη για σύντομο χρονικό διάστημα, αλλά και σε συνεχόμενο ρυθμό.

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

γ) Την ικανότητα της γλυκόζης να εισέρχεται στα κύτταρα απουσία ινσουλίνης (ευαισθησία γλυκόζης ή αποτελεσματικότητα γλυκόζης). <sup>[2]</sup>

#### 1.3.1 Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο περίπου 6 kDa που παράγεται στα β κύτταρα των νησιδίων του Langerhans. Αποτελείται από 51 αμινοξέα, 21 αμινοξέα στην Α αλυσίδα και 30 στη Β (**Εικόνα 4**).

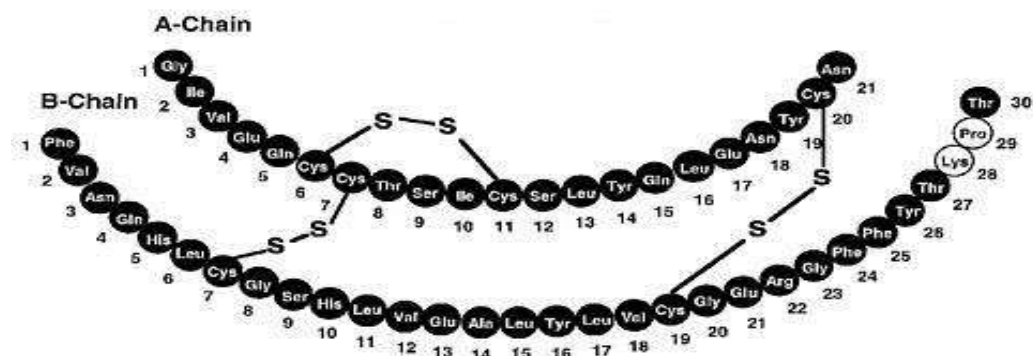
Προέρχεται από ένα άλλο πολυπεπτίδιο, την προϊνσουλίνη (9 kDa) που προκύπτει απ' την προ-προϊνσουλίνη (11,5 kDa) στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Αυτές οι πρόδρομες μορφές είναι βιολογικά αδρανείς και όταν σχηματιστεί η ώριμη ινσουλίνη στα κυστίδια του συμπλέγματος Golgi, εκκρίνεται απευθείας στο αίμα (ενδοκρινής ορμόνη). Ωστόσο πριν φτάσει στη συστηματική κυκλοφορία διέρχεται απ' το ήπαρ όπου μπορεί να αδρανοποιηθεί μέχρι και το 40% του συνόλου της. <sup>[3]</sup>

Όσον αφορά το μεταβολισμό της γλυκόζης, η ινσουλίνη παίζει καθοριστικό ρόλο μειώνοντας τη συγκέντρωσή της στο αίμα, με 4 τρόπους :

1. αυξάνει την πρόσληψη της γλυκόζης από τους μυς, το λιπώδη ιστό, τα λευκοκύτταρα και το ήπαρ,
2. μειώνει το ρυθμό γλυκογονόλυσης (αποδόμηση του γλυκογόνου σε γλυκόζη)
3. αυξάνει τη γλυκογονογένεση (παραγωγή γλυκογόνου από γλυκόζη)
4. μειώνει τη γλυκονεογένεση (σχηματισμός γλυκόζης από μη υδατανθρακούχες ουσίες) <sup>[3]</sup>

Επίσης η ινσουλίνη προάγει το μεταβολισμό των περισσότερων ιστών και την κυτταρική ανάπτυξη, δρώντας και σαν αυξητικός παράγοντας ιδιαίτερα κατά την πρώιμη εμβρυϊκή περίοδο.

Η έκκριση της ινσουλίνης επηρεάζεται, κυρίως, από τη συγκέντρωση των σακχάρων αλλά και των αμινοξέων στο αίμα. Αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης ή των αμινοξέων αυξάνει την έκκριση και τη σύνθεση ινσουλίνης στο πάγκρεας. <sup>[3]</sup>



**Εικόνα 4.** Ανθρώπινη ινσουλίνη

### 1.3.2 Γλυκαγόνη

Η γλυκαγόνη είναι ένα πολυπεπτίδιο με μοριακό βάρος 3,5 kDa. Παράγεται στην ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος από τα α κύτταρα των νησιδίων του Langerhans. Η ώριμη γλυκαγόνη που προκύπτει από την πρωτεόλυση της προ-γλυκαγόνης αποτελείται από 29 αμινοξέα (**Εικόνα 5**).



**Εικόνα 5.** Αμινοξική σύσταση γλυκαγόνης

Ο ρόλος της γλυκαγόνης είναι αντίθετος απ' αυτόν της ινσουλίνης όσον αφορά το μεταβολισμό των υδατανθράκων. Η γλυκαγόνη αυξάνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και διεγείρει τη γλυκονεογένεση και τη γλυκογονόλυση στο ήπαρ. Επίσης αυξάνει τη συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα διεγείροντας τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό. [3]

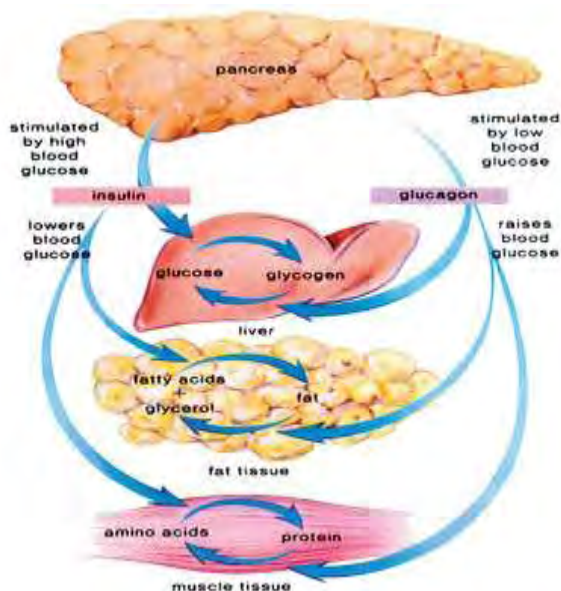
### 1.3.3 Σύστημα ανατροφοδότησης ινσουλίνης-γλυκαγόνης

Όπως αναφέρθηκε η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη αποτελούν δύο ενδοκρινείς ορμόνες του παγκρέατος με αντίθετες δράσης. Μέσω ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης ρυθμίζουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. (**Εικόνα 6**)

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

Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης πέσουν κάτω από 4 mmol/L, τα β-κύτταρα μειώνουν σημαντικά την έκκριση ινσουλίνης. Ταυτόχρονα τα α-κύτταρα εκκρίνουν γλυκαγόνη στο αίμα. Η γλυκαγόνη αυξάνει τα επίπεδα της γλυκόζης κυρίως μέσω της γλυκογονόλυσης και της γλυκονεογένεσης. Τα ηπατικά

κύτταρα μετατρέπουν το γλυκογόνο σε μόρια γλυκόζης τα οποία και απελευθερώνει στην κυκλοφορία του αίματος. Οι δύο αυτές ορμόνες παράγονται φυσιολογικά στον οργανισμό σε κάποια επίπεδα, τα οποία ρυθμίζονται ανάλογα με την κατανάλωση της τροφής.



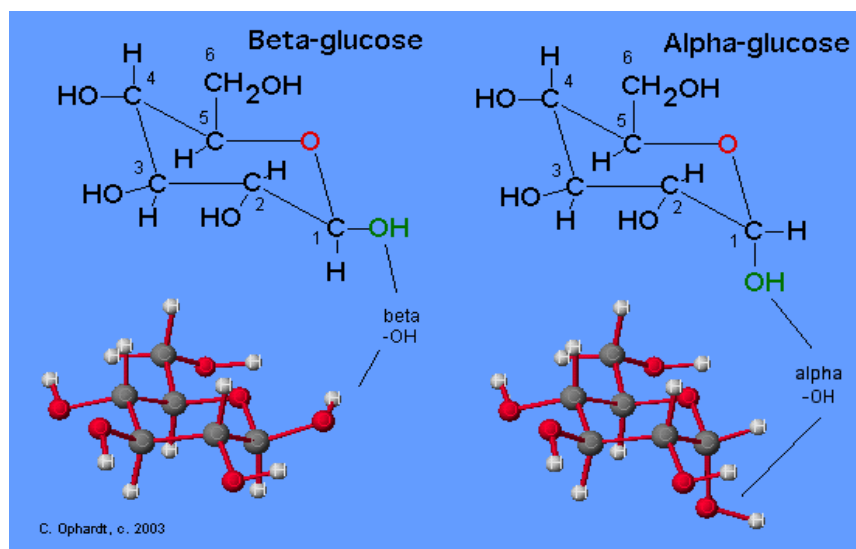
**Εικόνα 6. Μηχανισμός ανατροφοδότησης ινσουλίνης και γλυκαγόνης.** Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί στην απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Η ινσουλίνη στο ήπαρ προκαλεί τη σύνθεση γλυκογόνου με επακόλουθο τη μείωση της συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα. Η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης από το πάγκρεας και προσλαμβάνεται από το ήπαρ. Εκεί η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης. Και οι δύο ορμόνες έχουν στόχο να επαναφέρουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο φυσιολογικό. Οι δράσεις τους έχουν επίσης αντίθετα αποτελέσματα στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και των αμινοξέων.

## 2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

### 2.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι το πιο ευρέως διαδεδομένο σάκχαρο στη βιολογία. Πρόκειται για έναν μονοσακχαρίτη που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου (αλδόζη) με γενικό τύπο  $C_6H_{12}O_6$ . Συναντάται στη φύση σχεδόν πάντα σε δεξιόστροφη στερεοδιαμόρφωση γι' αυτό και συνήθως αναφέρεται

ως D-γλυκόζη ή δεξτρόζη. Η δομή της σε διάλυμα κυκλοποιείται και προκύπτει ένας εξαμελής δακτύλιος που ονομάζεται πυρανόζη, λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη<sup>[4]</sup> (**Εικόνα 7**)

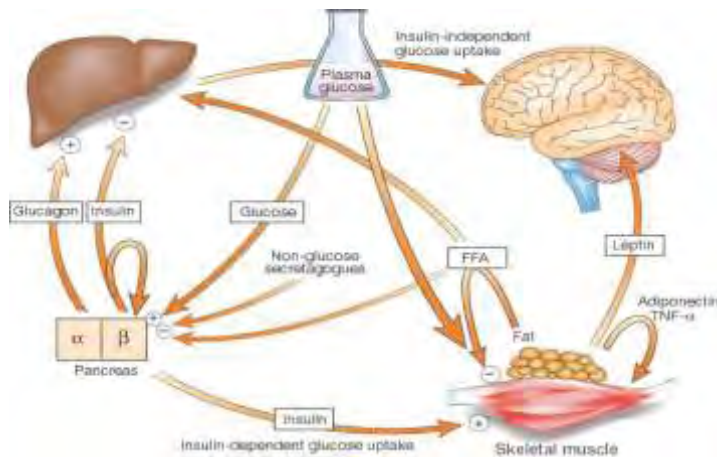


**Εικόνα 7.** Στερεοϊσομερή γλυκόζης

Χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας από τους περισσότερους οργανισμούς, από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο. Η κατανάλωση της γλυκόζης μπορεί να γίνεται με αερόβια αναπνοή, αναερόβια αναπνοή ή ζύμωση<sup>[5]</sup>. Η γλυκόζη είναι η βασική πηγή ενέργειας του ανθρώπινου σώματος, μέσω της αερόβιας αναπνοής, ενώ μέσω της γλυκόλυσης και αργότερα στις αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCAC), η γλυκόζη οξειδώνεται για να σχηματίσει τελικά διοξείδιο του άνθρακα και νερό, αποδίδοντας ενέργεια, κυρίως με τη μορφή ATP.

Στα θηλαστικά, η γλυκόζη είναι το μοναδικό καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος σε συνθήκες επάρκειας τροφής και το μοναδικό καύσιμο που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ερυθροκύτταρα σε οποιαδήποτε περίπτωση.<sup>[4]</sup> Επομένως η διαθεσιμότητα της επηρεάζει ακόμα και ψυχολογικές διεργασίες. Όταν η γλυκόζη είναι χαμηλή, οι ψυχολογικές διεργασίες που απαιτούν πνευματική προσπάθεια (π.χ. αυτοέλεγχος, λήψη αποφάσεων) είναι διαταραγμένες.<sup>[6]</sup>





**Εικόνα 8.** Ο εγκέφαλος σε αντίθεση με τους μυς δεν απαιτεί την παρουσία ινσουλίνης για να προσλάβει τη γλυκόζη.

Η γλυκόζη υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές κυρίως στα φρούτα και ειδικότερα στα ώριμα σταφύλια, όπου παράγεται μέσω του κύκλου του Calvin κατά τις φωτοσυνθέσεις, ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων (π.χ. γλυκογόνο) αλλά και από μη υδατανθρακικές ενώσεις (π.χ. γαλακτικό οξύ).

Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη, με σκοπό να διατηρηθούν τα επίπεδά της από 80-120 mg/dl. <sup>[4]</sup>

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

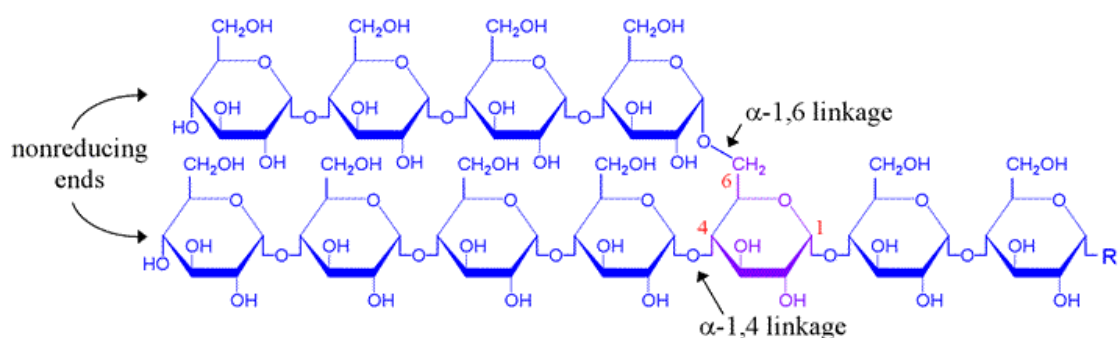
Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης. <sup>[7]</sup> (**Εικόνα 8**)

Το ήπαρ είναι η πρωταρχική πηγή γλυκόζης στο αίμα. Η ηπατική γλυκόζη παράγεται μέσω δύο οδών: τη γλυκογονόλυση ( διάσπαση του γλυκογόνου) και γλυκονεογένεση (de novo σύνθεση της γλυκόζης). Η γλυκογονόλυση μπορεί να ευθύνεται για περισσότερο από το 70% της παραγωγής ηπατικής γλυκόζης. Επιπλέον, ένα σημαντικό μέρος της γλυκόζης που σχηματίζεται από τη γλυκονεογένεση ανακυκλώνεται μέσω της δεξαμενής του γλυκογόνου πριν από την απελευθέρωση από τα κύτταρα του ήπατος<sup>[8]</sup>.

Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και τη διατηρητική κατάσταση του οργανισμού.<sup>[7]</sup>

## 2.2 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι μια άμεσα κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης στα ζωικά κύτταρα. Είναι ένα πολύ μεγάλο, διακλαδισμένο πολυμερές μορίων α-D-γλυκόζης, το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει γλυκόζη όποτε χρειάζεται ενέργεια. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4, ενώ οι διακλαδώσεις που απαντούν περίπου ανά 10 μόρια σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6. **(Εικόνα 9)**



**Εικόνα 9.** Δομή του γλυκογόνου

Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωσή του είναι υψηλότερη στο ήπαρ παρά στους μύες (10% έναντι 2% κατά βάρος), αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύες συνολικά, λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους. Το γλυκογόνο βρίσκεται στο κυτοσόλιο με τη μορφή κοκκίων με διάμετρο από 10 έως 40 nm.<sup>[4]</sup>

### 2.2.1 Ρόλος του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο είναι ένα σημαντικό απόθεμα καυσίμων μορίων για διάφορους λόγους. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι

διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς, το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Ο ρόλος αυτός του γλυκογόνου είναι ιδιαίτερα σημαντικός, διότι η γλυκόζη είναι ουσιαστικά το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιείται από τον εγκέφαλο, εκτός από την περίπτωση παρατεταμένης ασιτίας. Επιπλέον, η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Σε αντίθεση με τα λιπαρά οξέα, η απελευθερούμενη γλυκόζη μπορεί να προμηθεύει ενέργεια απουσία οξυγόνου και έτσι μπορεί να τροφοδοτεί με ενέργεια αναερόβιες δραστηριότητες. <sup>[4]</sup>

### **2.2.2 Μεταβολισμός του γλυκογόνου**

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

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

Η 6-φωσφορική γλυκόζη που προέρχεται από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου ακολουθεί 3 κατευθύνσεις. Είναι το αρχικό υπόστρωμα για τη γλυκόλυση, υφίσταται επεξεργασία με την πορεία των φωσφορικών πεντοζών προς απόδοση NADPH και παραγώγων της ριβόζης και τέλος, μετατρέπεται σε ελεύθερη γλυκόζη προς απελευθέρωση στην κυκλοφορία του αίματος. Αυτή η μετατροπή λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερη έκταση στο έντερο και τους νεφρούς.

Η σύνθεση του γλυκογόνου χρειάζεται μια ενεργοποιημένη μορφή γλυκόζης, την ουριδινιφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη), η οποία παράγεται από την αντίδραση της UTP με 1-φωσφορική γλυκόζη. Η UDP-γλυκόζη προστίθεται στο μη αναγωγικό άκρο των μορίων γλυκογόνου, όπου τα μόρια θα πρέπει να ανακατασκευαστούν για να συνεχιστεί η σύνθεση. <sup>[4]</sup>

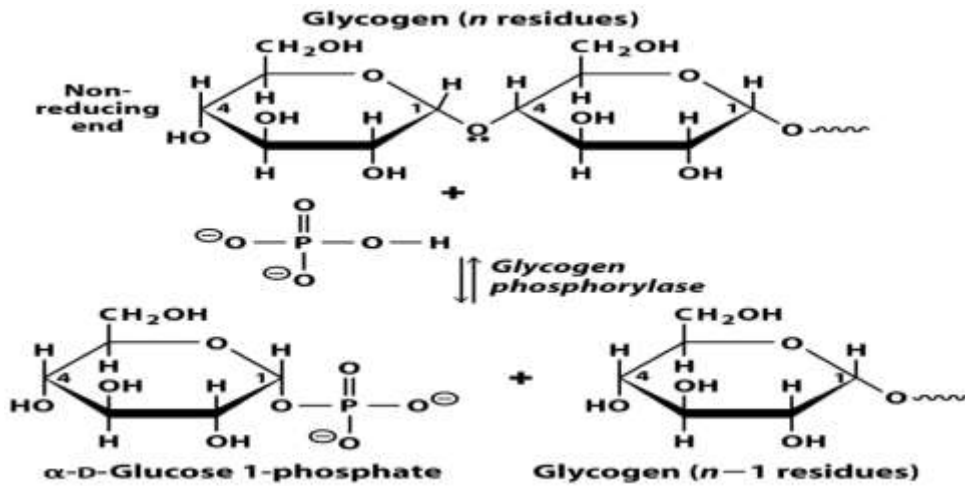
### Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

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

Το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP). Η GP διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού ιόντος αναφέρεται ως φωσφορόλυση και παρουσιάζεται στην **εικόνα 11**.<sup>[4]</sup>

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του C-1 του τελικού μορίου και του C-4 του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό Pi. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται.

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6. Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο, το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη.<sup>[4]</sup>



**Εικόνα 11.** Η GP καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου.

Η GP μπορεί να φέρει εις πέρας την πορεία αυτή από μόνη της μόνο σε περιορισμένη έκταση πριν συναντήσει ένα εμπόδιο. Οι γλυκοζιτικοί δεσμοί  $\alpha$ -1,6 στα σημεία διακλάδωσης δεν διασπώνται από την GP. Πράγματι, η GP σταματά τη διάσπαση των δεσμών  $\alpha$ -1,4 όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο διακλάδωσης.<sup>[4]</sup>

Γι' αυτό το λόγο δύο επιπλέον ένζυμα, μια μεταφοράση και μια γλυκοζιτάση δεσμού  $\alpha$ -1,6 ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο για να συνεχιστεί η αποικοδόμηση με τη φωσφορυλάση. Η μεταφοράση μετακινεί μια ομάδα τριών μορίων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη, αφήνοντας εκτεθειμένο ένα μόνο μόριο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό  $\alpha$ -1,6. Η γλυκοζιτάση δεσμού  $\alpha$ -1,6, γνωστή επίσης ως το ένζυμο αποδιακλάδωσης, υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό  $\alpha$ -1,6 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης.<sup>[4]</sup>

Έτσι τα δύο αυτά ένζυμα μετατρέπουν τη διακλαδισμένη δομή σε γραμμική, γεγονός που ανοίγει το δρόμο για περαιτέρω διάσπαση από τη φωσφορυλάση.<sup>[4]</sup>

### **2.2.3 Ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου**

Η ρύθμιση των διεργασιών αυτών είναι αρκετά πολύπλοκη. Διάφορα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στο μεταβολισμό του γλυκογόνου αποκρίνονται αλλοστερικά σε μεταβολίτες που σηματοδοτούν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Αυτές οι αλλοστερικές αποκρίσεις επιτρέπουν τη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας, ώστε να ικανοποιεί τις ανάγκες του κυττάρου στο οποίο τα ένζυμα εκφράζονται.<sup>[4]</sup>

Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται επίσης από ορμονικά διεγχειρόμενους καταρράκτες, οι οποίοι οδηγούν σε αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των ενζύμων που αλλάζει τις κινητικές τους ιδιότητες. Η ρύθμιση από ορμόνες επιτρέπει στο μεταβολισμό του γλυκογόνου να προσαρμόζεται στις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού. Και με τους δύο αυτούς μηχανισμούς, η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ενοποιείται με τη σύνθεσή του. <sup>[4]</sup>

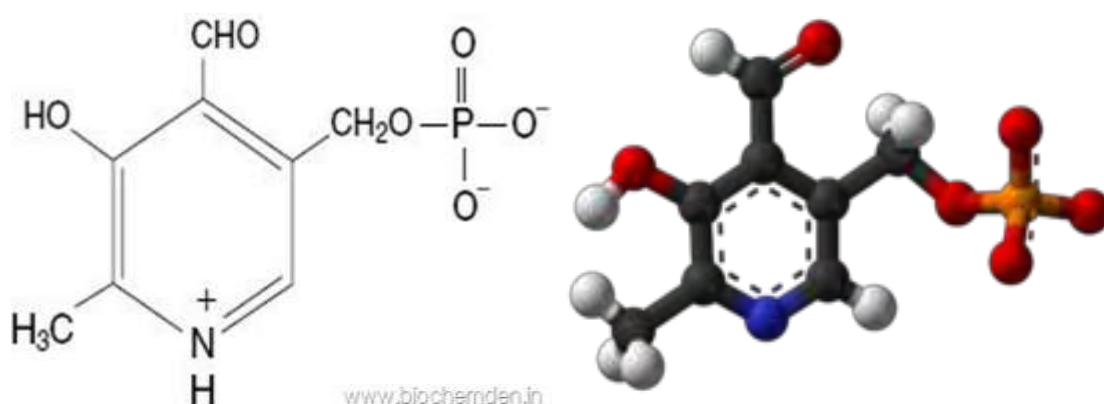
Στο ήπαρ, η σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως συνόλου. Αντίθετα στους μύς οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών μόνο. <sup>[4]</sup>

## 2.3 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP)

### 2.3.1 Τι είναι

Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) είναι ένα παράγωγο της πυριδοξίνης ή βιταμίνης B<sub>6</sub>. Πρόκειται για μια προσθετική ομάδα ορισμένων ενζύμων ή ένα συνένζυμο. Είναι η δραστική μορφή της βιταμίνης B<sub>6</sub>, η οποία αποτελείται από τρεις φυσικές οργανικές ενώσεις, πυριδοξάλη, πυριδοξίνη και την πυριδοξαμίνη (**Εικόνα 12**).

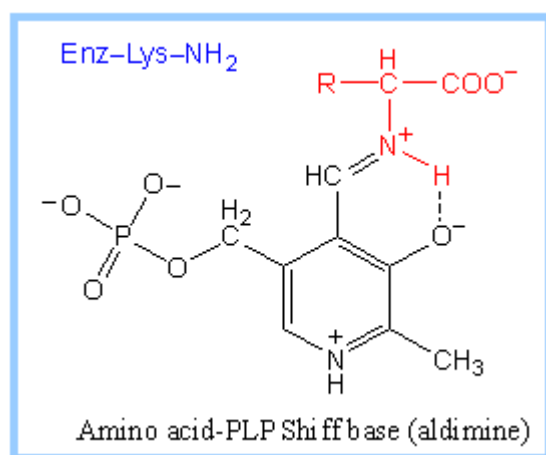
Η PLP είναι το συνένζυμο στις τρανσαμινάσες (π.χ. της ασπαραγινικής αμινοτρανσφεράσης), στις ισομεράσες ή ρακεμάσες των αμινοξέων καθώς και σε ορισμένες λυάσες. <sup>[9]</sup>



**Εικόνα 12.** Συντακτικός τύπος και τρισδιάστατη δομή της PLP.

Είναι επίσης ενεργή στην αντίδραση συμπύκνωσης κατά τη σύνθεση της αίμης. Τέλος, η PLP παίζει ρόλο στη μετατροπή της L-δοπα σε ντοπαμίνη, επιτρέπει τη μετατροπή του διεγερτικού νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό στον ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή GABA, και επιτρέπει στο SAM να αποκαρβοξυλιωθεί ώστε να σχηματιστεί προτυλαμίνη, πρόδρομο μόριο των πολυαμινών.

Η αλδεϋδική ομάδα της PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με την ε-αμινομάδα μιας συγκεκριμένης πλευρικής αλυσίδας λυσίνης στο εκάστοτε ένζυμο. <sup>[4]</sup>  
( **Εικόνα 13** )



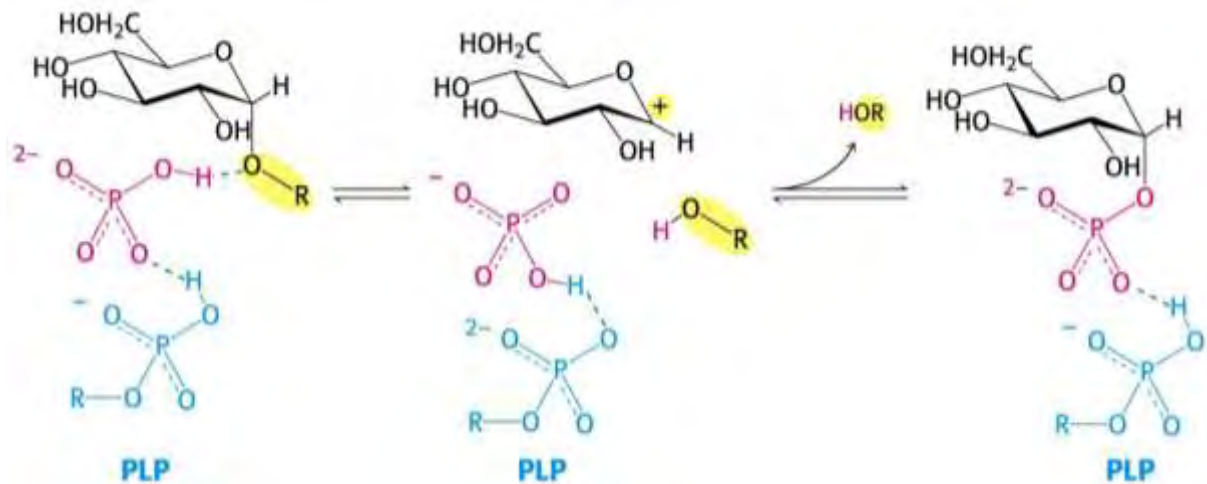
**Εικόνα 13. Δεσμός βάσης Schiff της PLP.** Η PLP σχηματίζει βάση Schiff με ένα αμινοξύ λυσίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

### 2.3.2 Η PLP συμμετέχει στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου.

Μια ιδιαίτερη πρόκληση για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά ώστε να εξοικονομήσει το ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο.

Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1 (ο χαρακτηρισμός α σημαίνει ότι το άτομο οξυγόνου που συνδέεται με τον C-1 είναι κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι

η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν. **(Εικόνα 14)**<sup>[4]</sup>



#### **Εικόνα 14: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.**

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

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι ότι χρειάζεται την παρουσία της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP). Αποτελέσματα από δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης <sup>[4]</sup>

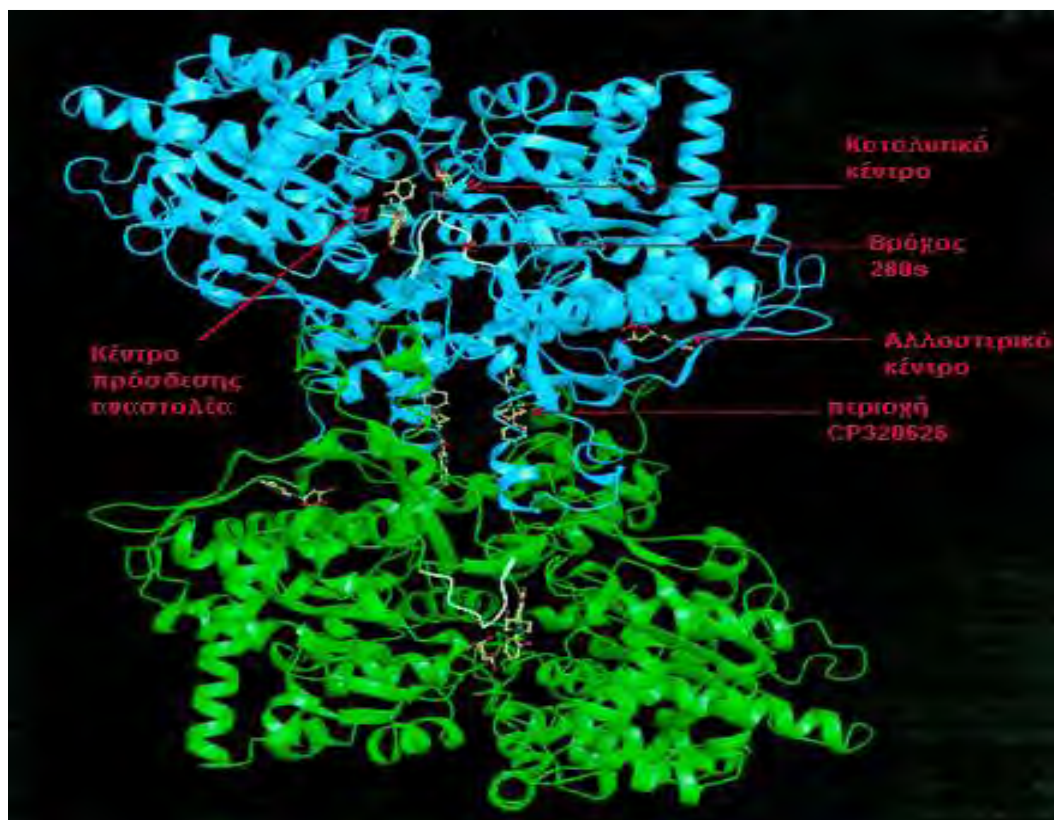


## 2.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου ( GP)

### 2.4.1 Ιστορική αναδρομή

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ήταν το πρώτο φωσφορολυτικό ένζυμο που ανακαλύφθηκε και το πρώτο παράδειγμα της ρύθμισης μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης. Στη δεκαετία του 1930, οι Carl και Gerty Cori απέδειξαν ότι υπάρχει στην α και στη β μορφή και ότι η αντίθετη αντίδραση απ' αυτήν που επιτελεί παράγει γλυκογόνο <sup>[10]</sup>. Κέρδισαν το βραβείο Νόμπελ το 1947 μαζί με τον Bernardo Housay για το έργο τους στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Αυτό ήταν και το πρώτο παράδειγμα ενός ενζύμου πολυμερισμού, εμπνέοντας και άλλους να ψάξουν για άλλα ένζυμα πολυμερισμού.

Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει αυτό το ένζυμο, τόσο για να κατανοηθεί ο μηχανισμός του, όσο και για να βρεθούν πιθανοί στόχοι φαρμάκων. Κρυσταλλικές δομές έχουν ληφθεί για την πρωτεΐνη και στις δύο μορφές, υπό την παρουσία φυσικών υποστρωμάτων, αναστολέων και αναλόγων μεταβατικής κατάστασης. (**Εικόνα 15**)



**Εικόνα 15.** Η κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

### **2.4.2 Γενικά**

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα από τα κυριότερα φωσφορολυτικά ένζυμα. Ανήκει στην τάξη των τρανσφερασών στην υπόταξη των γλυκοζυλοτρανσφερασών και στην υπο-υποτάξη των εξοζυλοτρανσφερασών σύμφωνα με την IBU και IUPAC όσον αφορά την φύση της αντίδρασης που καταλύει και έχει συστηματική ονομασία 1,4-α-D-γλυκο:φωσφορικό α-D γλυκοτρανσφεράση.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Οι τρεις ισομορφές εμφανίζουν ομολογία στην αλληλουχία σε ποσοστό 80%. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Και οι δύο αυτές ισομορφές παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την ελευθέρωση της γλυκόζης, η φωσφατάση της 6- φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση του ήπατος έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης. <sup>[4]</sup>

### **2.4.3 Γενετικός τόπος της μυϊκής GP**

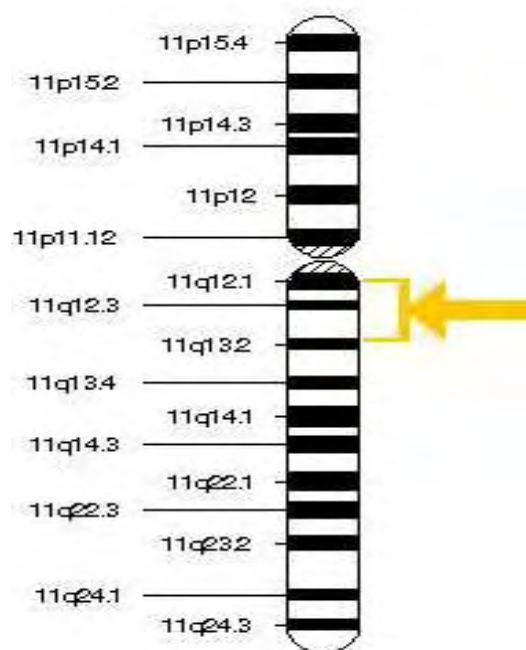
Το γονίδιο PYMG κωδικοποιεί τη μυϊκή ισομορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η οποία καταλύει και ρυθμίζει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη κατά τη γλυκογονόλυση. Αυτή η μεταβολική οδός είναι αναγκαία για την παραγωγή ATP κατά τη διάρκεια της φυσικής δραστηριότητας. Ο Gautron και η ομάδα του απομόνωσαν το 1987 cDNA κλώνους μυϊκής φωσφορυλάσης από μία ανθρώπινη cDNA βιβλιοθήκη. Πειράματα με Northernblot αποκάλυψαν ένα ειδικό mRNA μήκους 3,4 kb που βρίσκεται αποκλειστικά στους ιστούς που εκφράζουν μυϊκή φωσφορυλάση. <sup>[11]</sup>

Το 1998 η ερευνητική ομάδα του Kubisch έφτιαξαν μια αναθεωρημένη γονιδιωματική δομή για το PYMG γονίδιο, που περιέχει 20 εξόνια. Επίσης βρέθηκε ότι το ένζυμο περιλαμβάνει 842 αμινοξέα <sup>[12]</sup>.

Το PYMG βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 και στην υποπεριοχή 13.1 του βραχίονα q (11q13.1) <sup>[13]</sup>. **(Εικόνα 16)**

Πάνω από 65 μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό είχαν εντοπιστεί μέχρι το 2007 <sup>[14]</sup> και σχετίζονται με τη νόσο McArdle. Πρόκειται για μια μεταβολική

διαταραχή με συμπτώματα που περιλαμβάνουν ανικανότητα άσκησης με μυαλγία, πρόωρη κόπωση, επώδυνες κράμπες, αδυναμία άσκησης των μυών και μιοσφαιρινουρία <sup>[15]</sup>.



**Εικόνα 16.** Ο γενετικός τόπος της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

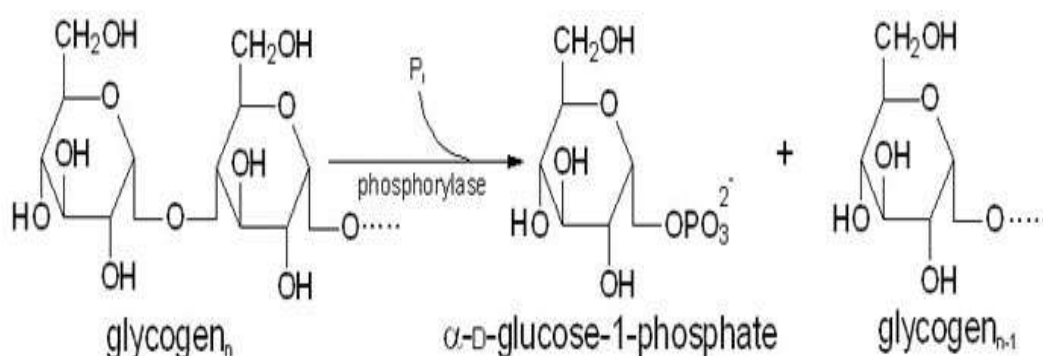
#### 2.4.4 Δομή

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες των 97 kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα.

Κάθε υπομονάδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε μια αμινο-τελική δομική περιοχή (480 αα) που περιέχει μια θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου και μια καρβοξυ-τελική δομική περιοχή (360 αα). Το καταλυτικό κέντρο εντοπίζεται σε μια βαθιά σχισμή που σχηματίζεται με κατάλοιπα από τις αμινο- και καρβοξυ- τελικές περιοχές<sup>[4]</sup>. Συνεπώς, κάθε υπομονάδα αποτελείται από χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, αλλοστερικές περιοχές και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου. **(Ενότητα 2.4.7)**

### 2.4.5 Μηχανισμός δράσης

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη η οποία λαμβάνει χώρα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (**Εικόνα 18**). Εκεί, τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H<sub>2</sub>O.



**Εικόνα 17:** Μηχανισμός δράσης της GP. Το γλυκογόνο, παρουσία P<sub>i</sub> και μέσω της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, μετατρέπεται σε 1-φωσφορική α-D-γλυκόζη και HOR (η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερη)

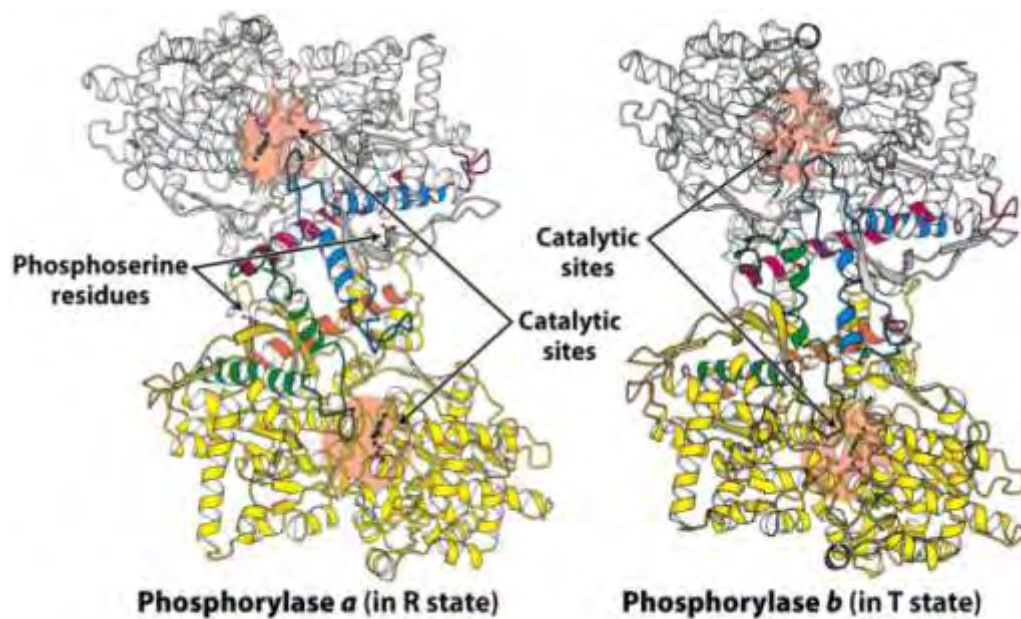
Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε-αμινομάδα της λυσίνης 680<sup>[16]</sup>. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση.

#### 2.4.6 Ρύθμιση

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ρυθμίζεται με διάφορους αλλοστερικούς τελεστές οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, όπως επίσης με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση, ως απόκριση σε ορμονικά σήματα όπως της ινσουλίνης, της γλυκαγόνης και της επινεφρίνης. Οι διαφορές στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου εστιάζονται κυρίως στους σκελετικούς μυς και το ήπαρ.

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση a και μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα<sup>[4]</sup>.

Κάθε μία από τις δύο αυτές μορφές βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T (μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Wyman και ChangeuxMWC)<sup>[17]</sup>. Η ισορροπία για τη φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση Tα (**Εικόνα 18**). Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση a) συνδέεται με μια στροφή 10 μοιρών γύρω από τον άξονα συμμετρίας δευτέρας τάξεως του διμερούς αλλά κυρίως με δομικές αλλαγές στις α- έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη<sup>[4]</sup>.



**Εικόνα 18:** Δομή της φωσφορυλάσης *a* και *b*. Η φωσφορυλάση *a* φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο Ser14 κάθε υπομονάδας. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη δομή της περισσότερο ενεργής R διαμόρφωσης. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν είναι φωσφορυλιωμένη και υπάρχει κυρίως στην T διαμόρφωση.

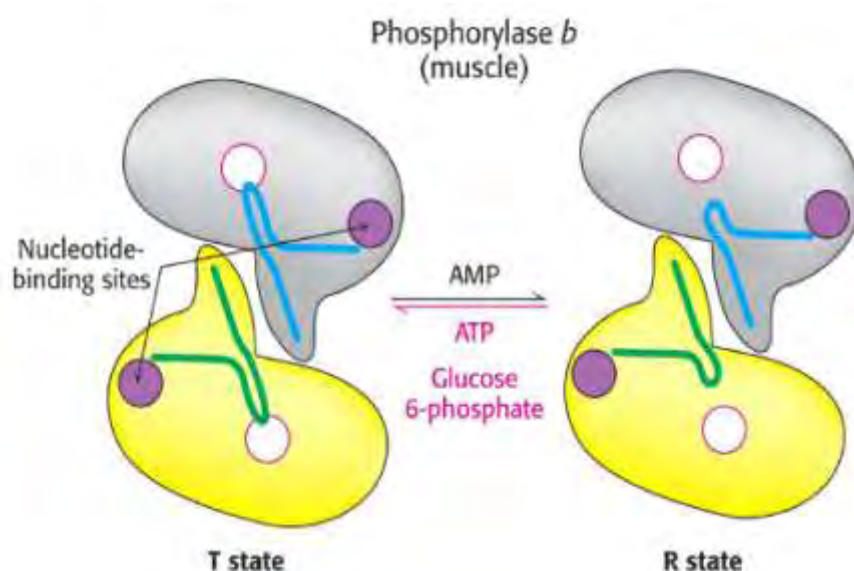
Η φωσφορυλάση *b* μετατρέπεται στη φωσφορυλάση *a* όταν φωσφορυλιώνεται στη Ser14 σε κάθε υπομονάδα. Το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική αυτή τροποποίηση. Τα αυξημένα επίπεδα επινεφρίνης (μέσω του καταρράκτη της κυκλικής AMP και της PKA, ) και η ηλεκτρική διέγερση των μυών ( όπου εμπλέκονται τα ιόντα  $Ca^{2+}$ ) έχουν ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του ενζύμου στη μορφή *a*. Από την άλλη μια πρωτεϊνική φωσφατάση, η PP1 υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό στη φωσφορυλιωμένη GP*a*, η οποία με τη σειρά της μεταπίπτει στην GP*b*. Να σημειωθεί ότι η ινσουλίνη μπορεί να ενεργοποιήσει την PP1, διεγείροντας τη σύνθεση του γλυκογόνου<sup>[4]</sup>.

