



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ**  
**ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ**  
**ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΝΕΩΝ**  
**ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ**



Αδάμου Ευαγγελία – Ηλιάννα

Λάρισα, 2012

ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ  
ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΜΕ  
ΣΤΟΧΟ ΤΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ΝΕΩΝ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

**Τριμελής επιτροπή**

- Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Δρ. Κοντού Μαρία

Λέκτορας Κλινικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία

Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract.....	6
1 Εισαγωγή.....	8
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	8
1.2 Ομοιοστασία της γλυκόζης.....	10
1.3 Ινσουλίνη - Γλυκαγόνη.....	11
1.4 Τύποι Σακχαρώδη διαβήτη.....	15
1.4.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ινσουλινο-εξαρτώμενος, IDDM).....	15
1.4.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (μη ινσουλινο-εξαρτώμενος, NIDDM).....	16
2 Βασικές γνώσεις.....	18
2.1 Γλυκόζη.....	18
2.2 Γλυκογόνο.....	20
2.2.1 Μεταβολισμός του γλυκογόνου.....	21
2.3 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP).....	24
2.3.1 Γενικά.....	24
2.3.2 Η PLP συμμετέχει στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου.....	26
2.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	27
2.4.1 Γενικά.....	27
2.4.2 Δομή.....	29
2.4.3 Μηχανισμός δράσης.....	29
2.4.4 Ρύθμιση.....	30
2.4.5 Κρυσταλλική δομή και κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	35
2.5 Κινητική ενζύμων και ενζυμική αναστολή .....	39
2.6 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων.....	43
2.7 Vinsanto.....	44
3 Πειραματικό μέρος.....	45

3.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού.....	45
3.2 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	49
3.2.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου.....	49
3.2.2 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (Km).....	51
3.2.3 Προσδιορισμός IC <sub>50</sub> αναστολέα.....	52
3.3 Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b.....	53
3.4 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης.....	54
3.5 Παρασκευή τυφλών.....	57
3.6 Προσδιορισμός φωσφόρου.....	57
3.7 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit.....	59
3.8 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων της Grb.....	61
4 Αποτελέσματα.....	64
4.1 Αποτελέσματα απομόνωσης της GPb.....	64
4.2 Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	65
4.3 Κινητική μελέτη εκχυλίσματος σταφυλιού-Vinsanto.....	66
5 Συμπεράσματα.....	67
Βιβλιογραφία.....	68

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Λειτουργικής και Δομικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2011-Μάρτιος 2012.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ., Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, υπό την καθοδήγηση του οποίου εκπόνησα την πτυχιακή μου εργασία. Οι γνώσεις του και η βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς επίσης και η υπομονή που έδειξε ήταν πολύτιμες.

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

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τη συμβολή της υποψήφιας διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Π.Θ., Αναστασία Καντσάδη, για τη διεκπεραίωση και τη συγγραφή της παρούσης εργασίας. Η υπομονή και η βοήθειά της στο εργαστήριο ήταν σημαντικές.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, καθώς και όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στην εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας.

Εύχομαι σε όλους μια σταθερά ανοδική πορεία στον τομέα τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης, μια από τις σοβαρότερες μεταβολικές διαταραχές του δυτικού κόσμου, χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχές στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Είναι αποτέλεσμα είτε της ελαττωμένης έκκρισης ινσουλίνης είτε της ελάττωσης της ευαισθησίας των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Η θεραπευτική προσέγγιση έγκειται στη διατήρηση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα όσο το δυνατόν πιο κοντά στα φυσιολογικά. Για το σκοπό αυτό, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για την εύρεση μορίων που εκλεκτικά θα τα ενεργοποιούν ή θα τα απενεργοποιούν με τελικό στόχο τη ρύθμιση των επιπέδων του σακχάρου στον οργανισμό. Προς αυτήν την κατεύθυνση, το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχουν οι βιοδραστικές ενώσεις που εμπεριέχονται σε φυσικά προϊόντα μιας τα τελευταία έχουν τη δυνατότητα αξιοποίησης στην παραγωγή και πιστοποίηση βιολειτουργικών τροφίμων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Στην παρούσα εργασία, απομονώσαμε το ένζυμο φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μυς κουνελιού και αξιολογήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση εκχυλίσματος από βόστρυχους σταφυλιών ποικιλίας Vinsanto, στην ενζυμική του δραστηριότητα. Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι η ένωση αυτή είναι ένας μέτριας ισχύος αναστολέας του ενζύμου με σταθερά αναστολής,  $IC_{50} 9.73 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$ .

## ABSTRACT

Diabetes mellitus, one of the most serious hormonal imbalance diseases, is characterized by elevated blood glucose levels (hyperglycemia) and glucose metabolism imbalance, either as a result of decreased insulin secretion or because of decrease in body cells sensitivity to insulin. The main goal in diabetes treating is to keep blood sugar as close as possible to normal limits. For that reason, enzymes involved in the regulation of glucose levels are used

as molecular targets to discover bioactive molecules to modulate their function. Glycogen phosphorylase, a key enzyme in glucose homeostasis, is one of the most important molecular targets for the discovery of novel hypoglycemic agents. Of particular interest are bioactive molecules from natural products since the latter have the potential for the production of biofunctional food products.

In the present study, we isolated the enzyme glycogen phosphorylase b from rabbit skeletal muscles and evaluated, with kinetic experiments, the effect of an extract from bunches of the Greek grape variety, Vinsanto, on its enzymatic activity. The kinetic experiments, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that the grape extract Vinsanto exerts inhibitory potency against the enzyme with an  $IC_{50}$  value of  $9.73 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$ .

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

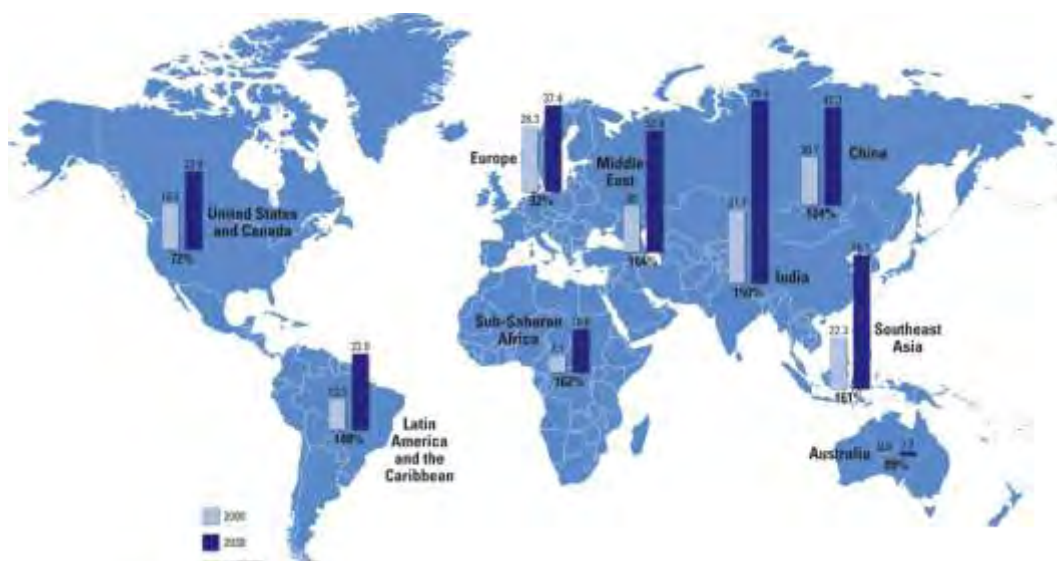
Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί σήμερα μείζον πρόβλημα υγείας στο δυτικό κόσμο, ώστε να θεωρείται πανδημία. Υπολογίζεται ότι σε παγκόσμιο επίπεδο περίπου 346 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από την ασθένεια αυτή (ΠΟΥ, 2011). Πρόκειται για μια μεταβολική διαταραχή κατά την οποία ο οργανισμός έχει μειωμένη ικανότητα (ή καθόλου) για να παράγει την ορμόνη ινσουλίνη ή η ινσουλίνη είναι αδρανοποιημένη (αντίσταση στην ινσουλίνη). Χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης προκαλώντας βλάβες σε αρκετούς ιστούς του σώματος. Ο διαβήτης δεν είναι μια ενιαία ασθένεια, αλλά αντιπροσωπεύει πολλές διαφορετικές ασθένειες με εντελώς διαφορετικό φαινότυπο, με κοινό χαρακτηριστικό όλων τα υψηλά επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Ο διαβήτης είναι ένας από τους πιο ισχυρούς παράγοντες κινδύνου για παθήσεις στα αγγεία της καρδιάς και του αίματος, όπως: καρδιακή προσβολή, στηθάγχη, εγκεφαλικό επεισόδιο και νεφρική βλάβη. Στα κλασσικά συμπτώματα του σακχαρώδους διαβήτη περιλαμβάνονται η υπεργλυκαιμία, η γλυκοζουρία, η πολυουρία, η πολυδιψία, η πολυφαγία, η ξαφνική απώλεια σωματικού βάρους, η έντονη κούραση, η θολή όραση, το μούδιασμα των άκρων, η αργή επούλωση των πληγών, σεξουαλικά προβλήματα και κολπικές μολύνσεις. (**Εικόνα 1**)





**Εικόνα 1:** Τα συμπτώματα του σακχαρώδους διαβήτη.

Οι κύριοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη είναι ο *διαβήτης τύπου 1*, ο *διαβήτης τύπου 2* και ο *διαβήτης της κύησης*, με τον διαβήτη τύπου 2 να διαγιγνώσκεται στο 90-95% των διαβητικών ασθενών. Τα ποσοστά των ασθενών με διαβήτη τύπου 2 είναι πολύ υψηλά σε όλο τον κόσμο και αναμένεται να αυξηθούν δραματικά μέχρι το 2030 (**Εικόνα 2**).



**Εικόνα 2:** Τα παγκόσμια ποσοστά του διαβήτη τύπου 2 το 2000 και τα αναμενόμενα ποσοστά το 2030 (Hossain P et al. 2007)

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

Όσον αφορά τη διάγνωση, είναι εύκολη όταν υπάρχουν τα κλασικά συμπτώματα και αρκεί η επιβεβαίωση με τη μέτρηση του σακχάρου του αίματος (τιμή γλυκόζης σε οποιαδήποτε στιγμή  $> 200\text{mg/dl}$ ). Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος πραγματοποιείται το τεστ ανοχής γλυκόζης όπου λαμβάνονται, η τιμή της γλυκόζης νηστείας (που λαμβάνεται δηλαδή μετά από τουλάχιστον 8 ώρες αποχής από την πρόσληψη τροφής) και η τιμή της γλυκόζης 2 ώρες μετά τη χορήγηση 75g γλυκόζης από του στόματος.

Η θεραπεία του διαβήτη (δεν είναι μόνιμη) έγκειται στον έλεγχο των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα μέσω κατάλληλης διατροφής και χορήγησης ινσουλίνης. Ο συνηθέστερος τρόπος χορήγησης της ινσουλίνης είναι η υποδόρια χορήγηση. Ο τύπος ινσουλίνης, η δόση και η συχνότητα χορήγησης εξαρτώνται αποκλειστικά από τις ανάγκες του εκάστοτε ασθενούς. Για το λόγο αυτό, το σχήμα της ινσουλινοθεραπείας είναι απόλυτα εξατομικευμένο. Εκτός από την ινσουλίνη, υπάρχουν και άλλες φαρμακολογικές θεραπευτικές επιλογές, οι περισσότερες από τις οποίες είναι σε μορφή ταμπλέτας.

## **1.2 Ομοιοστασία της γλυκόζης**

Φυσιολογικά η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα κατά τις περιόδους νηστείας και μεταγευματικά διατηρείται σε στενό σχετικά εύρος ορίων μεταξύ 60-120 mg/dL. Η ομοιοστασία της γλυκόζης εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ και της χρησιμοποίησής της, τόσο από ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο λιπώδης και ο μυϊκός ιστός,

όσο και από μη ινσουλινοεξαρτώμενους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος και ο νεφρικός ιστός.

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

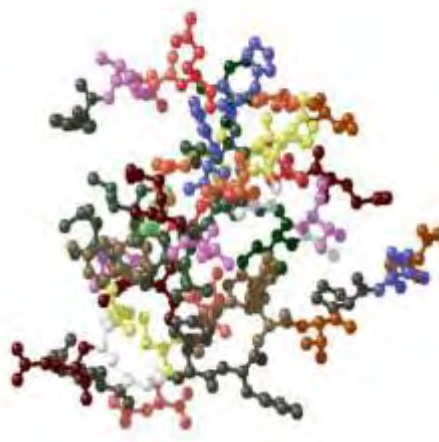
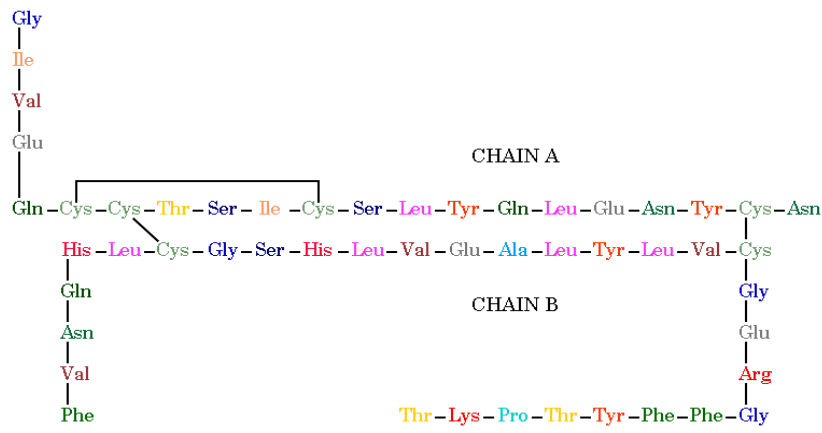
Η ομοιοστασία μεταξύ της παραγωγής και της κατανάλωσης της γλυκόζης επιτυγχάνεται μέσω τριών μηχανισμών:

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

### 1.3 Ινσουλίνη – Γλυκαγόνη

Η *ινσουλίνη* είναι η κύρια ορμόνη που ρυθμίζει το μεταβολισμό της γλυκόζης και δρα σαν αναβολική ορμόνη αλλά και σαν αυξητικός παράγοντας, ιδιαίτερα στην ενδομήτρια ζωή και στην πρώιμη νεογνική περίοδο. Παρόλο που οι ιστοί στόχοι της ινσουλίνης όσον αφορά στην ομοιοστασία της γλυκόζης είναι κυρίως ο ηπατικός, ο λιπώδης και ο μυϊκός, ωστόσο η ινσουλίνη παρεμβαίνει στην κυτταρική ανάπτυξη και μεταβολισμό των περισσότερων ιστών.

Παράγεται στα νησίδια Langerhans του παγκρέατος, συγκεκριμένα από τα β-κύτταρα, και εκκρίνεται απ' ευθείας στην κυκλοφορία του αίματος (ενδοκρινής ορμόνη). Αρχικά, παράγεται ένα πολυπεπτίδιο 11,5 kDa, η προ-προϊνσουλίνη, η οποία στο ενδοπλασματικό δίκτυο μετατρέπεται σε προ-ινσουλίνη (9 kDa). Στα κυστίδια του Golgi η προ-ινσουλίνη πέπτεται δίνοντας 2 μόρια: το πεπτίδιο C και την ώριμη πλέον, ενεργή, ινσουλίνη. Η ώριμη ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο περίπου 6 kDa, αποτελούμενη από 51 αμινοξέα, 21 αμινοξέα στην Α αλυσίδα και 30 στη Β. (**Εικόνα 3**)



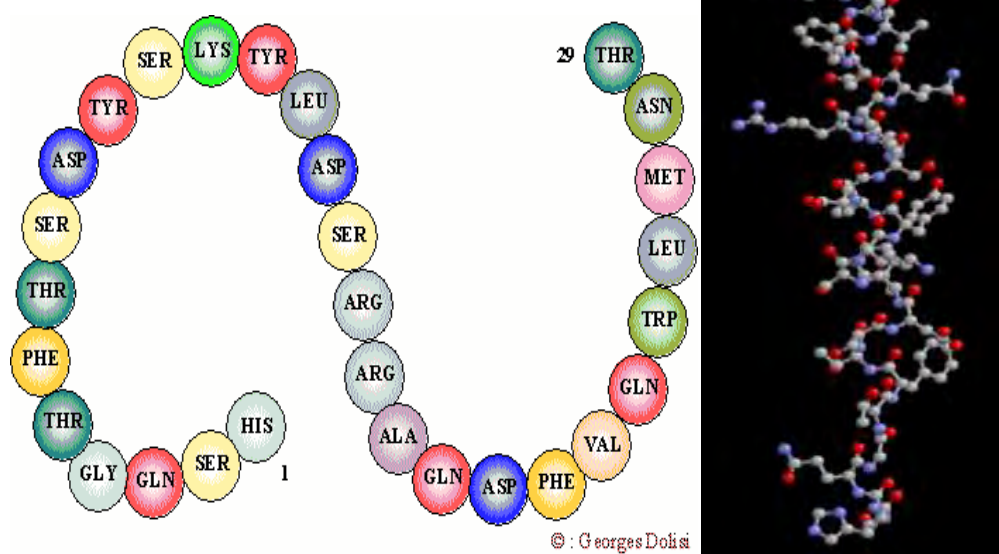
**Εικόνα 3:** Η ανθρώπινη ινσουλίνη

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

Η έκκριση της ινσουλίνης επηρεάζεται, κατ' αρχήν, από τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης (αλλά και την σύνθεση ινσουλίνης).