Η μυϊκή φωσφορυλάση *b* είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης *b* στην κατάσταση R. Το ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης *b*

από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Η 6-φωσφορική γλυκόζη ευνοεί επίσης την κατάσταση T της GPb, που αποτελεί ένα παράδειγμα αναστολής από επανατροφοδότηση<sup>[4]</sup>

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP, του ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. **(Εικόνα 19)**

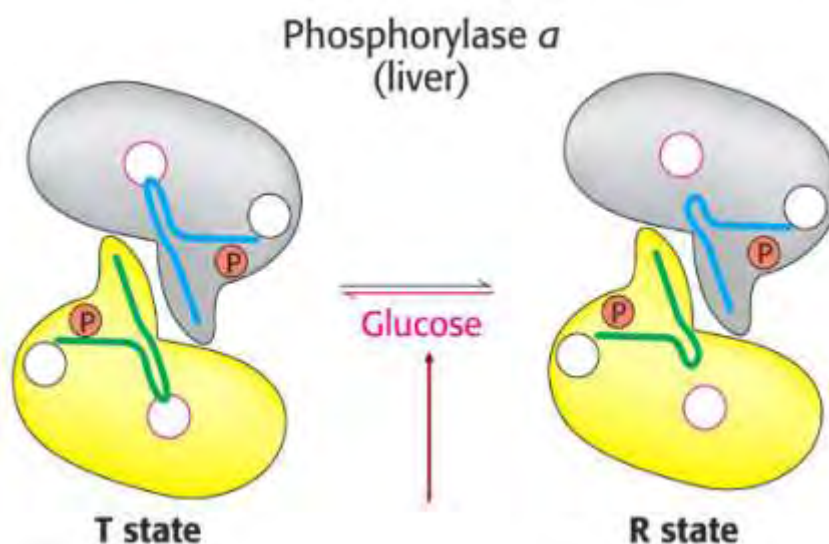
Στους μύς που βρίσκονται σε ηρεμία, σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή b. Όταν αρχίζει η άσκηση, το αυξημένο επίπεδο της AMP οδηγεί στην ενεργοποίηση της GPb. Η άσκηση επίσης έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ορμόνης που προκαλεί τη δημιουργία της φωσφορυλιωμένης μορφής a. Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μύς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια<sup>[4]</sup>.



**Εικόνα 19:** Αλλοστερική ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης b. Ένα χαμηλό ενεργειακό φορτίο που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP, ευνοεί την μετάβαση στη μορφή R

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιοστάση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. Πρέπει να σημειωθεί ότι στον άνθρωπο, η ηπατική και η μυϊκή GP είναι περίπου κατά 90% παρόμοιες στην αλληλουχία αμινοξέων<sup>[4]</sup>.

Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση  $\alpha$ , αλλά όχι η  $\beta$  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  $\alpha$  από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο (**Εικόνα 20**). Αυτή η αναστολή μέσω της γλυκόζης εξηγείται, μιας και ο ρόλος της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι η παραγωγή γλυκόζης για εξαγωγή σε άλλους ιστούς, όταν το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλό. Συνεπώς, όταν η ελεύθερη γλυκόζη προέρχεται από άλλες πηγές, όπως η διατροφή, δεν υπάρχει ανάγκη κινητοποίησης του ενζύμου. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο, όπως συμβαίνει σε ένα συσπώμενο μυ<sup>[4]</sup>.



**Εικόνα 20:** Αλλοστερική ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης. Η πρόσδεση της γλυκόζης στη φωσφορυλάση  $\alpha$  μετατοπίζει την ισορροπία προς την κατάσταση T και απενεργοποιεί το ένζυμο. Έτσι το γλυκογόνο δεν κινητοποιείται όταν η γλυκόζη είναι ήδη σε αφθονία

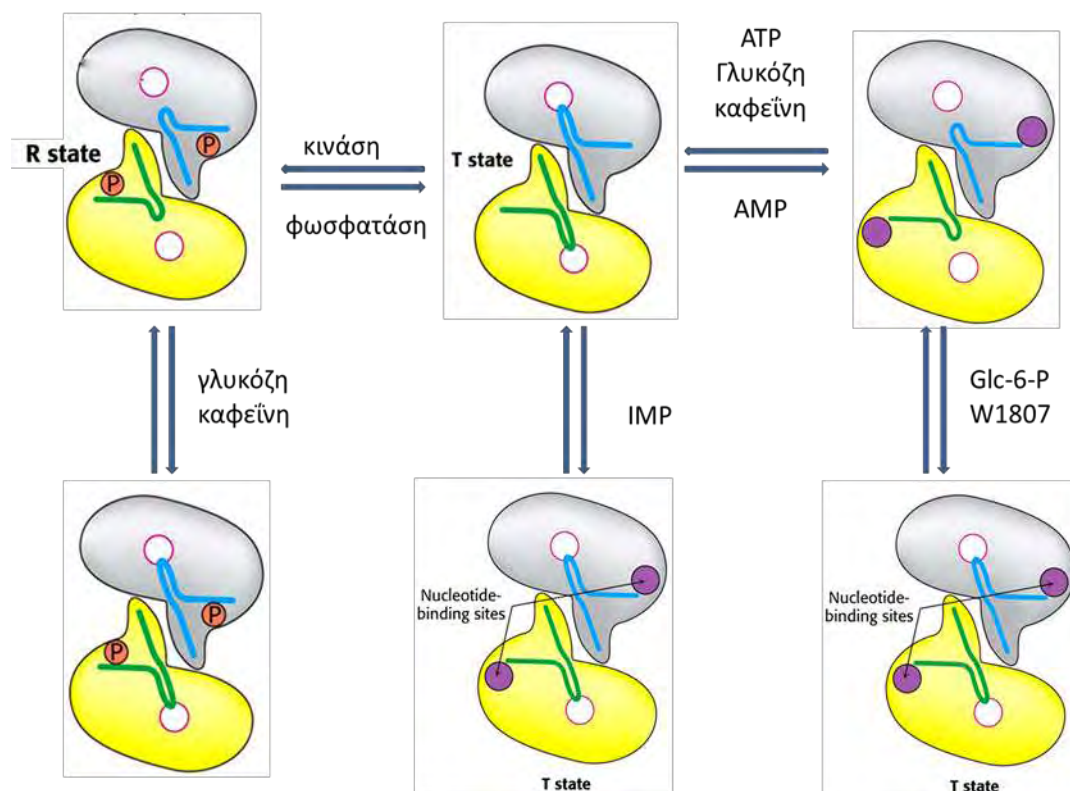
Η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο. Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί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



μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την T διαμόρφωση.

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

Η ανενεργός μορφή της φωσφορυλάσης b μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες μπορούν in vitro να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$ . Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P. **(Εικόνα 21).**



**Εικόνα 21.** Ρύθμιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από αλλοστερικούς τελεστές.

#### **2.4.7 Κρυσταλλική δομή και κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου**

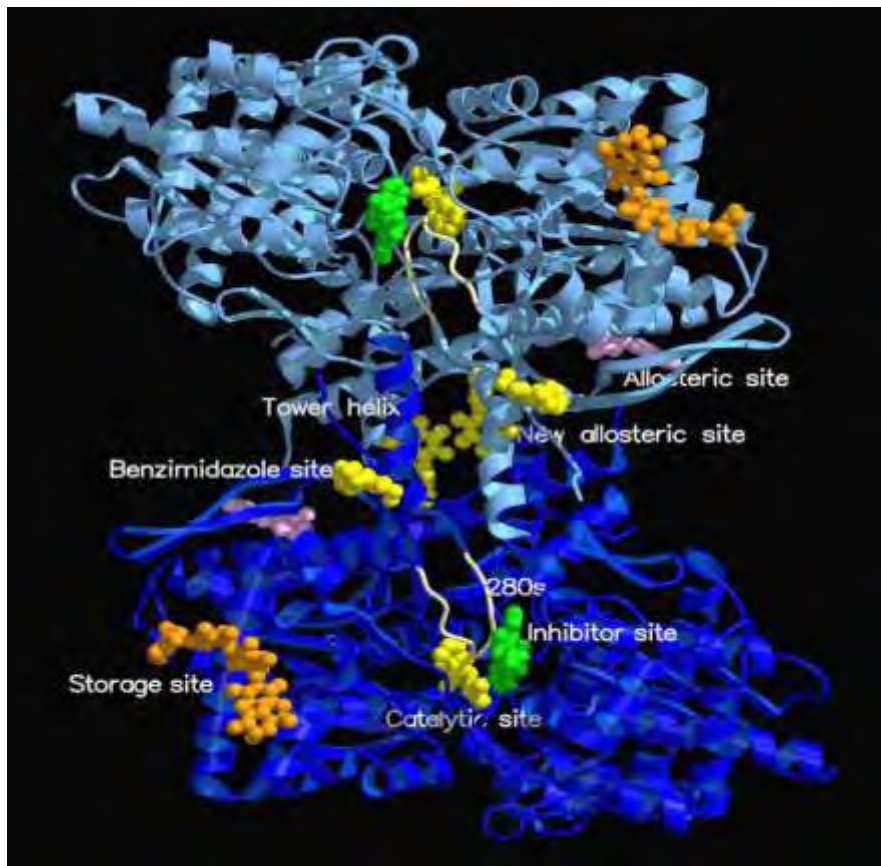
Οι κρυσταλλικές δομές της GP<sub>a</sub> και της GP<sub>b</sub> (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν το 1989 από τους Barford και Johnson. Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά νερού (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. 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 [18].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου περιέχει διάφορα κέντρα σύνδεσης:  
**(Εικόνα 22)**

- Το καταλυτικό κέντρο.

Η καταλυτική περιοχή είναι θαμμένη στο κέντρο του μονομερούς, όπου οι επικράτειες 1 (κατάλοιπα 1 έως 484) και 2 (κατάλοιπα 485 - 842) έρχονται μαζί, αποκτώντας πρόσβαση στον περιβάλλοντα διαλύτη μέσω ενός καναλιού μήκους 15 Å. Η περιοχή έχει ερευνηθεί εκτενώς με αναστολείς-ανάλογα γλυκόζης τα οποία συνδέονται σε αυτήν και προωθούν τη λιγότερο ενεργή κατάσταση T μέσω σταθεροποίησης της κλειστής θέσης του βρόχου 280s (κατάλοιπα 282-287), μεταξύ των ελικών 7α (κατάλοιπα 261-274) και 8α (κατάλοιπα 289-314), και εμποδίζουν την πρόσβαση του υποστρώματος (γλυκογόνου) στην καταλυτική περιοχή. Η θέση αυτή εμποδίζει τις σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά την ενεργοποίηση του ενζύμου και είναι κρίσιμες για την καταλυτική δραστηριότητα και δημιουργούν την περιοχή αναγνώρισης φωσφορικού<sup>[19]</sup>.

Στη μετάβαση από την κατάσταση T στην κατάσταση R (ενεργοποίηση του ενζύμου), ο βρόχος 280s διαταράσσεται και εκτοπίζεται, ανοίγοντας ένα κανάλι που επιτρέπει σε ένα κρίσιμο αμινοξύ, την Arg569 να εισέλθει στην καταλυτική θέση, στη θέση του Asp283 και να δημιουργήσει τη θέση αναγνώρισης για το φωσφορικό υπόστρωμα. Αυτό επίσης επιτρέπει την πρόσβαση του υποστρώματος γλυκογόνου στην καταλυτική περιοχή και παρέχει ένα ευνοϊκό ηλεκτροστατικό περιβάλλον για την 5'-φωσφορική ομάδα του βασικού συμπαραγόντα PLP<sup>[18,20,21,22]</sup>.



**Εικόνα 22:** Κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

- Το αλλοστερικό κέντρο

Το αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στο σημείο όπου τα C τελικά άκρα των ελικών α2 (κατάλοιπα 47-78) και α8 (κατάλοιπα 289-314) πλησιάζουν, σχηματίζοντας ένα σχήμα V. Η αλλοστερική περιοχή, η οποία δεσμεύει τον κλασσικό αλλοστερικό ενεργοποιητή AMP και τον αλλοστερικό αναστολέα Glc-6-P, έχει δειχθεί ότι δεσμεύει την ένωση Bayer W1807, και αρκετά ανάλογα δεοξυδιυδροπυριδίνης [23,24,25].

Ο μηχανισμός της πρόσδεσης του W1807 στην GPα είναι ένα σαφές παράδειγμα επαγόμενης προσαρμογής. Το W1807 δρα ως ένας αλλοστερικός αναστολέας μέσω σύνδεσης σε μία μακρινή θέση από την καταλυτική θέση. Μία από τις πιο σημαντικές διαφορές μεταξύ της T- GPα και της T-GPα συνδεδεμένης με W1807 έγκειται στο ότι η N-τελική ουρά, η οποία φέρει την Ser14-P, δεν μπορεί να βρίσκεται εκτός του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας του δομικού συμπλέγματος W1807 και είναι θεωρείται ότι υποβάλλεται σε μια διαμορφωτική μετατόπιση. Κατά τη διαδικασία της

ενεργοποίησης από φωσφορυλίωση τα N-τελικά αμινοξέα μετατοπίζονται με μια αλλαγή στη διαμόρφωση από κινητά σε διατεταγμένα, η οποία συνοδεύεται από μεταβολές στην τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή που οδηγούν σε ενεργοποίηση της καταλυτικής περιοχής, 45 Å μακριά από την περιοχή Ser14-P<sup>[19, 26]</sup>.

Επίσης αναγνωρίζει μια ποικιλία φωσφορυλιωμένων ενώσεων όπως το IMP (ασθενής ενεργοποιητής), το ATP, το NADH, την UDP-γλυκόζη, την 2-δεοξυ-γλυκόζη-6-P, το b-γλυκεροφωσφορικό, και ανόργανο φωσφορικό<sup>[19]</sup>.

Οι διαφορετικοί τρόποι πρόσδεσης του AMP (ή ATP) και της γλυκόζης- 6-P (ή 2-δεοξυ-γλυκόζης-6-P) και οι διάφορες επαφές που έγιναν με το ένζυμο σε σύγκριση με το W1807 δείχνουν ένα αξιοσημείωτο βαθμό πλαστικότητας της αλλοστερικής περιοχής. Αυτό δηλώνει έναν αξιοσημείωτο βαθμό μεταβλητότητας για μία θέση δεσμεύσης, η οποία είναι σε θέση να αναγνωρίζει ειδικά ανόμοιες ενώσεις χρησιμοποιώντας τα ίδια αμινοξέα.

Η κατανόηση αυτής της πρωτεϊνικής διαμορφωτικής ελαστικότητας θα είναι σημαντική για το σχεδιασμό και τη βελτιστοποίηση των αναστολέων<sup>[8]</sup>.

- Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής (ή νουκλεοζιτών) είναι ένας υδρόφοβος θύλακας σύνδεσης, που βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, κοντά στη διεπαφή επικράτειας, στην είσοδο προς την καταλυτική θέση (περίπου 12 Å από αυτήν), και περιλαμβάνει αμινοξέα από τις επικράτειες 1 (υπολείμματα 13 - 484) και 2 (κατάλοιπα 485 έως 842).

Στην κατάσταση T, η περιοχή εμποδίζει την είσοδο στη σήραγγα της καταλυτικής θέσης. Η δέσμευση σε αυτό το κέντρο παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία. Πουρίνες (π.χ. αδεΐνη και η καφεΐνη), νουκλεοζίτες (π.χ. αδενοσίνη και ινσοσίνη), νουκλεοτίδια (π.χ. AMP, IMP και ATP), το NADH και ορισμένες συναφείς ετεροκυκλικές ενώσεις όπως το FMN (φλαβινομονο-νουκλεοτίδιο), FAD (φλαβινο-αδενινοδινουκλεοτίδιο), και η ριβοφλαβίνη έχει δείχθει ότι συνδέονται στη θέση αυτή στη μυϊκή GPb και GPα, αλλά η ηπατική GPα δείχνει μια αυστηρότερη εκλεκτικότητα για αναστολείς<sup>[27,28]</sup>.

Στην κατάσταση T, η Phe285, από τον βρόχο 280S, στοιβάζεται κοντά στην Tyr613, από την έναρξη της α19 έλικας (αμινοξέα 613 έως 631) και μαζί αυτά τα δύο υδρόφοβα αρωματικά αμινοξέα σχηματίζουν τη θέση αναστολής.

Η πρόσδεση αυτής της θέσης σταθεροποιεί την T διαμόρφωση του ενζύμου και εμποδίζει την πρόσβαση στην καταλυτική θέση, προκαλώντας έτσι την

αναστολή του ενζύμου. Η γλυκόζη μπορεί να δεσμεύσει ταυτόχρονα την καταλυτική θέση, και να αναστείλλει τη δράση του ενζύμου σε συνέργεια με την καφεΐνη<sup>[29]</sup>.

- Το κέντρο αποθήκευσης

Η θέση αποθήκευσης γλυκογόνου, η οποία θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως περιοχή μέσω της οποίας το ένζυμο των θηλαστικών συνδέεται προς με τα συσσωματώματα γλυκογόνου in vivo, βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου, περίπου 30 Å από την καταλυτική περιοχή. Η θέση ταυτοποιήθηκε από κρυσταλλογραφικές μελέτες σύνδεσης με μαλτοπεντόζη (G5) και μαλτοεπτόζη (G7)<sup>[30,31]</sup>.

Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε μια σχισμή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας. Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί και ως κέντρο ρύθμισης, μιας και η κατάληψη του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης<sup>[19]</sup>.

- Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Η νέα αλλοστερική θέση ή θέση πρόσδεσης ινδολίου, βρίσκεται μέσα στην κεντρική κοιλότητα, και σχηματίζεται από τη σύνδεση των δύο υπομονάδων<sup>[8]</sup>. Δεσμεύει ανάλογα ινδολο-2-καρβοξαμιδίου, N-βενζοϋλ-N'-β-D γλυκοπυρανοζυλο ουρία και βενζιμιδαζόλη. Η νέα θέση δέσμευσης με δεσμευμένη βενζιμιδαζόλη, που επίσης βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου, βρίσκεται περίπου 31Å από την καταλυτική, 32 Å από την αλλοστερική, και 32 Å από τη θέση πρόσδεσης ινδολίου.

- Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14

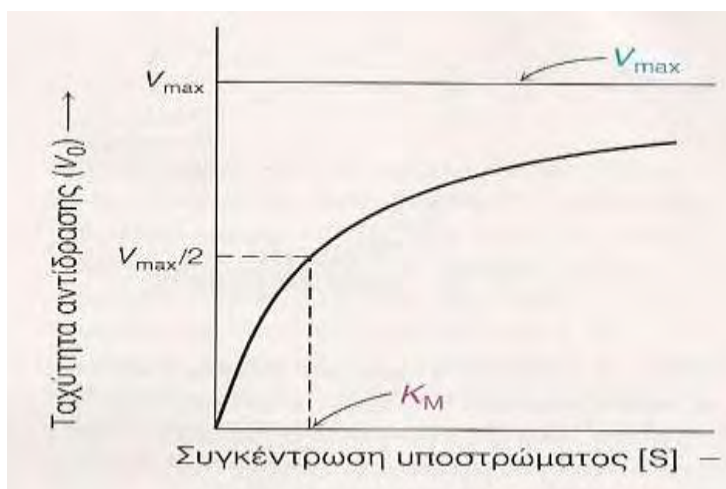
Το κέντρο αυτό είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή a στη μορφή b. Εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων. Κεντρικό ρόλο έχει η Ser 14, η οποία φωσφορυλιώνεται και οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-

τελικό άκρο του ενζύμου. Στην GPb, αυτά τα αμινοξέα είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στη GPa έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με αλλά αμινοξέα και των 2 υπομονάδων.<sup>[4]</sup>

## 2.5 Κινητική ενζύμων και ενζυμική αναστολή

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

Η πρωταρχική λειτουργία των ενζύμων είναι να αυξάνουν τις ταχύτητες των αντιδράσεων έτσι ώστε να είναι συμβατές με τις ανάγκες του οργανισμού. Για πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης  $V_0$ , η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο, μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, [S], με τον τρόπο που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 23**. Η ταχύτητα της κατάλυσης αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος και στη συνέχεια αρχίζει να σταθεροποιείται και να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος.<sup>[4]</sup>



**Εικόνα 23: Κινητική Michaelis-Menten.** Ένα διάγραμμα της ταχύτητας ( $V_0$ ) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος [S], για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα ( $V_{max}$ ) προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά Michaelis ( $K_m$ ) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με  $V_{max}/2$ .

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



Ένα ένζυμο E αντιδρά με το υπόστρωμα S για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο ES με μια κινητική σταθερά  $k_1$ . Το σύμπλοκο ES μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους. Μπορεί να διασπαστεί σε E και S με μια κινητική σταθερά  $k_{-1}$ , ή να σχηματίσει προϊόν P με μια κινητική σταθερά  $k_2$ .

Από το παραπάνω μοντέλο προκύπτει η σταθερά Michaelis- Menten ( $K_m$ ) που ορίζεται ως:

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

Η σταθερά Michaelis-Menten εκφράζεται σε μονάδες συγκέντρωσης και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις των S και E. Αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης.<sup>[4]</sup>

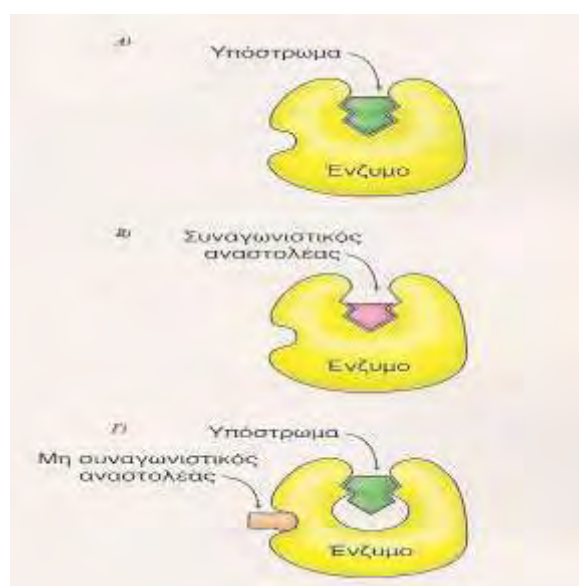
Θα μπορούσαμε να πούμε επίσης ότι η  $K_m$  είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα του ενζύμου έχουν καταληφθεί. Για να την προσδιορίσουμε πειραματικά είναι απαραίτητο να μελετήσουμε κινητικά το ένζυμο σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος. Η  $K_m$  για ένα ένζυμο εξαρτάται από το συγκεκριμένο υπόστρωμα καθώς επίσης και από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς.

Ωστόσο, η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Αυτός ο τρόπος αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας παίζει τον ρόλο του κύριου μηχανισμού ελέγχου στα βιολογικά συστήματα. Η αναστολή από ειδικές χημικές ουσίες μπορεί να είναι πηγή για την κατανόηση του μηχανισμού της ενζυμικής δράσης : αμινοξέα κρίσιμα για την κατάλυση μπορούν συχνά να προσδιοριστούν με τη

χρησιμοποίηση ειδικών αναστολέων. Επιπλέον, πολλά φάρμακα και τοξικοί παράγοντες δρουν μέσω της αναστολής ενζύμων.

Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας (π.χ. πενικιλίνη) διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Σε αντίθεση, η αντιστρεπτή αναστολή χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.<sup>[4]</sup>

Δύο είναι τα κυριότερα είδη αντιστρεπτής αναστολής: η συναγωνιστική και η μη συναγωνιστική αναστολή. **(Εικόνα 24)**

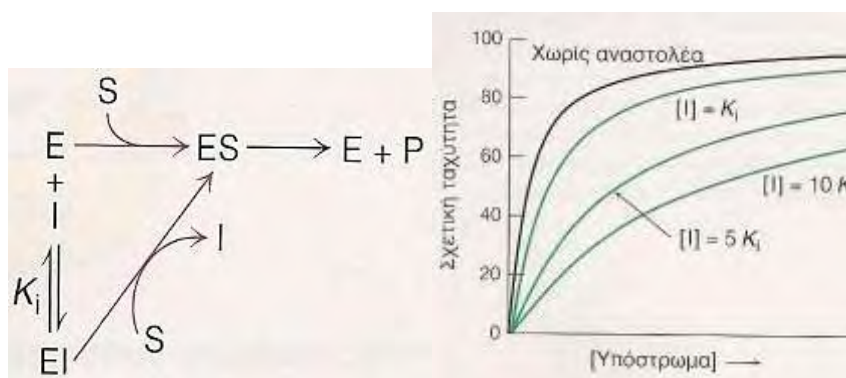


**Εικόνα 24:** Διάκριση μεταξύ ενός συναγωνιστικού και ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα. Α) Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος απουσία αναστολέα. Β) Συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το υπόστρωμα δεν συνδέεται. Γ) Μη συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται σε σημείο διαφορετικό με το ενεργό κέντρο. Το υπόστρωμα συνεχίζει να συνδέεται, αλλά το ένζυμο δεν καταλύει την αντίδραση λόγω της παρουσίας του αναστολέα.

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

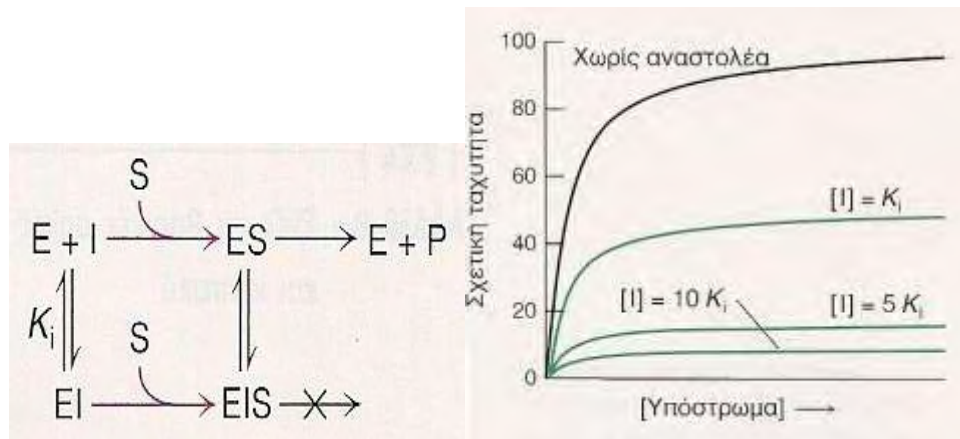


αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.<sup>[4]</sup> **(Εικόνα 25)**



**Εικόνα 25:** Κινητική ενός συναγωνιστικού αναστολέα. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα, απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος για να επιτευχθεί μια ιδιαίτερη ενζυμική ταχύτητα. Η πορεία της αντίδρασης υποδηλώνει πόσο υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να υπερνικηθεί η συναγωνιστική αναστολή.

Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδεθούν ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου (ESI) σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης, όπως παρατηρείται στην εικόνα 21. Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Συνεπώς, η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. **(Εικόνα 26)** Σε μια πιο περίπλοκη κατάσταση (μεικτή αναστολή), ένας αναστολέας επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου.<sup>[4]</sup>



**Εικόνα 26:** Κινητική ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα. Η πορεία της αντίδρασης δείχνει ότι ο αναστολέας προσδένεται και στο ελεύθερο ένζυμο και στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Συνεπώς, η ταχύτητα δεν μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή  $V_{max}$ , ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος.

## 2.6 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Καθώς η GP είναι το καθοριστικό ρυθμιστικό ένζυμο διάσπασης του γλυκογόνου <sup>[32,33]</sup>, η φαρμακολογική αναστολή του έχει θεωρηθεί ως μία αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση για τη θεραπεία ασθενειών που προκαλούνται από ανωμαλίες στο μεταβολισμό του γλυκογόνου, όπως ο διαβήτης τύπου 2 <sup>[8, 34,35]</sup>, η ισχαιμία του μυοκαρδίου <sup>[36]</sup>, η εγκεφαλική ισχαιμία <sup>[37]</sup> και όγκοι <sup>[38,39]</sup>.

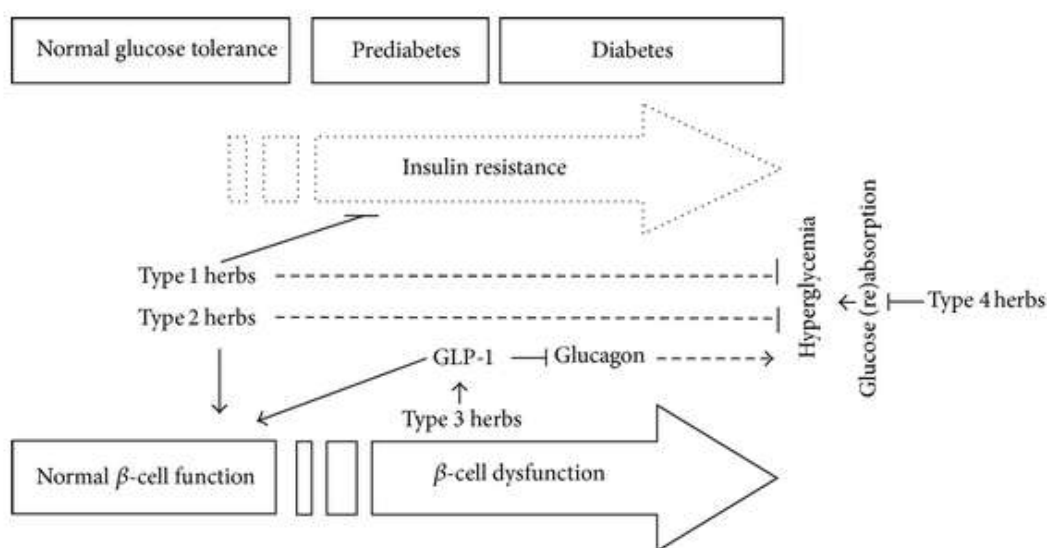
Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου, η GP χρησιμοποιείται σαν στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας <sup>[22]</sup>.

## 2.7 Φυσικά εκχυλίσματα ως πιθανές υπογλυκαιμικές ενώσεις

### 2.7.1 Γενικά

Η φύση είναι μια εξαιρετική πηγή αντιδιαβητικών φαρμάκων. Μέχρι σήμερα, περισσότερα από 1200 ανθοφόρα φυτά έχει αναφερθεί ότι έχουν αντιδιαβητικές ιδιότητες. Μεταξύ αυτών, το ένα τρίτο έχουν μελετηθεί επιστημονικά και τεκμηριωθεί σε περίπου 460 δημοσιεύσεις<sup>[40]</sup>.