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

Η γλυκαγόνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Kimball το 1923. Εκκρίνεται από το πάγκρεας με σκοπό να αυξήσει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Παράγεται από τα α-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans, που βρίσκονται στην ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος. Προέρχεται από τη διάσπαση της προ-γλυκαγόνης. Η ώριμη γλυκαγόνη αποτελείται από 29 αμινοξέα, με μοριακό βάρος 3485 daltons. (**Εικόνα 4**)

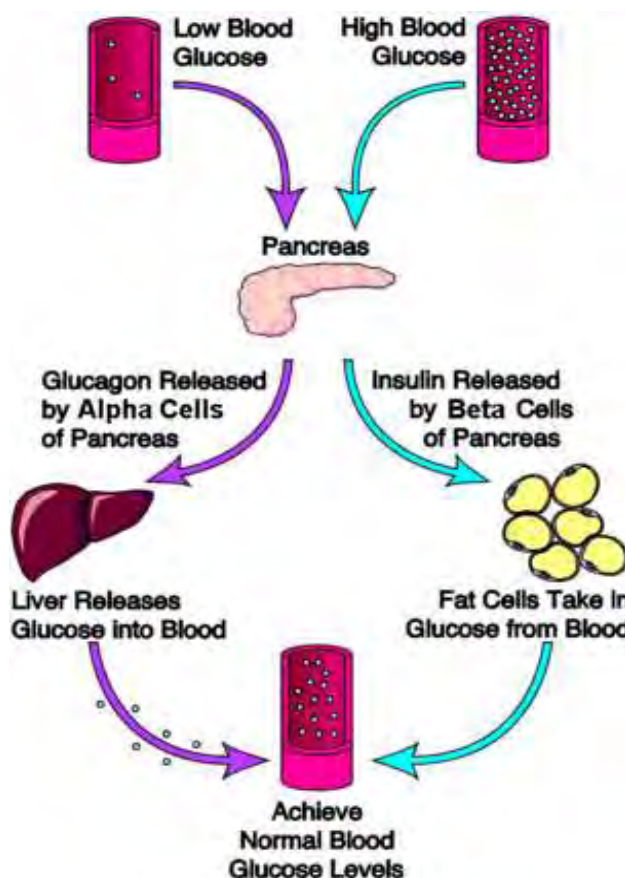


**Εικόνα 4:** Η δομή της γλυκαγόνης

Οι δύο αυτές ορμόνες (ινσουλίνη και γλυκαγόνη) έχουν αντίθετη δράση, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ρυθμιστική τους ικανότητα. Αποτελούν μέρος ενός συστήματος ανατροφοδότησης που κρατά τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα σε ένα σταθερό επίπεδο. Στην **Εικόνα 5** παρουσιάζεται ο γενικός μηχανισμός δράσης των εν λόγω ορμονών στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος.

Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα αυξηθούν πάνω από περίπου 5 mmol/L, τα β-κύτταρα του παγκρέατος διεγείρονται και εκκρίνουν ινσουλίνη με έναν αυξανόμενο ρυθμό αναλογικό με τη συγκέντρωση της γλυκόζης. Η

ινσουλίνη με τη σειρά της, διευκολύνει την πρόσληψη της γλυκόζης από τα περισσότερα κύτταρα του οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα. Το ήπαρ προσλαμβάνει τη γλυκόζη και την αποθηκεύει με τη μορφή του γλυκογόνου. Όταν το ήπαρ κορεσθεί σε γλυκογόνο, η γλυκόζη κατευθύνεται προς το λιπώδη ιστό για σύνθεση λιπαρών οξέων. Με τη δράση της ινσουλίνης, τα κύτταρα αυτά, όταν χρειάζονται ενέργεια, χρησιμοποιούν γλυκόζη αντί για λιπαρά οξέα με αποτέλεσμα τη συσσώρευση λίπους στον οργανισμό. Επίσης η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη αμινοξέων για το σχηματισμό πρωτεϊνών, ενώ η έλλειψή της (σε περιόδους νηστείας) οδηγεί σε κατανάλωση και αλλοίωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών.



**Εικόνα 5: Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα.** Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί στην απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Αυτή, στο ήπαρ, προκαλεί τη σύνθεση γλυκογόνου με επακόλουθο, τη μείωση της συγκέντρωσης σακχάρου

στο αίμα. Η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης από το πάγκρεας και προσλαμβάνεται από το ήπαρ. Εκεί η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης. Και οι δύο ορμόνες, στόχο έχουν να επαναφέρουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο φυσιολογικό.

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

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

## **1.4 Τύποι σακχαρώδους διαβήτη**

### **1.4.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (ινσουλινο-εξαρτώμενος, IDDM)**

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 θεωρείται μια χρόνια αυτοάνοση νόσος που χαρακτηρίζεται από καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος. Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ινσουλίνης, με αποτέλεσμα την ολική έλλειψη ή την ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης. Προσβάλλει νεαρά άτομα, ηλικίας κάτω των 30 ετών (γι' αυτό του αποδόθηκε ο όρος «νεανικός διαβήτης»), με κορύφωση των επιπτώσεων μεταξύ των 5 και 15 ετών.

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



Τα συμπτώματα του διαβήτη τύπου 1 συνήθως εμφανίζονται απότομα και εξελίσσονται γρήγορα, συχνά η πρώτη εκδήλωσή του μπορεί να είναι η ανάπτυξη διαβητικής κετοξέωσης, με ναυτία, εμετούς, διάχυτο κοιλιακό άλγος και απώλεια συνείδησης.

Πιστεύεται ότι προκαλείται από μη γενετικούς, περιβαλλοντικούς δηλαδή παράγοντες (ιογενείς, διαιτητικούς) σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα. Η ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη είναι συνήθως φυσιολογική, ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια. Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με διαβήτη τύπου 1 ανιχνεύονται στην κυκλοφορία ένα ή περισσότερα είδη αυτοαντισωμάτων, (οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν αυξημένη προδιάθεση και για άλλες αυτοάνοσες παθήσεις). Υπάρχει όμως και η μερίδα ασθενών με διαβήτη τύπου 1 στους οποίους δεν ανιχνεύονται αυτοαντισώματα. Ο τύπος αυτός ονομάζεται ιδιοπαθής σακχαρώδης διαβήτης. Οι ασθενείς είναι απόλυτα εξαρτημένοι από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης (ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης) προκειμένου τα επίπεδα σακχάρου του αίματος να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα. Έτσι απαιτείται η δια βίου χορήγηση ινσουλίνης.

#### **1.4.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 (μη ινσουλινο-εξαρτώμενος, NIDDM)**

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 προσβάλλει ενήλικες κυρίως άνω των 40 ετών, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Είναι ο πιο κοινός τύπος διαβήτη αντιστοιχώντας σε περισσότερο από το 90% των πασχόντων.

Σε αντίθεση με τον διαβήτη τύπου 1, στον οποίο η ινσουλίνη απουσιάζει παντελώς, ο διαβήτης τύπου 2 χαρακτηρίζεται από την παρουσία ινσουλίνης.

Στο διαβήτη τύπου 2, η ινσουλίνη η οποία παράγεται από το πάγκρεας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται το σάκχαρο σαν κύρια πηγή ενέργειας. Η αντίσταση στην ινσουλίνη χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα των ιστών να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη και τα επαγόμενα αποτελέσματα της δράσης της. Η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται –σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου 1- από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου 2



ονομάζεται και **"μη ινσουλινοεξαρτώμενος"** (NIDDM: Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus).