Διάφορα φαρμακευτικά φυτικά εκχυλίσματα που μειώνουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν μία ή περισσότερες από τις οδούς που ελέγχουν τη λειτουργία της αντίστασης στην ινσουλίνη, τη λειτουργία των παγκρεατικών κυττάρων, και την απορρόφηση της γλυκόζης.<sup>[40]</sup> **(Εικόνα 27)**



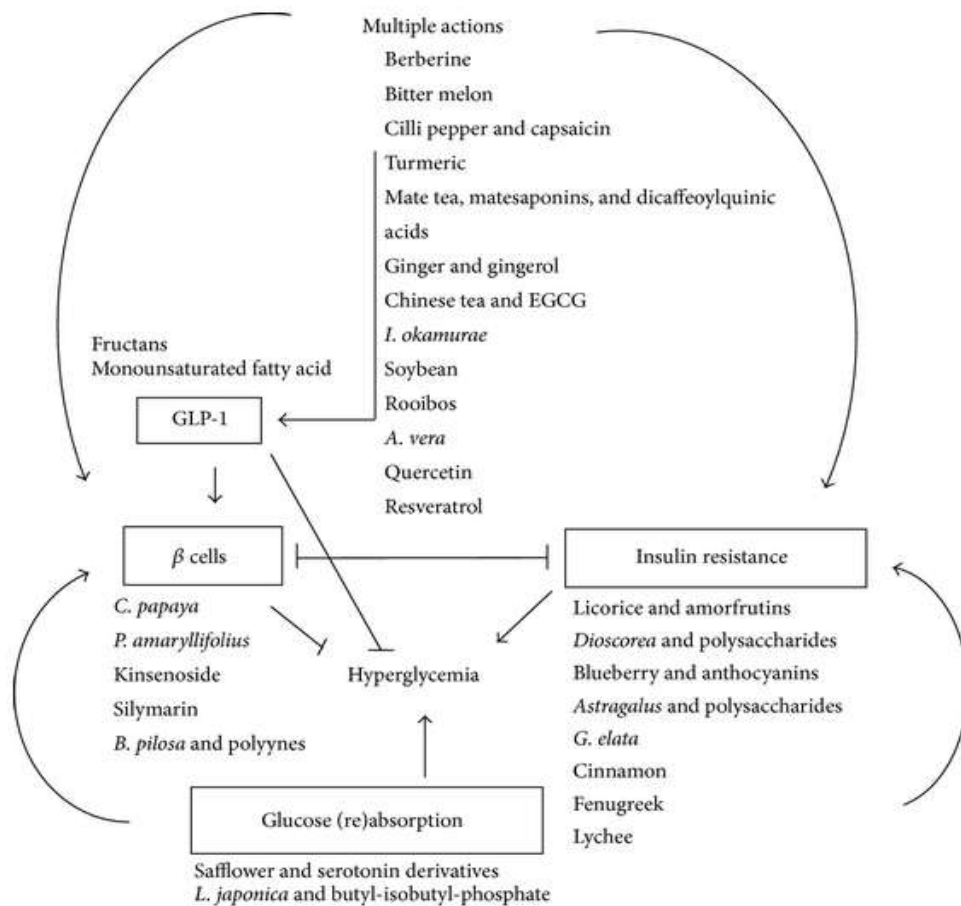
**Εικόνα 27. α) Μηχανισμοί δράσης φυτικών θεραπειών με χρήση αντιδιαβητικών φυτών και φυτο-ενώσεων:** Διαφορετικοί τύποι φαρμακευτικών εκχυλισμάτων μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τους τρόπους δράσης, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη (τύπου 1), η λειτουργία των  $\beta$ -κυττάρων (τύπου 2), και GLP-1 (τύπου 3) και (επαν)απορρόφηση (τύπου 4).

Η χημική δομή, η αντιδιαβητική δράση και η δράση σε κύτταρα, ζωικά μοντέλα, και τα αποτελέσματα της χορήγησης των φυτικών εκχυλισμάτων και ενώσεων σε ασθενείς με T2DM έχουν καταγραφεί<sup>[40]</sup>.

Με βάση ένα μεγάλο αριθμό χημικών και φαρμακολογικών ερευνητικών εργασιών, πολλές βιοδραστικές ενώσεις έχουν βρεθεί σε φαρμακευτικά φυτά για το διαβήτη <sup>[41-44]</sup>. Αυτές οι ενώσεις περιλαμβάνουν <sup>[45]</sup> :

- **Τερπενοειδή.**<sup>[45]</sup>
  - A) Τριτερπένια**
  - B) Διτερπένια και σεσκιτερπένια**
  - Γ) Μονοτερπένια**
- **Πολυσακχαρίτες**<sup>[45]</sup>
- **Φλαβονοειδή**<sup>[45]</sup>
- **Ενώσεις όμοιες με ινσουλίνη, αμινοξέα, πολυπεπτίδια**<sup>[45]</sup>
- **Αλκαλοειδή.**<sup>[45]</sup>
- **Στερόλες**<sup>[45]</sup>
- **Ακόρεστα λιπαρά οξέα**<sup>[45]</sup>

Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζονται παρακάτω:



**Εικόνα 27. β)** Τα επιλεγμένα φυτά και οι ενώσεις ασκούν την αντιυπεργλυκαιμική τους δράση μέσω στόχευσης ενός συγκεκριμένου μηχανισμού

### 2.7.2 Εκχυλίσματα ροδιού

Η ροδιά είναι φυτό του γένους *Punica* της οικογένειας *Punicaceae* (**Εικόνα 28**). Ανήκει στην τάξη των μυρτωδών (*Myrtales*). Θεωρείται ευρέως ότι προέρχεται από το Ιράν και έχει καλλιεργηθεί από τους αρχαίους χρόνους<sup>[46]</sup>. Σήμερα, καλλιεργείται ευρέως σε όλη την περιοχή της νότιας Ευρώπης που βρέχεται απ' τη Μεσόγειο, στη Μέση Ανατολή, στον Καύκασο, στη Βόρεια Αφρική και στην τροπική Αφρική, στην Ινδία, στην Κεντρική Ασία και τα ξηρότερα μέρη της νοτιοανατολικής Ασίας<sup>[47]</sup>.

Τα ρόδια χρησιμοποιούνται στο μαγείρεμα, στην παραγωγή σιροπιών, χυμών, και αλκοολούχων ποτών, όπως το κρασί, καθώς και για καλωπιστικούς λόγους. Ο χυμός του ροδιού αντιπροσωπεύει τα τρία τέταρτα του βάρους του.

Στην Ινδία σύμφωνα με το ιατρικό σύστημα Αγιουρβέδα , το ρόδι έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως πηγή παραδοσιακών θεραπειών <sup>[48]</sup>. Οι σπόροι και ο χυμός θεωρούνται τονωτικά για την καρδιά και το λαιμό, ενώ θεωρείται ως μία υγιεινή αντιστάθμιση σε μια διατροφή πλούσια σε λίπη και ζάχαρη <sup>[49]</sup>.

Ιδιαίτερα τα γλυκά ρόδια θεωρούνται ως “οικοδόμοι του αίματος”. Οι στυπτικές ιδιότητες του χυμού από λουλούδια, της φλούδας και του φλοιού των δέντρων θεωρούνται πολύτιμες για διάφορους σκοπούς, όπως η διακοπή αιμορραγίας από τη μύτη και τα ούλα, η τόνωση της επιδερμίδας και η θεραπεία των αιμορροϊδων <sup>[50]</sup>, καθώς και η επιβράδυνση του καταρράκτη <sup>[51]</sup>.



**Εικόνα 28.** Καρπός του *Punica granatum*

Οι σπόροι ροδιού παρέχουν το 12% της Ημερήσιας Αξίας για τη βιταμίνη C και το 16% της DV για τη βιταμίνη K ανά 100 gr μερίδας, και περιέχουν πολυφαινόλες, όπως οι ελλαγιταννίνες και φλαβονοειδή <sup>[52]</sup>.

Οι πιο άφθονες πολυφαινόλες σε χυμό ροδιού είναι οι υδρολυόμενες τανίνες που ονομάζονται ελλαγιταννίνες και σχηματίζονται όταν το ελλαγικό οξύ συνδέεται με υδατάνθρακες. Οι πουνικαλαγίνες απορροφώνται από το ανθρώπινο σώμα και μπορεί να έχουν διαιτητική αξία ως αντιοξειδωτικά <sup>[53]</sup>. Οι διάφορες πουνικαλαγίνες που είναι παρούσες στο *P. granatum* είναι : η granatin A και B, η punicacortein A, B, C και D, η 5-O-galloylpunicacortein, η punicafolin, η runigluconin, πουνικαλαγίνη, η 1-α-O-galloylpunicalagin, η πουνικαλίνη και η 2-O-γαλλοϋλο-πουνικαλίνη. Άλλες φαινόλες περιλαμβάνουν τις κατεχίνες, τις γαλλοκατεχίνες, και τις ανθοκυανίνες, όπως οι prodelphinidins, η δελφινιδίνη, η κυανιδίνη και η πελαργονιδίνη <sup>[54]</sup>.

Σε προκαταρκτική εργαστηριακή έρευνα και κλινικές δοκιμές, ο χυμός του ροδιού μπορεί να είναι αποτελεσματικός στη μείωση των παραγόντων κινδύνου καρδιακής νόσου, συμπεριλαμβανομένης της οξειδωσης LDL, της οξειδωτική κατάσταση μακροφάγων, και του σχηματισμό αφρωδών κυττάρων <sup>[55,56]</sup>.

Σε μια περιορισμένη μελέτη υπερτασικών ασθενών, η κατανάλωση χυμού ροδιού για δύο εβδομάδες αποδείχθηκε ότι μειώνει τη συστολική πίεση του

αίματος με την αναστολή του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης του ορού <sup>[57]</sup>. Η κατανάλωση χυμού μπορεί να αναστείλλει επίσης ιογενείς λοιμώξεις <sup>[58]</sup>, ενώ τα εκχυλίσματα ροδιού έχουν αντιβακτηριακή δράση εναντίον οδοντικής πλάκας <sup>[59]</sup>.

Το 2013, 44 κλινικές δοκιμές καταχωρήθηκαν στα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας για την εξέταση των αποτελεσμάτων των εκχυλισμάτων ροδιού ή την κατανάλωση χυμού σε μια ποικιλία διαταραχών του ανθρώπου συμπεριλαμβανομένων των <sup>[60]</sup>: καρκίνος του προστάτη, υπερπλασία του προστάτη, διαβήτης, λέμφωμα, κοινό κρυσολόγημα, οξειδωτικό στρες σε αιμοκάθαρση διαβητικών, αθηροσκλήρωση, στεφανιαία νόσος, αιμοκάθαρση για νεφρική νόσο, ανδρική στειρότητα, γήρανση, μνήμη, επιπλοκές της κύησης, οστεοπόρωση, στυτική δυσλειτουργία.

### **2.7.3 Επεξεργασία εκχυλίσματος παραπροϊόντων βιομηχανικής παραγωγής χυμού ροδιού και παραλαβή**

Η διαδικασία της επεξεργασίας του δείγματος έγινε από την ερευνητική ομάδα του καθ. Σ. Χαρουτουιάν στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Εν συντομία η διαδικασία ήταν η εξής: 50 γραμμάρια αποξηραμένου δείγματος εκχυλίζεται σε ένα μίγμα 200 mL μεθανόλης (MeOH)/H<sub>2</sub>O/1.0N HCl (90:9.5:0.5 v/v) και επεξεργάστηκε στη συνέχεια για 10 λεπτά με υπερήχους (μπανάκι υπερήχων). Ο διαλύτης διαχωρίστηκε με διήθηση, και το υπόλοιπο στερεό επανα-εκχυλίστηκε τρεις φορές, χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη. Τα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν υπό κενό, το εναιώρημα διαλύθηκε σε 30 mL MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά (7000 rpm). Το υπερκείμενο εκχυλίστηκε με πετρελαϊκό αιθέρα (3X30 mL) με σκοπό την απομάκρυνση των λιπιδίων και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το διάλυμα που απέμεινε χύθηκε σε 30 ml άλμης και επανεκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc, 4X30 mL). Έτσι, όλα τα σάκχαρα παρέμειναν στην υδατική φάση. Στη συνέχεια, τα συνθετικά οργανικά στρώματα (οργανικές φάσεις) ξηράνθηκαν πάνω από άνυδρο θειικό μαγνήσιο και εξατμίστηκαν υπό κενό <sup>[61]</sup>. Τέλος, το στερεό διαλύθηκε σε DMSO 100% (το κάθε 1 mg διαλύθηκε σε 1000 μl DMSO 100%) και στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH 6,8 (πεχαμετρικό χαρτί) με διάλυμα 0,1M NaOH. (Για να αποφευχθεί η αποικοδόμηση των πολυφαινολών, όλες οι προαναφερθείσες διαδικασίες εκτελέστηκαν απουσία ηλιακού φωτός και σε θερμοκρασίες κάτω των 35 °C).

## ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το 2010 η συχνότητα του διαβήτη τύπου 2 στους ενήλικους (ηλικίας 20-79 ετών) παγκοσμίως ήταν 6,4%, και 285 εκατομμύρια ενήλικες νοσούσαν. Ο αριθμός αυτός αναμένεται να αυξηθεί σε 7,7% μέχρι το 2030<sup>[62]</sup>. Έτσι στις μέρες μας η θεραπεία για το διαβήτη τύπου-2 βασίζεται κυρίως σε μια ποικιλία προσεγγίσεων χημικού τύπου. Ωστόσο, αυτές οι θεραπείες έχουν σημαντικές με βάση το μηχανισμό τους παρενέργειες, όπως αύξηση του σωματικού βάρους και αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή νόσος, καθώς και περιορισμένη αποτελεσματικότητα και ανοχή<sup>[1]</sup>.

Ως εκ τούτου, χρειάζονται θεραπευτικές προσεγγίσεις που όχι μόνο ελαττώνουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα αλλά επίσης αντιμετωπίζουν ειδικά τη διαβητική δυσλιπιδαιμία και τις αθηροσκληρωτικές καρδιαγγειακές επιπλοκές της νόσου<sup>[1]</sup>. Τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει μια εκθετική αύξηση στον τομέα των φυτικών φαρμάκων, τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις ανεπτυγμένες χώρες, λόγω σαφώς της φυσικής τους προέλευσης και των λιγότερων παρενεργειών<sup>[63]</sup>. Πολλά συμβατικά φάρμακα έχουν προέλθει από πρότυπα μόρια σε φαρμακευτικά φυτά<sup>[64]</sup>.

Λόγω του κεντρικού ρόλου στο μεταβολισμό του γλυκογόνου, η GP θεωρείται απ'τους πλέον γνωστούς μοριακούς στόχους υπογλυκαιμικών φαρμάκων, τα οποία είναι σε θέση να ελέγχουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα ασθενών του διαβήτη τύπου 2<sup>[8]</sup>.

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ενζύμο και το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη εκχυλισμάτων ροδιού για τον προσδιορισμό της IC50 έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου.

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



### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

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

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

##### ✓ Υλικά

- 3 κουνέλια
- Απιονισμένο H<sub>2</sub>O
- Ώξινοανθρακικό κάλιο, MB. 100.12
- 2-μερκαπτο-αιθανόλη, MB. 78.3
- EDTA, MB. 372.24
- Οξικό οξύ 99-100%, MB. 60.05
- β-γλυκερινοφωσφορικό νάτριο 0.005M, MB. 306.12
- 5'-φωσφορική αδενοσίνη, MB. 367.2
- Τρίς- (υδροξυμέθυλο)-αμινομεθέλιο, MB. 121.1
- Οξικό μαγνήσιο, MB. 214.46
- Θεικόαμμώνιο, MB. 132.14
- C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> - Γλυκερόλη 100%
- Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης. Πριν από τη χρήση τους υφίστανται κατεργασία με 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 10mM EDTA στους 100°C (30 min) και στη συνέχεια έκπλυση με απεσταγμένο ύδωρ 100°C (30 min).

✓ Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO<sub>3</sub>),
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N (CH<sub>3</sub>COOH)
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα οξικού μαγνησίου 1.0M ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg)

✓ Όργανα

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

## Διαδικασία

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

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

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

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

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

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

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

Το διάλυμα συλλέγεται από τα σακουλάκια διαπίδυσης και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 17000 rpm για 10 min στους 20-25°C με χρήση μικρής κεφαλής. Το υπερκείμενο ογκομετρείται και προστίθενται: α) διάλυμα 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3 M pH 7.0 όγκου ίσο με τα 3/27 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, β) διάλυμα EDTA 0.1 M pH 7.0 ίσο με τα 5/1000 του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και γ) αλκαλικό διάλυμα Tris 2 M για ρύθμιση του pH στο 8.8. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου όπου προστίθεται διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 17000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20-25°C με μικρή κεφαλή και ογκομετρείται το υπερκείμενο.

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

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

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη AMP 0.1M (pH 7.0) και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 1M (pH 7.0) σε όγκο ίσο με το 1/100 του πρωτεϊνικού διαλύματος. Το μίγμα τοποθετείται σε σωλήνες φυγοκέντρησης και αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου. Ακολούθως, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8). Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20-25°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων. Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 3h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: το AMP και το (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg διευκολύνουν την κρυστάλλωση

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

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

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

## **3.2 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου**

### **3.2.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου**

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

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



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

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

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

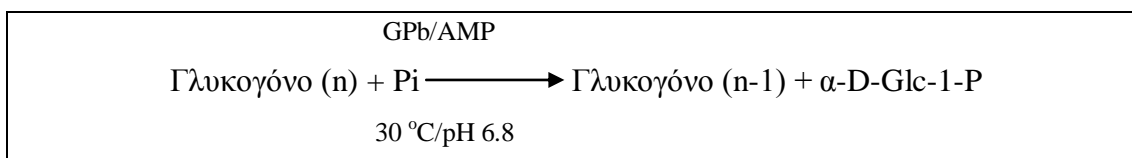
Στη συνέχεια, το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C για 15 λεπτά. Μετά την επώαση, προστίθενται 180 $\mu$ L από το ενζυμικό μείγμα στον σωλήνα του υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες: 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mMAMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υποστρώματα  $\alpha$ -D-Glc-1-P από 2 mM έως 20 mM , η θερμοκρασία είναι 30° C και το pH 6.8. Ανά τακτά και καθορισμένα χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού), λαμβάνονται δείγματα των 200  $\mu$ L από το διάλυμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50  $\mu$ LSDS 1%. Το SDS, είναι απορρυπαντικό και προκαλεί την αποδιάταξη και την αδρανοποίηση του ενζύμου.

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

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

Η σταθερά Michaelis-Menten (K<sub>m</sub>) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V<sub>max</sub>). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος ( $\alpha$ -D- Glc-1-P).

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



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

#### Διαδικασία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 1% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D- Glc-1-P 2.0 έως 20 mM, με προσθήκη 200 μL από το αντίστοιχο υπόστρωμα α-D- Glc-1-P, 18 μL AMP 50 mM και 502 μL H<sub>2</sub>O.

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

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

### 3.2.3 Προσδιορισμός IC<sub>50</sub> αναστολέα

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

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

#### ✓ Υλικά

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



✓ Όργανα

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

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

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

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

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

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

Παρασκευάζονται 2 ρυθμιστικά διαλύματα:

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

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

Φυλάσσονται στους 4 °C.

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

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

Συνολικά προκύπτουν τα παρακάτω διαλύματα:

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

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

## Διαδικασία

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν για το δείγμα 8 και δείγμα 9 αντίστοιχα ήταν:

| Δείγμα 8      | Δείγμα 9     |
|---------------|--------------|
| - 0.005 mg/mL | - 0.01 mg/mL |
| - 0.008 mg/mL | - 0.02 mg/mL |
| - 0.01 mg/mL  | - 0.03 mg/mL |
| - 0.015 mg/mL | - 0.04 mg/mL |
| - 0.02 mg/mL  | - 0.06mg/mL  |

### **3.5 Παρασκευή τυφλών**

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

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

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

### **3.6 Προσδιορισμός φωσφόρου**

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

#### **Μέθοδος ασκορβικού οξέος**

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

✓ Υλικά

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

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

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

Διαδικασία

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

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

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

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity) αποτελεί έκφραση της ποσότητας αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου και ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1μmol υποστρώματος ή παραγωγή 1 μmol προϊόντος ανά λεπτό κάτω από ορισμένες συνθήκες. Η στατιστική

επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit, εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simpleweighting'). Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων είναι η εξής:

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

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

**t**: ο χρόνος της αντίδρασης

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

Οι αρχικές ταχύτητες που προκύπτουν από την παραπάνω εξίσωση επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων (ετεροσκεδαστικότητα 'explicit weighting'). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους Vmax και Km και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (Km) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten με την προϋπόθεση σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος :

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



όπου **v** : Η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης.

**Vmax**: Η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

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

**E**: Το ένζυμο

**S**: Το υπόστρωμα

**ES:** Το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος

**P:** Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης

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

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

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

όπου:  $S.a._{control}$  : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

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

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

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



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

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

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

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

Η κρυστάλλωση στηρίζεται στην αργή, ελεγχόμενη καταβύθιση της πρωτεΐνης υπό συνθήκες που δεν την μετουσιώνουν. Ο σχηματισμός των φυσικών κρυστάλλων GPb (T state) γίνεται σύμφωνα με την μέθοδο batch. Η μέθοδος αυτή αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας απότομα κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στην περίπτωση της ανάπτυξης κρυστάλλων GPb (T state), η πρωτεΐνη ως εναιώρημα σε κατάλληλες συνθήκες αναπτύσσεται σε τετραγωνικούς κρυστάλλους (ομάδας χώρου P43212) εντός γυάλινων σωλήνων.

#### ✓ Υλικά

- Ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM BES/NaOH (σουλφονικό άλας του N,N-δισ(2-υδροξυαιθυλο)-2-Αμινοαιθανίου), pH 6.7, 1mM EDTA 2% w/v NaN3, 2 mM DTT
- Διάλυμα DTT 200mM, pH 6.7
- Διάλυμα σπερμίνης 200mM, pH 6.7

- Διάλυμα IMP 200mM pH 7.0 (5'- φωσφορική ινοσίνη (με τα Νατρίου άλας), C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>PNa<sub>2</sub>, MB 392.17 g/mol (SIGMA))
  - Πυρήνες κρυστάλλωσης
  - Εναιώρημα GPb περιεκτικότητας 20-30 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα BES/NaOH pH 6.7.
  - Γυάλινοι σωλήνες διαμέτρου 2-3 nm και μήκους 3 cm
- ✓ Όργανα
- Φασματοφωτόμετρο UV

### Διαδικασία

Για την ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων (ομάδας συμμετρίας χώρου P<sub>4</sub><sub>3</sub>2<sub>1</sub>2) της GP χρησιμοποιείται η στατική μέθοδος (batch method). Το ένζυμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από AMP ( $A_{260}/A_{280} = 0.53-0.54$ ). Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε μικρούς σωλήνες μήκους περίπου 3 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3 mm, των οποίων τα δύο άκρα κλείνονται με parafilm.

Οι κρύσταλλοι της φυσικής T διαμόρφωσης της GPb αναπτύσσονται από μίγμα 20-30 mg/ml καθαρής πρωτεΐνης, 1 mM σπερμίνης, 3 mM DTT, 1 mM IMP, 10 mM BES/NaOH (pH 6.7), 0.1 mM EDTA και 0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub> στο οποίο προστίθεται διάλυμα πυρήνων κρυστάλλωσης κατάλληλης αραίωσης (Oikonomakos *et al.*, 1985). Ο σχηματισμός των κρυστάλλων αρχίζει σε 5-6 h, ενώ η ανάπτυξη συνεχίζεται για μερικές εβδομάδες. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας των κρυστάλλων είναι  $a=b=128.6 \text{ \AA}$ ,  $c=116.1 \text{ \AA}$  και  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ .

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

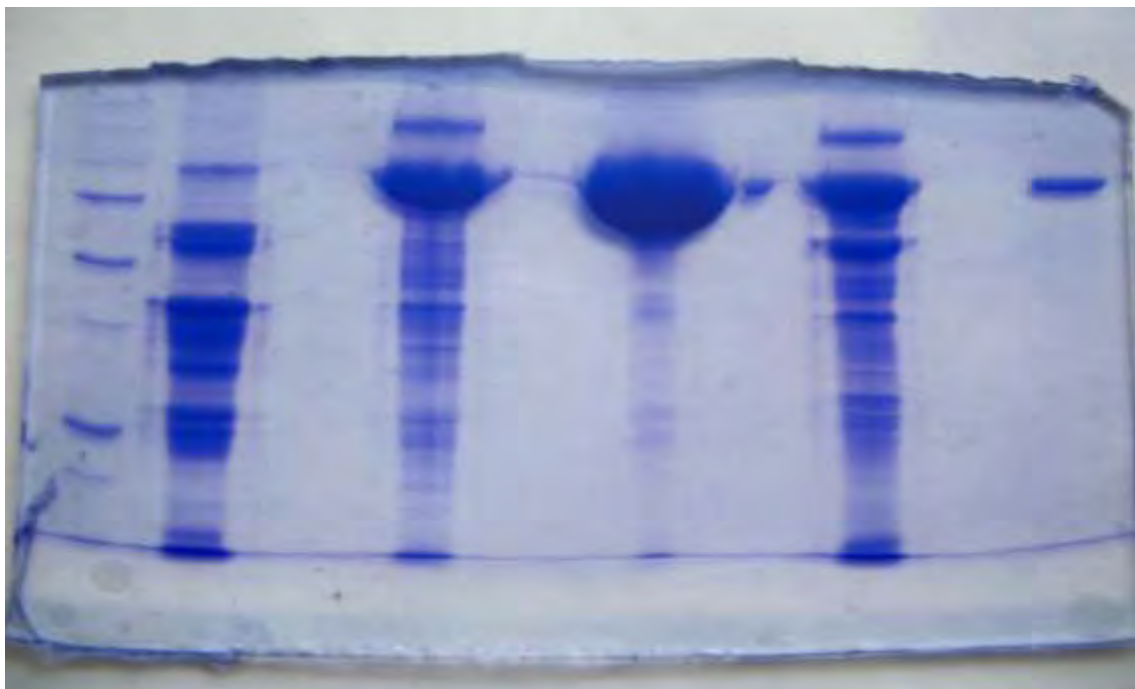
X. Η σχέση που συνδέει την ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας με το μέγεθος του κρυστάλλου είναι:  $I = I_0 * e^{-\mu t}$

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

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

Μάρτυρας      Διαδρομή 1      Διαδρομή 2      Διαδρομή 3      Διαδρομή 4      Διαδρομή 5



**Εικόνα 29.** Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της **GPb**: Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη.

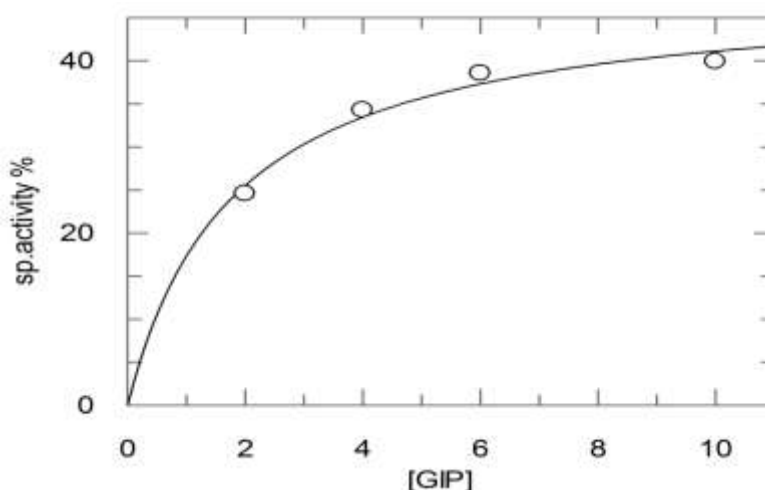
## 4.2 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

### 4.2.1 Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η σταθερά  $K_m$  (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (G-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η  $K_m$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας ( $V_{max}$ ). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της  $K_m$ .

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι:  $K_m = 1,8012 \pm 0,36 \text{ mM}$  και  $V_{max} = 48,5205 \pm 2,7 \text{ } \mu\text{mol/min/mg}$

Στο παρακάτω διάγραμμα (**Εικόνα 30**) παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity,  $\mu\text{mol}$  φωσφορικών /  $\text{min/mg}$  ενζύμου) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (G-1-P).