Στα πρώτα στάδια της νόσου, η ελαττωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη είναι η κύρια διαταραχή, ενώ τα επίπεδα ινσουλίνης στο αίμα είναι αυξημένα. Τα αίτια αυτής της μορφής είναι άγνωστα. Στην ανάπτυξη του όμως συμβάλλουν διάφοροι προδιαθεσικοί παράγοντες όπως η παχυσαρκία, η ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό, με σπουδαιότερο την παχυσαρκία. Η παχυσαρκία προδιαθέτει στην ανάπτυξη ινσουλινοαντοχής πιθανόν λόγω της παραγωγής από το λιπώδη ιστό ουσιών που ελαττώνουν την ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη. Επίσης, συνδέεται με την υπέρταση, την αυξημένη χοληστερόλη και το μεταβολικό σύνδρομο. Τα συμπτώματα εμφανίζονται σταδιακά και είναι πιο ήπια από αυτά του διαβήτη τύπου 1. Η πιθανότητα διαβητικής κετοξέωσης είναι μικρή, παρόλα αυτά ο κίνδυνος εμφάνισης επιπλοκών (νεφρική ανεπάρκεια, τύφλωση, στεφανιαία νόσο) παραμένει υψηλός. Αρκετά συχνά τα συμπτώματα λείπουν τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής. Το πρώτο βήμα στη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 είναι η αλλαγή του τρόπου ζωής του ασθενούς με στόχο την απώλεια βάρους, την αύξηση της σωματικής άσκησης και την υγιεινή διατροφή. Εάν κριθεί απαραίτητο χρησιμοποιούνται αντιδιαβητικά σκευάσματα και αν δεν επιτευχθεί ο έλεγχος των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, χρησιμοποιούνται ενέσεις ινσουλίνης.

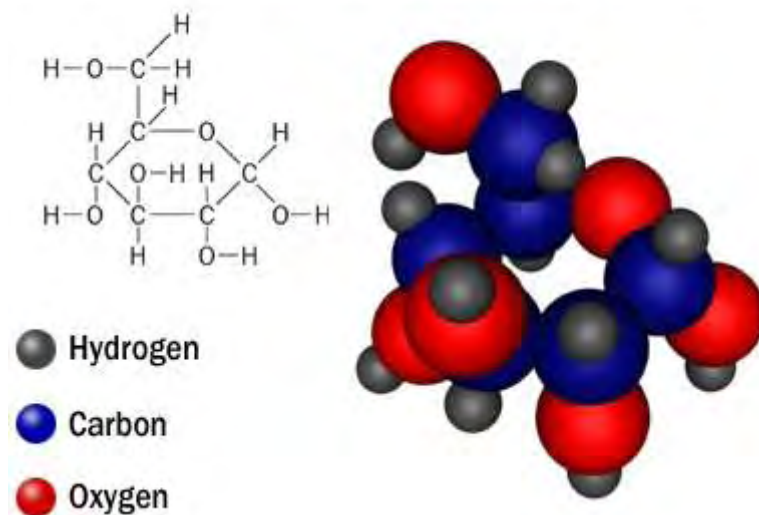
Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις, ωστόσο έχουν αρκετές ανεπιθύμητες παρενέργειες, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών αποδεικνύονται και ανεπαρκείς. Τα προβλήματα αυτά οδήγησαν στην διερεύνηση άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων, όπως για παράδειγμα ανταγωνιστές των υποδοχέων γλυκογόνου, αναστολείς της ηπατικής παραγωγής ινσουλίνης καθώς και συνδυαστικές θεραπείες (Morral 2003). Υπάρχει λοιπόν ένα σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων θεραπευτικών μέσων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και συνεπώς την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου [Oikonomakos *et al.*, 2001].

## 2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

### 2.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη ή δεξτρόζη, είναι το πιο γνωστό σάκχαρο. Πρόκειται για έναν μονοσακχαρίτη που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου (δομή αλδόζης) με γενικό τύπο  $C_6H_{12}O_6$  (**Εικόνα 6**). Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη. [Stryer, 2007]

#### Molecular Construction of Glucose



**Εικόνα 6: Δομή γλυκόζης** (συντακτική και τρισδιάστατη δομή)

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

Αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τους περισσότερους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς. Στα θηλαστικά, η γλυκόζη είναι το μοναδικό καύσιμο που χρησιμοποιεί ο εγκέφαλος σε συνθήκες επάρκειας τροφής και το μοναδικό καύσιμο που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ερυθροκύτταρα σε οποιαδήποτε περίπτωση. Έχει υπολογιστεί ότι, το 60% περίπου της ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης. Η συγκέντρωση της στο αίμα ποικίλλει από 80 έως 120 mg ανά 100 ml (4,4-6,7 mM). Το ήπαρ ανιχνεύει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα και ανάλογα απελευθερώνει ή προσλαμβάνει γλυκόζη [Stryer, 2007].

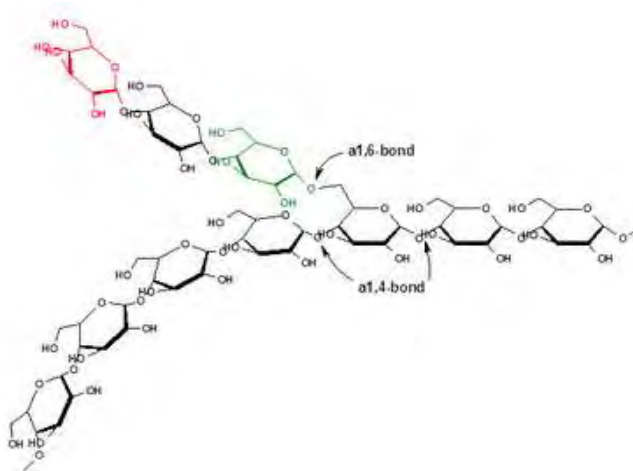
Συνηθέστερα όμως η γλυκόζη μετατρέπεται σε έναν πολυσακχαρίτη πολυσακχαρίτη, προκειμένου να αποθηκευτεί και να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, που στα φυτά είναι το άμυλο και στα θηλαστικά το γλυκογόνο.

Η ποσότητα της γλυκόζης που εισέρχεται στα ηπατικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωσή της και την ορμονική κατάσταση του οργανισμού. Βασικός συντελεστής για την χρησιμοποίηση της γλυκόζης είναι η ινσουλίνη. Ενώ το κεντρικό νευρικό σύστημα προσλαμβάνει την γλυκόζη με ρυθμό που δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωσή της στο αίμα αλλά ούτε και την παρουσία της ινσουλίνης, οι σκελετικοί μύες προσλαμβάνουν γλυκόζη μόνο με την βοήθεια της ινσουλίνης [McArdle *et al.*, 2000].

Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκονεογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη [Martin *et al.*, 1998]. Η μετέπειτα πορεία που θα ακολουθήσει η γλυκόζη εξαρτάται από την δράση των επιμέρους ενζύμων, την συσσώρευση τελικών προϊόντων που μπορεί να δρουν και σαν αναστολείς καθώς και τη διαιτητική κατάσταση του οργανισμού [McArdle *et al.*, 2000].

## 2.2 Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι η αποθηκεύσιμη μορφή της γλυκόζης στα ζωικά κύτταρα. Πρόκειται για ένα μεγάλο, διακλαδιζόμενο πολυμερές που αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης. Οι περισσότερες μονάδες της γλυκόζης στο γλυκογόνο είναι συνδεδεμένες με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4 και οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6, ανά 10 περίπου μόρια γλυκόζης (**Εικόνα 7**)



**Εικόνα 7: Δομή του γλυκογόνου**

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

Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζονται αντίρροπα από τον, ορμονικά διεγερόμενο, καταρράκτη της κυκλικής AMP (μονοφωσφορικής αδενοσίνης) ο οποίος δρα μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A. Αυτός ο

μηχανισμός ρύθμισης εμποδίζει την σύνθεση του γλυκογόνου ταυτόχρονα με την αποικοδόμηση του και επιτρέπει στον μεταβολισμό του γλυκογόνου να προσαρμόζεται στις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού [Stryer, 2007].