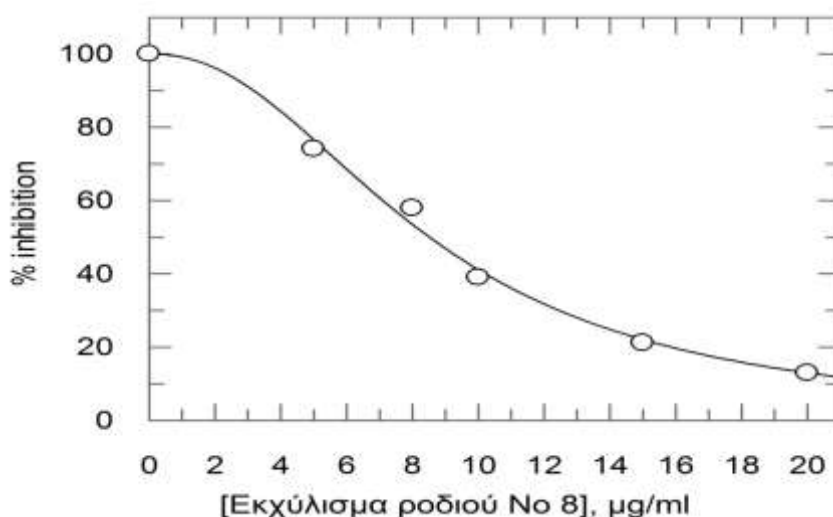


**Εικόνα 30.** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

#### 4.2.2 Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού.

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

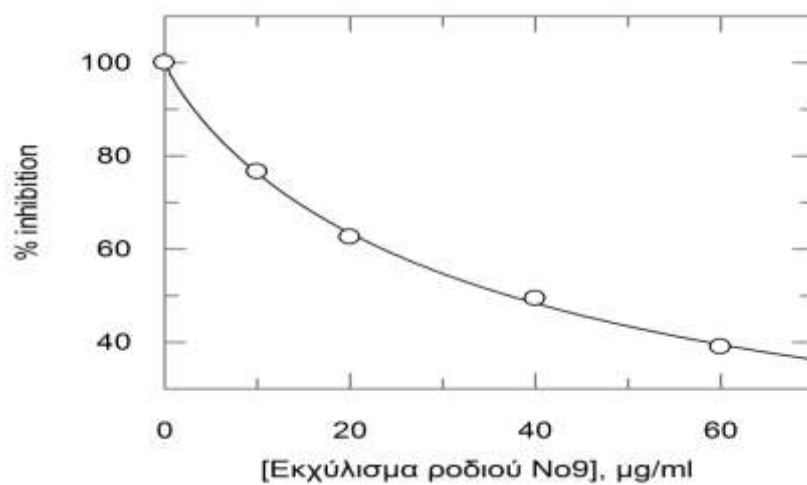
- **Εκχύλισμα χυμοποίησης No 8**



Εικόνα 31. Καμπύλη της αναστολής ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της  $IC_{50}$ .

| Parameter | Value | Std. Error |
|-----------|-------|------------|
| $IC_{50}$ | 8.52  | 0,25       |

- Εκχύλισμα χυμοποίησης Νο 9



Εικόνα 32. Καμπύλη της αναστολής ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος και υπολογισμός της  $IC_{50}$ .

| Parameter | Value | Std. Error |
|-----------|-------|------------|
| $IC_{50}$ | 37.12 | 0,83       |

### 4.3 Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που πραγματοποιείται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας ως προς την ανασταλτική επίδραση φυσικών εκχυλισμάτων από διάφορες ποικιλίες φυτικών ειδών, έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ένα ένζυμο που αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων της διαδικασίας παραγωγής χυμού από ρόδι της ποικιλίας Wonderful, για τον προσδιορισμό της  $IC_{50}$ . Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων, τα εκχυλίσματα 8 και 9 που μελετήθηκαν έχουν μέτρια ανασταλτική επίδραση με τιμή  $IC_{50}$  8.52μg/ml και 37.12 μg/ml, αντίστοιχα.

Ωστόσο βρίσκεται σε εξέλιξη η κρυσταλλογραφική μελέτη των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων, έτσι ώστε να γίνει ταυτοποίηση της δομής της δραστικής ουσίας που προκαλεί την αναστολή του ενζύμου, η εύρεση του κέντρου σύνδεσης του ενζύμου στο οποίο προσδένεται, καθώς και η ανακάλυψη των βιοχημικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του ενζύμου και της ουσίας έτσι ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής.

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

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- 1) David E. Moller New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome, Nature, 2001
- 2) Σωτήριος Α. Ράπτης, 1998, Εσωτερική Παθολογία, Τόμος IV, Επιστημονικές Εκδόσεις «Γρηγόριος Παρισιανός» Μαρία Γρ. Παρισιανού, Αθήνα
- 3) Αθανάσιος Σμοκοβίτης, 2007, Φυσιολογία, 5<sup>η</sup> έκδοση, Εκδοτικός Οίκος Αφοι Κυριακίδη
- 4) Stryer L., 2007, Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 3<sup>η</sup>, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
- 5) "Chapter 3: Calculation of the Energy Content of Foods – Energy Conversion Factors", *Food energy — methods of analysis and conversion factors*, FAO Food and Nutrition Paper 77, Rome: Food and Agriculture Organization, 2003, ISBN 92-5-105014-7.
- 6) Gailliot, Matthew T.; Baumeister, Roy F. (2007), "The Physiology of Willpower: Linking Blood Glucose to Self-Control", *Personal. Soc. Psychol.Rev.* 11 (4):30327,doi:10.1177/1088868307303030, PMID 18453466
- 7) McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., 2000, *Essentials of Exercise Physiology*, Τόμος I, Έκδοση 2<sup>η</sup>, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης
- 8) Oikonomakos, N.G. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2002, 3, 561-586.
- 9) Γεωργατσός Γ. Ιωάννης, Κυριακίδη Α. Δημήτριος, Γιουψάνης Α. Τραϊανός, Ενζυμολογία, ISBN13 9789604317486, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, Νοέμβριος 2001.
- 10) Johnson LN, Barford, D (February 1990). "Glycogen phosphorylase. The structural basis of the allosteric response and comparison with other allosteric proteins.". *Journal of Biological Chemistry* 265 (5): 2409–2412. PMID 2137445.
- 11) Gautron, S., Daegelen, D., Mennecier, F., Dubocq, D., Kahn, A., Dreyfus, J.-C. Molecular mechanisms of McArdle's disease (muscle glycogen phosphorylase deficiency). *J. Clin. Invest.* 79: 275-281, 1987. [PubMed: 3466902, related citations] [Full Text: [Journal of Clinical Investigation](#)]
- 12) Kubisch, C., Wicklein, E. M., Jentsch, T. J. Molecular diagnosis of McArdle disease: revised genomic structure of the myophosphorylase gene and identification of a novel mutation. *Hum. Mutat.* 12: 27-32, 1998. [PubMed: 9633816] [Full Text: [John Wiley & Sons, Inc.](#)]
- 13) Lebo, R. V., Anderson, L. A., DiMauro, S., Lynch, E., Hwang, P., Fletterick, R. Rare McArdle disease locus polymorphic site on 11q13 contains CpG sequence. *Hum. Genet.* 86: 17-24, 1990. [PubMed: 1701414, related citations]
- 14) Andreu, A. L., Nogales-Gadea, G., Cassandrini, D., Arenas, J., Bruno, C. McArdle disease: molecular genetic update. *Acta Myol.* 26: 53-57, 2007. [PubMed: 17915571, related citations]



- 15) Wolfe GI, Baker NS, Haller RG, Burns DK, Barohn RJ (2000). "McArdle's disease presenting with asymmetric, late-onset arm weakness". *Muscle Nerve* 23 (4): 641–5. doi:10.1002/(SICI)1097-4598(200004)23:4<641::AID-MUS25>3.0.CO;2-M. PMID 10716777
- 16) Palm D, Klein HW, Schinzel R, Buehner M, Helmreich, EJM (February 1990). "The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis". *Biochemistry* 29 (5): 1099–1107. doi:10.1021/bi00457a001. PMID 2182117
- 17) Monod J., Wyman J., and Changeux J.-P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12: 88-118.
- 18) Johnson, L.N.; Acharya, K.R.; Jordan, M.D.; McLaughlin, P.J. *J. Mol. Biol.*, 1990, 211, 645-661
- 19) Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., Johnson, L.N. (1992) In *Post-translational modification of proteins* (Harding, J.J. and Crabbe, M.J.C., Eds.), pp, 81-151, CRC Press, Boca Raton, FL
- 20) Barford D, Johnson LN. *The allosteric transition of glycogen phosphorylase. Nature.* 1989 Aug 24;340(6235):609–616
- 21) Barford, D.; Hu, S.H.; Johnson, L.N. *J. Mol. Biol.*, 1991, 218, 233-260.
- 22) Oikonomakos, N.G.; Tiraidis, C.; Leonidas, D.D.; Zographos, S.E.; Kristiansen, M.; Jessen, C.U.; Norskov-Lauritsen, L.; Agius, L. *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 5687-5701
- 23) Zographos, S.E.; Oikonomakos, N.G.; Tsitsanou, K.E.; Leonidas, D.D.; Chrysina, E.D.; Skamnaki, V.T.; Bischoff, H.; Goldmann, S.; Watson, K.A.; Johnson, L.N. *Structure*, 1997, 5, 1413-1425.
- 24) Oikonomakos, N.G.; Tsitsanou, K.E.; Zographos, S.E.; Skamnaki, V.T.; Goldmann, S.; Bischoff, H. *Protein Sci.*, 1999, 8, 1930-1945.
- 25) Tsitsanou, K.E.; Skamnaki, V.T.; Oikonomakos, N.G. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000, 384, 245-254.
- 26) Johnson LN (March 1992). "Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors". *FASEB Journal* 6 (6): 2274–82. PMID 1544539
- 27) Sprang, S.R., Fletterick, R.J., Stern, M.J., Yang, D., Madsen, N.B. and Sturtevant, J.S. (1982) *Biochemistry* 21, 2036-2048.
- 28) Chebotareva, N., Klinov, S.V. and Kurganov, B.I. (2001) *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 18, 265-297.

- 29) Kasvinsky, P.J., Shechosky, S. and Fletterick, R.J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 9102-9106.
- 30) Johnson, L.N.; Cheetham, J.; McLaughlin, P.J.; Acharya, K.R.; Barford, D.; Phillips, D.C. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 1988, 139, 81-134.
- 31) Pinotsis, N.; Leonidas, D.D.; Chrysina, E.D.; Oikonomakos, N.G.; Mavridis, I.M. *Protein Sci.*, 2003, 12, 1914-1924.
- 32) R. Kurukulasuriya, J. T. Link, D. J. Madar, Z. Pei, S. J. Richards, J. J. Rohde, A. J. Souers, B. G. Szczepankiewicz, 2003 Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of hepatic glucose production. *Current Medicinal Chemistry*, 10 123 153
- 33) S. A. Ross, E. A. Gulve, M. H. Wang, 2004 Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. *Chemical Reviews*, 104 1255 1282 .
- 34) L. Somsák, V. Nagy, Z. Hadady, T. Docsa, P. Gergely, 2003 Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments. *Current Pharmaceutical Design*, 9 1177 1189
- 35) L. Somsák, V. Nagy, Z. Hadady, N. Felföldi, T. Docsa, P. Gergely, 2005 Recent developments in the synthesis and evaluation of glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents. In: *Frontiers in Medicinal Chemistry*. Reitz, A. B., Kordik, C. P., Choudhary, M. I. & Rahman, A. u. (Ed(s)). Bentham. 253 272
- 36) W. Tracey, J. Treadway, W. Magee, R. Mc Pherson, C. Levy, D. Wilder, Y. Li, C. Yue, W. Zavadski, E. Gibbs, A. Smith, D. Flynn, D. Knight, 2003 A novel glycogen phosphorylase inhibitor, CP-368296, reduces myocardial ischemic injury. *Diabetes*, 52 A135 A135
- 37) H. Sun, L. Xu, 2010 Pharmacological manipulation of brain glycogenolysis as a therapeutic approach to cerebral ischemia. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 10 1188 1193 .
- 38) J. F. Geschwind, C. S. Georgiades, Y. H. Ko, P. L. Pedersen, 2004 Recently elucidated energy catabolism pathways provide opportunities for novel treatments in hepatocellular carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 4 449 457 .
- 39) J. B. Schnier, K. Nishi, A. Monks, F. A. Gorin, E. M. Bradbury, 2003 Inhibition of glycogen phosphorylase (GP) by CP-91,149 induces growth inhibition correlating with brain GP expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309 126 134 .
- 40) Cicero L. T. Chang, Yenshou Lin, Arlene P. Bartolome, Yi-Ching Chen, Shao-Chih Chiu, Wen-Chin Yang, *Herbal Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: Chemistry, Biology, and Potential Application of Selected Plants and Compounds*, Evidence-

- 41) F.C Chen Present advance in chemical and pharmacological research of natural products for anti-hyperglycemia Chinese Traditional and Herbal Drugs, 18 (1987), pp. 39–44
- 42) S.J Wu, D.Y Li A survey on polysaacharides from plants for anti-hyperglycemia Chinese Traditional and Herbal Drugs, 23 (1992), pp. 549–554
- 43) G.Y Gu, Y Jiang A survey on anti-hyperglycemic constituents from plants World Phytomedicines, 12 (1997), pp. 55–58
- 44) J Yin, M.D Chen Present advance in active constituents of Chinese medicinal herbs for anti-hyperglycemia Information on Chinese Traditional Medicine, 6 (2000), pp. 12–13
- 45) W.L Lia, , H.C Zhengc, J Bukurub, N De Kimpe Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus, Journal of Ethnopharmacology Volume 92, Issue 1, May 2004, Pages 1–21
- 46) Diganta Narzary , Kamalesh S. Mahar , T.S. Rana, S.A. Ranade Analysis of genetic diversity among wild pomegranates in Western Himalayas, using PCR methods Retrieved May 5, 2013.
- 47) Morton JF (1987). "Pomegranate, *Punica granatum* L.". Fruits of Warm Climates. Purdue New Crops Profile. pp. 352–5. Retrieved 2012-06-14.
- 48) K. K. Jindal, R. C. Sharma (2004). Recent trends in horticulture in the Himalayas. Indus Publishing.
- 49) "Pomegranate: The Longevity Plant". Ayurvedam.com. Retrieved 2009-11-24.
- 50) Ch. Murali Manohar (2002). Ayurveda for All. Pustak Mahal. ISBN 81-223-0764-7.
- 51) Vasant Lad (2002). Textbook of Ayurveda, Volume 1. Ayurvedic Press. ISBN 1-883725-07-0.
- 52) Schubert SY, Lansky EP, Neeman I (July 1999). "Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids". J Ethnopharmacol 66 (1): 11–17.
- 53) Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H (November 2006). "Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers". J Agric Food Chem. 54 (23): 8956–61.

- 54) Plumb GW; De Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC, Williamson G (2002). "Antioxidant properties of gallocatechin and prodelpinidins from pomegranate peel". *Redox Rep.* 7 (41): 41–6.
- 55) Kaplan M, Hayek T, Raz A et al. (1 August 2001). "Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis". *J Nutr.* 131 (8): 2082–9.
- 56) Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D et al. (June 2004). "Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation". *Clin Nutr* 23 (3): 423–33.
- 57) Aviram M, Dornfeld L (September 2001). "Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure". *Atherosclerosis* 158 (1): 195–8.
- 58) Neurath AR, Strick N, Li YY, Debnath AK (2004). "Punica granatum (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide". *BMC Infect. Dis.* 4: 41. doi:10.1186/1471-2334-4-41.
- 59) Menezes SM, Cordeiro LN, Viana GS (2006). "Punica granatum (pomegranate) extract is active against dental plaque". *Journal of herbal pharmacotherapy* 6 (2): 79–92.
- 60) "NIH-listed human clinical trials on pomegranate". *Clinicaltrials.gov*. Retrieved 2013-11-19.
- 61) Anna Apostolou, Dimitrios Stagos, Elissavet Galitsiou, Argiris Spyrou, Serko Haroutounian, Nikolaos Portesis, Ioanna Trizoglou, A Wallace Hayes, Aristides M Tsatsakis, Dimitrios Kouretas, Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts, *Food Chem Toxicol* 2013 Nov 1;61:60-8. Epub 2013 Feb 1.
- 62) Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010; 87:4-14.
- 63) Grover JK, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J Ethnopharmacol*, 2002; 81:81–100.
- 64) Bailey CJ, Day C. Metformin: Its botanical background. *Pract Diab Inter*, 2004; 21:115-117.