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. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. [Stryer, 2007]

### **2.2.1 Μεταβολισμός του γλυκογόνου**

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

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

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

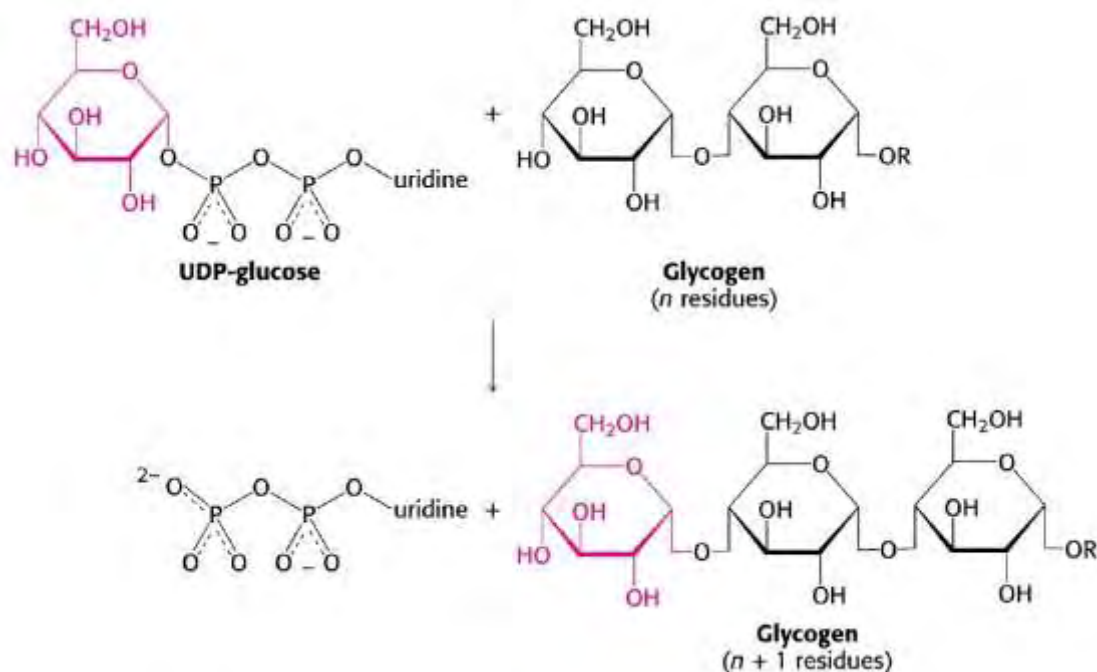
Η σύνθεση του γλυκογόνου χρειάζεται μια ενεργοποιημένη μορφή γλυκόζης, την ουριδινιφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη), η οποία παράγεται από την αντίδραση της UTP με 1-φωσφορική γλυκόζη. Η UDP-γλυκόζη προστίθεται στο μη αναγωγικό άκρο των μορίων γλυκογόνου, όπου τα μόρια θα πρέπει να ανακατασκευαστούν για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

Η ρύθμιση των διεργασιών αυτών είναι αρκετά πολύπλοκη και τα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου αποκρίνονται

αλλοστερικά σε μεταβολίτες που σηματοδοτούν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου [Stryer, 2007].

### Σύνθεση του γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου απαιτεί ένα μόριο εκκινητή, ένα εναρκτήριο μόριο (τουλάχιστον τεσσάρων καταλοίπων) πάνω στο οποίο προστίθενται αλυσίδες ολιγοσακχαριτών με την δράση της συνθάσης του γλυκογόνου (GS). Αυτή η εναρκτήρια λειτουργία εξασφαλίζεται από μια πρωτεΐνη (γλυκογονίνη) που περιλαμβάνει έναν ολιγοσακχαρίτη, αποτελούμενο από α-1,4-γλυκόζες, συνδεδεμένο με το φαινολικό άτομο οξυγόνου ενός καταλοίπου τυροσίνης. Αυτός είναι ο λόγος που πάντα όταν απομονώνεται γλυκογόνο, περιέχει και πρωτεΐνες. Η αντίδραση της σύνθεσης του γλυκογόνου καταλύεται από τη GS σύμφωνα με την **Εικόνα 8**:



**Εικόνα 8: Σύνθεση του γλυκογόνου**

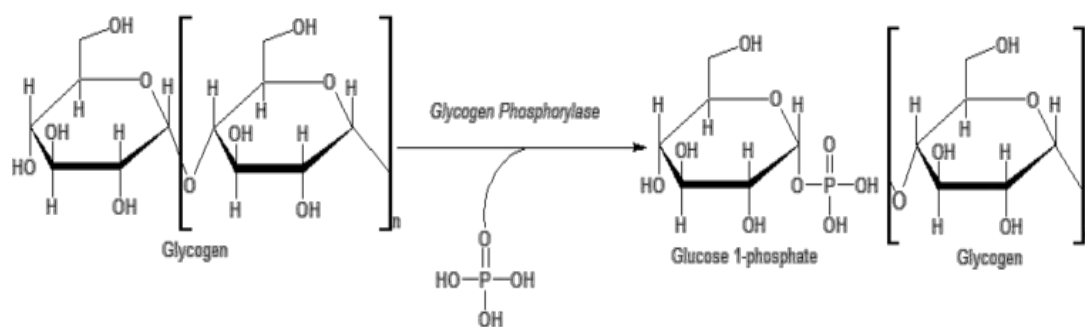
Η GS καταλύει τη μεταφορά της ενεργοποιημένης γλυκοζυλικής μονάδας από την UDP (ουριδινοφωσφορική) γλυκόζη στο υδροξύλιο του C-4 ενός άκρου του γλυκογόνου προς τον σχηματισμό ενός γλυκοζιτικού δεσμού α-1,4. Κατά

την επιμήκυνση, η UDP αντικαθίσταται από την τελική υδροξυλική ομάδα του αυξανόμενου μορίου του γλυκογόνου. [Stryer, 2007]

### Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

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

Το κύριο ένζυμο στη διαδικασία της αποικοδόμησης του γλυκογόνου είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP). Η GP διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού ιόντος αναφέρεται ως φωσφορόλυση. Η αντίδραση που πραγματοποιείται φαίνεται στην **Εικόνα 9**:



**Εικόνα 9: Αποικοδόμηση του γλυκογόνου**

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται. [Stryer, 2007]

Όμως η GP μπορεί να φέρει εις πέρας την πορεία αυτή από μόνη της μόνο σε περιορισμένη έκταση. Συγκεκριμένα η GP σταματά τη διάσπαση των δεσμών α-1,4 όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο διακλάδωσης, και αυτό γιατί η GP δεν μπορεί να διασπάσει τους δεσμούς α-1,6 των διακλαδώσεων. Για το σκοπό αυτό, συμμετέχουν και δύο άλλα ένζυμα: μια μεταφοράση και μια γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6. Η μεταφοράση μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη, αφήνοντας εκτεθειμένο ένα μόνο κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6. Η γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6, γνωστή και ως ένζυμο αποδιακλάδωσης, υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης.

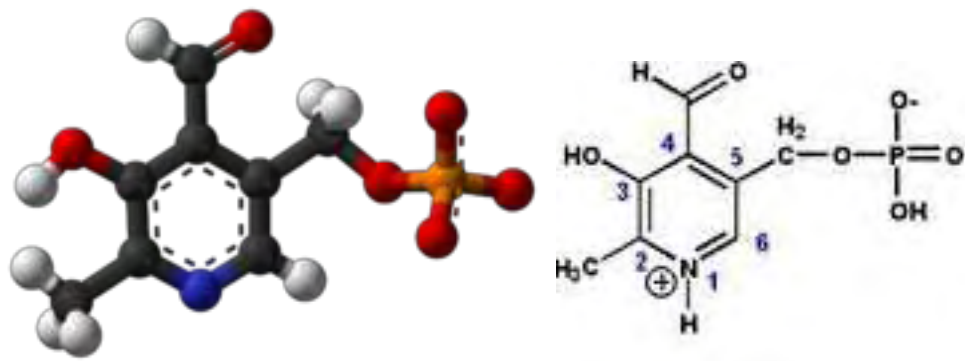
Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6. Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη. [Stryer, 2007]

## **2.3 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP)**

### **2.3.1 Γενικά**

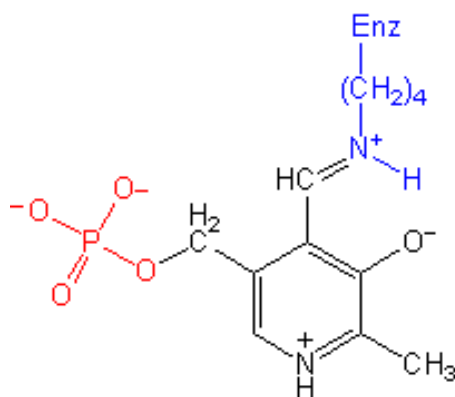
Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP, φωσφορική-5-πυριδοξάλη, P5P) είναι μια προσθετική ομάδα ορισμένων ενζύμων. Είναι η δραστική μορφή της βιταμίνης B6, η οποία αποτελείται από τρεις φυσικές οργανικές ενώσεις, πυριδοξάλη, πυριδοξίνη και την πυριδοξαμίνη (**Εικόνα 10**).





**Εικόνα 10: Τρισδιάστατη και συντακτική δομή της PLP**

Η PLP δρα ως συνένζυμο σε όλες τις αντιδράσεις τρανσαμίνωσης, και σε ορισμένες αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης και απαμίνωσης των αμινοξέων. Η αλδεϋδική ομάδα του PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με την ε-αμινομάδα μιας συγκεκριμένης πλευρικής αλυσίδας λυσίνης στο εκάστοτε ένζυμο (**Εικόνα 11**).



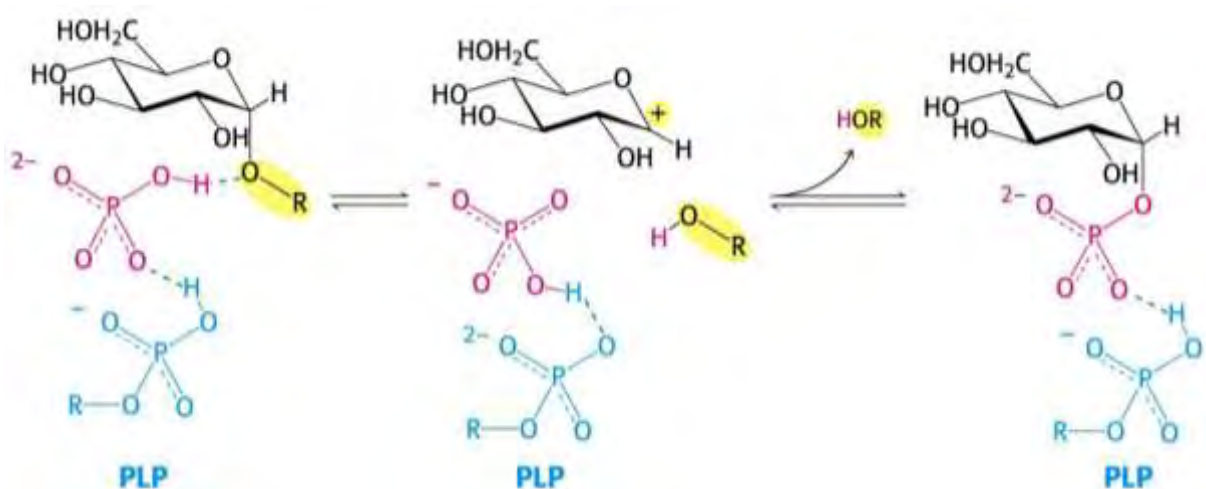
**Εικόνα 11: Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.**

Επιπλέον, η PLP χρησιμοποιείται από αμινοτρανσφεράσες (ή τρανσαμινάσες) που δρουν σε ασυνήθιστα σάκχαρα, όπως η περοζαμίνη. Σε αυτές τις αντιδράσεις, η PLP αντιδρά με το γλουταμινικό οξύ. Είναι επίσης ενεργή στην αντίδραση συμπύκνωσης κατά τη σύνθεση της αίμης. Τέλος, η PLP παίζει ρόλο στη μετατροπή της ντόπα σε ντοπαμίνη, επιτρέπει τη μετατροπή του διεγερτικού νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό στον ανασταλτικό

νευροδιαβιβαστή GABA, και επιτρέπει στο SAM να αποκαρβοξυλιωθεί ώστε να σχηματιστεί προπυλαμίνη, πρόδρομο μόριο των πολυαμινών.

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

Η φωσφορυλάση θα πρέπει να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά ώστε να εξοικονομήσει το ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο. Υπάρχουν δύο βασικές ενδείξεις που μας παρέχουν πληροφορίες γύρω από τον μηχανισμό με τον οποίο η φωσφορυλάση επιτυγχάνει αυτόν τον αποκλεισμό. Πρώτον, τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1( ο χαρακτηρισμός α σημαίνει ότι το άτομο οξυγόνου που συνδέεται με τον C-1 είναι κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη (**Εικόνα 12**).



## **Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.**

*Μια προσδεμένη ομάδα  $\text{HPO}_4^{2-}$  (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζυτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται από τη μεταφορά ενός πρωτονίου από τη πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης.*

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP). Δομικές μελέτες έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης [Stryer, 2007].

## **2.4 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου**

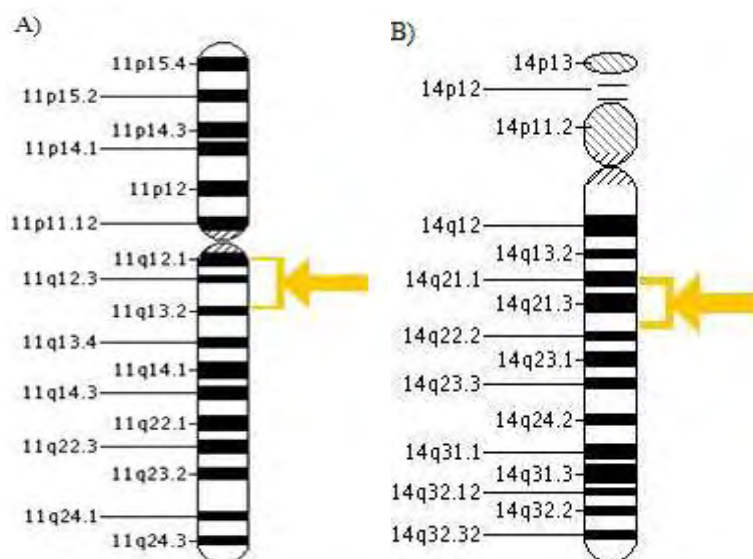
### **2.4.1 Γενικά**

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

βοήθεια του Arda Green, το ζευγάρι έδειξε πως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπάρχει σε δύο μορφές, την α και τη β, που εξαρτώνται από τη φωσφορυλίωση του ενζύμου, καθώς και στις καταστάσεις R και T που βασίζονται στην παρουσία του AMP.

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. [Stryer, 2007]

Το γονίδιο της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου εντοπίζεται στο **11q12-q13.2**, της ηπατικής στο **14q11.2-q24.3**, και του εγκεφάλου στο **20p11.2-11.1**. (Εικόνα 13)



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

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

### 2.4.2 Δομή

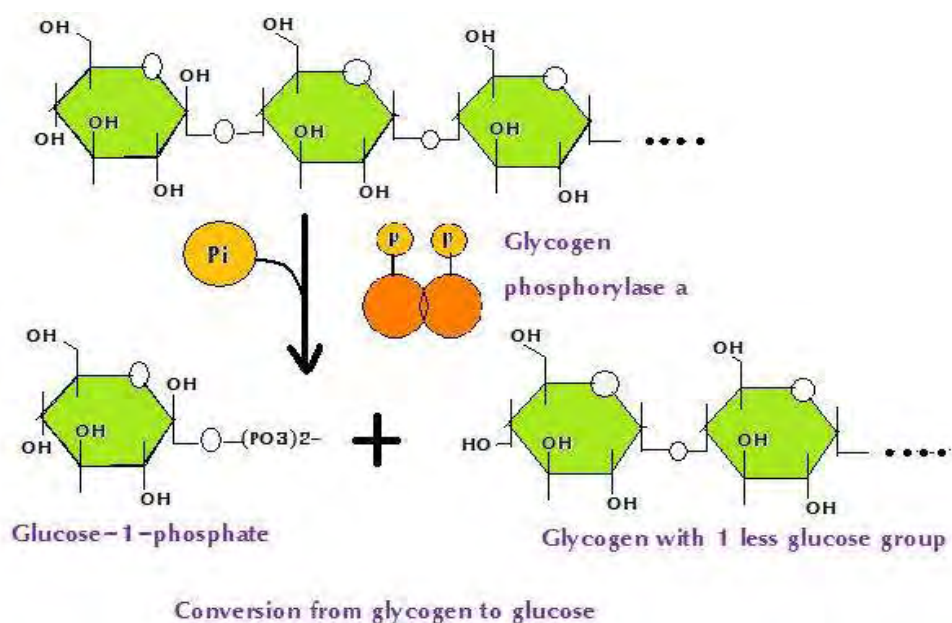
Δομικά η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97.434kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα.

Κάθε υπομονάδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε μια αμινο-τελική δομική περιοχή (480 αα) που περιέχει μια θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου και μια καρβοξυ-τελική δομική περιοχή (360 αα). Το καταλυτικό κέντρο εντοπίζεται σε μια βαθιά σχισμή που σχηματίζεται με κατάλοιπα από τις αμινο- και καρβοξυ-τελικές περιοχές. [Stryer, 2007] Συνεπώς, κάθε υπομονάδα αποτελείται από χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, αλλοστερικές περιοχές και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

### 2.4.3 Μηχανισμός δράσης

Η φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη η οποία λαμβάνει χώρα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (**Εικόνα 14**). Εκεί, τα υποστρώματα γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν έρχονται σε γεινίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H<sub>2</sub>O. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της

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



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

#### 2.4.4 Ρύθμιση

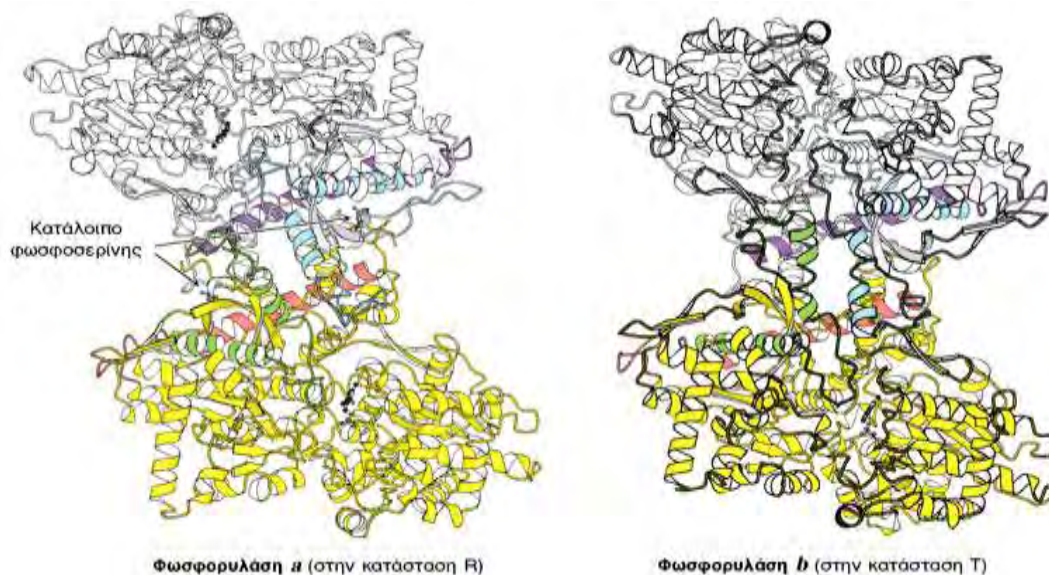
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ρυθμίζεται με διάφορους αλλοστερικούς τελεστές οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, όπως επίσης με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση, ως απόκριση σε ορμονικά σήματα όπως της ινσουλίνης, της γλυκαγόνης και της επινεφρίνης.

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργή φωσφορυλάση α και

μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση β. Η φωσφορυλάση α και η φωσφορυλάση β διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση ρυθμίζοντας φυσιολογικά τη δραστικότητα της GP. [Stryer, 2007] Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP<sub>α</sub> (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G,(PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP<sub>β</sub> (μη φωσφορυλιωμένη GP). [Rath et al.2000]

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Έτσι, κάθε μια από τις δύο μορφές της (α και β) βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση α ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση β ευνοεί την κατάσταση T (**Εικόνα 15**). Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση β) στην κατάσταση R (αντιπροσωπεύεται από την φωσφορυλάση α) συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α- έλικες, οι οποίες μετακινούν ένα βρόχο 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 δέσμησης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη. [Stryer, 2007]

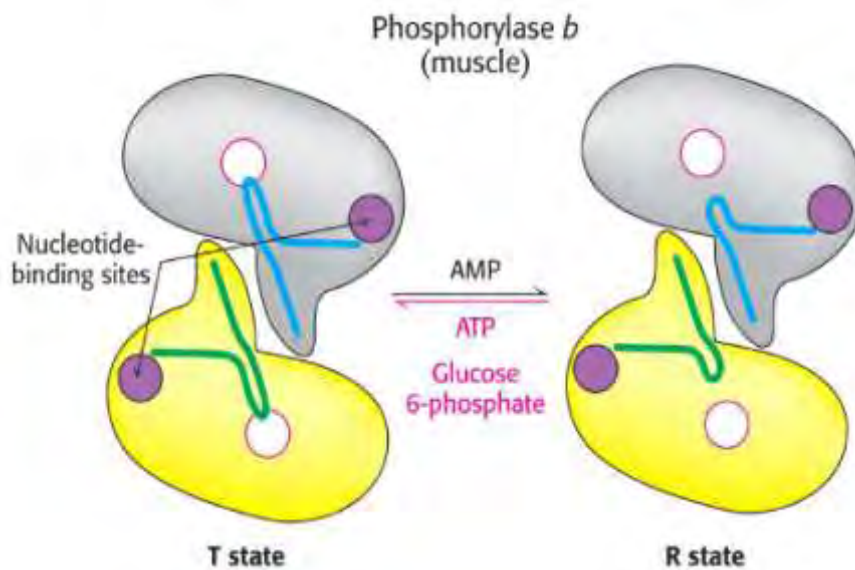




**Εικόνα 15: Δομή της φωσφορυλάσης α και β.** Η φωσφορυλάση β φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο Ser14 κάθε υπομονάδας. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη δομή της περισσότερο ενεργής R διαμόρφωσης. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση β δεν είναι φωσφορυλιωμένη και υπάρχει κυρίως στην T διαμόρφωση. (Stryer, 2007)

Η μυϊκή φωσφορυλάση β είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση β είναι ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα η φωσφορυλάση α είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP, του ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης (**Εικόνα 16**). Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μυς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια. [Stryer, 2007]



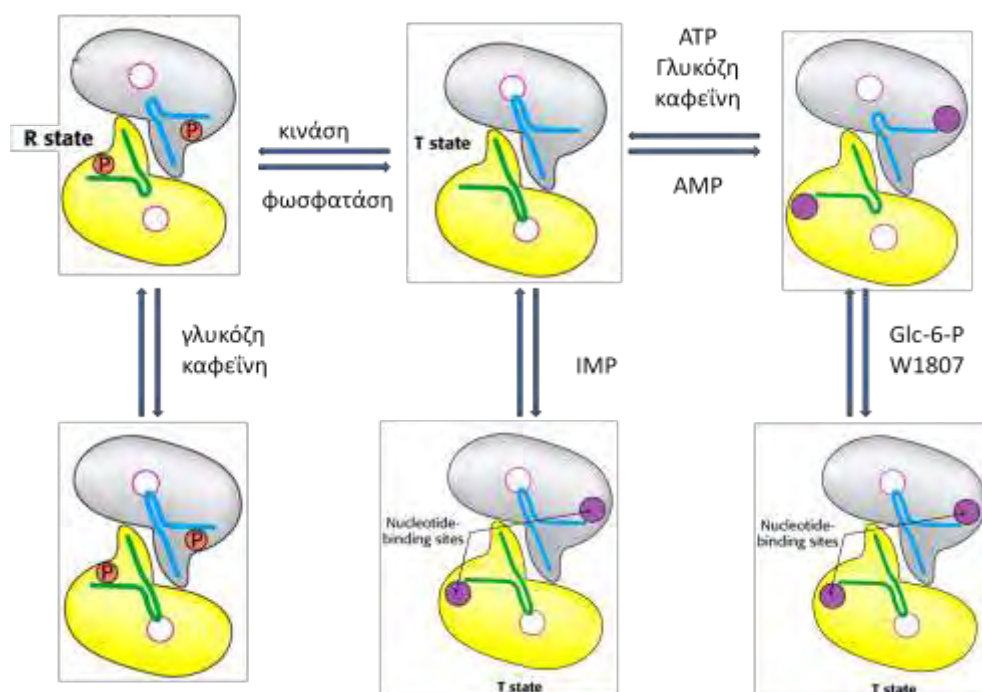


**Εικόνα 16: Αλλοστερική ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης:** Ένα χαμηλό ενεργειακό φορτίο που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP, ευνοεί την μετάβαση στη μορφή R

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

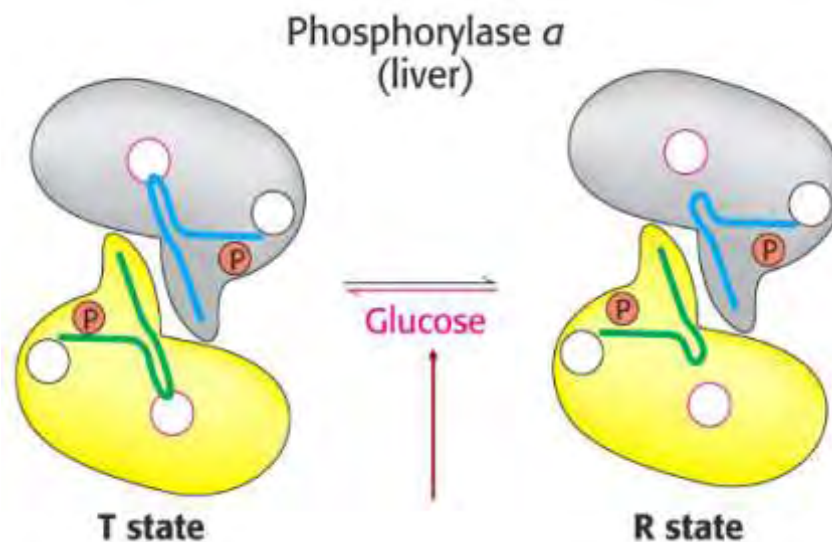
μπορούν in vitro να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  και  $\text{Mg}^{2+}$ . Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P. (Εικόνα 17).



**Εικόνα 17: Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης**

Η ρύθμιση της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοίωση της γλυκόζης για τον οργανισμό ως συνόλου. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση α αλλά όχι η β παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης α από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο (Εικόνα 18). Και αυτό γιατί ο ρόλος της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι η παραγωγή γλυκόζης για εξαγωγή σε άλλους ιστούς, συνεπώς όταν η ελεύθερη γλυκόζη προέρχεται από άλλες πηγές, όπως η διατροφή, δεν υπάρχει ανάγκη κινητοποίησης του

ενζύμου. Σε αντίθεση με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από την AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. [Stryer, 2007]



**Εικόνα 18: Αλλοστερική ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης:** Η πρόσδεση της γλυκόζης στη φωσφορυλάση  $\alpha$  μετατοπίζει την ισορροπία προς την κατάσταση T και απενεργοποιεί το ένζυμο. Έτσι το γλυκογόνο δεν κινητοποιείται όταν η γλυκόζη είναι ήδη σε αφθονία

#### 2.4.5 Κρυσταλλική δομή και κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Οι κρυσταλλικές δομές της GP $\alpha$  και της GP $\beta$  (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 από τους Barford και Johnson (Barford & Johnson, 1989). Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά νερού (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Κι αυτό συμβαίνει γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους [Barford & Johnson, 1989].

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου μπορεί να χωριστεί σε δυο διακριτές περιοχές, την 1 και την 2. Η περιοχή 1 ονομάζεται ρυθμιστική και αποτελείται από τα αμινοξέα 10-484. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο φωσφορύλιωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα καθώς και ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή 2 ονομάζεται καταλυτική και αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην περιοχή αυτή βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου περιέχει 6 κέντρα σύνδεσης:

#### A) Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14

Το κέντρο αυτό είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή α στη μορφή β. Εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων. Κεντρικό ρόλο έχει η Ser 14, η οποία φωσφορυλιώνεται και οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο του ενζύμου. Στην GPb, αυτά τα αμινοξέα είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στη GPa έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των δύο υπομονάδων. [Stryer, 2007]

#### B) Το αλλοστερικό κέντρο

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

- Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
- Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων ριβόζης

- Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων πουρίνης

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο, είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, G1P, Pi,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP, όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

### Γ) Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από την σύνδεση των υποστρωμάτων (Glc-1-P, Pi) και αναλόγων τους. Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε μια απόσταση 15 Å από την επιφάνεια. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση επιτυγχάνεται μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται από τον βρόχο αμινοξικής αλληλουχίας 282-285. Κατά τη μετάπτωση από T σε R, ο βρόχος 282-285 εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από τη βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 οδηγεί στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

### Δ) Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε μια σχισμή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν

διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας. Το αποθηκευτικό κέντρο λειτουργεί και ως κέντρο ρύθμισης, μιας και η κατάληψη του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

#### E) Το κέντρο αναστολής

Πρόκειται για ένα υδροφοβικό κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου, σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (13-484 αα), καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (485-842 αα). Στην T διαμόρφωση, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού, που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχθεί ότι: πουρίνες όπως η αδενίνη, νουκλεοσίδια όπως η αδενοσίνη και η ινοσίνη, φωσφονουκλεοτίδια όπως το AMP, το IMP και το ATP, το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σωμάτια, συνδέονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GP<sub>a</sub> και GP<sub>b</sub>, όχι όμως και στη ηπατική GP<sub>a</sub>, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

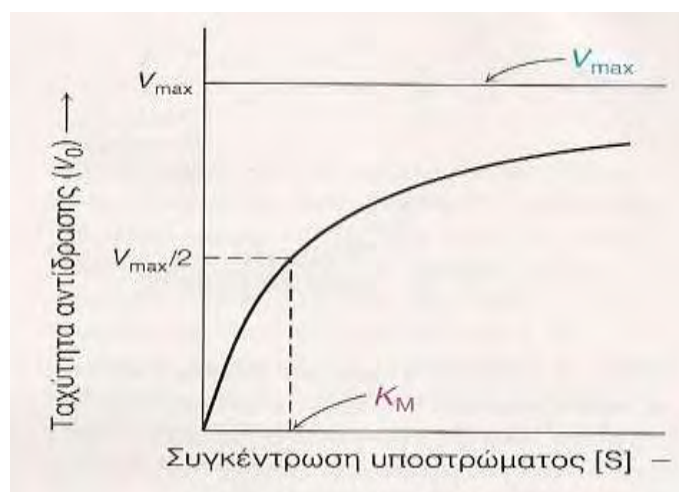
Στην T διαμόρφωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η Phe285 του βρόχου 280 εντοπίζεται κοντά στη Tyr613 από την έλικα α-19, και μαζί αυτά τα δύο υδρόφοβα μόρια, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η σύνδεση στο κέντρο αυτό, έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου και συγχρόνως την φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. [Oikonomakos *et al.*, 1992]

#### ΣΤ) Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GP<sub>b</sub>. [Oikonomakos *et al.*, 2002]

## 2.5 Κινητική ενζύμων και ενζυμική αναστολή

Η πρωταρχική λειτουργία των ενζύμων είναι να αυξάνουν τις ταχύτητες των αντιδράσεων έτσι ώστε να είναι συμβατές με τις ανάγκες του οργανισμού. Για πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης  $V_0$ , η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο, μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος,  $[S]$ , με τον τρόπο που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 19**. Η ταχύτητα της κατάλυσης αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος και στη συνέχεια αρχίζει να σταθεροποιείται και να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος. [Stryer, 2007]



**Εικόνα 19: Κινητική Michaelis-Menten.** Ένα διάγραμμα της ταχύτητας ( $V_0$ ) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis-Menten δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα ( $V_{max}$ ) προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά Michaelis ( $K_m$ ) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με  $V_{max}/2$ .

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



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

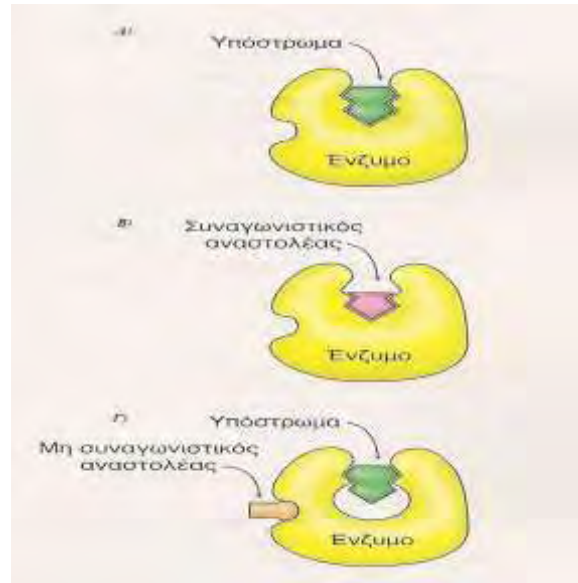
$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{ή} \quad K_M = \frac{[E] + [S]}{[ES]}$$

Η σταθερά Michaelis-Menten ( $K_m$ , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης ( $V_{max}$ ). [Stryer, 2007] Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος ( $\alpha$ -D- Glc-1-P).

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

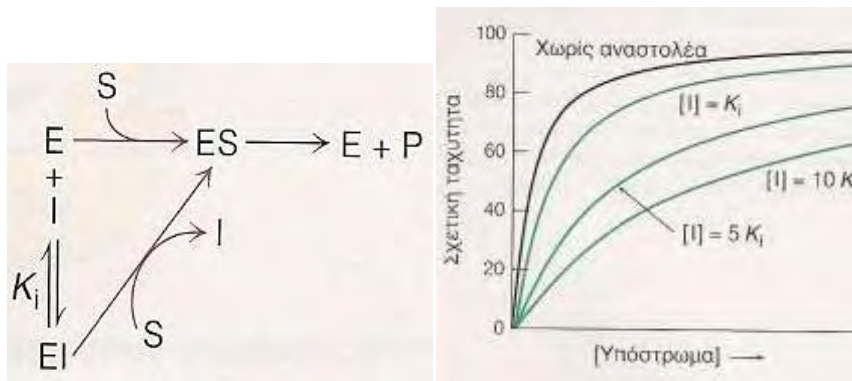
Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, καθώς συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά, με αποτέλεσμα να αδρανοποιείται, σχεδόν πάντα, οριστικά. Σε αντίθεση, η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





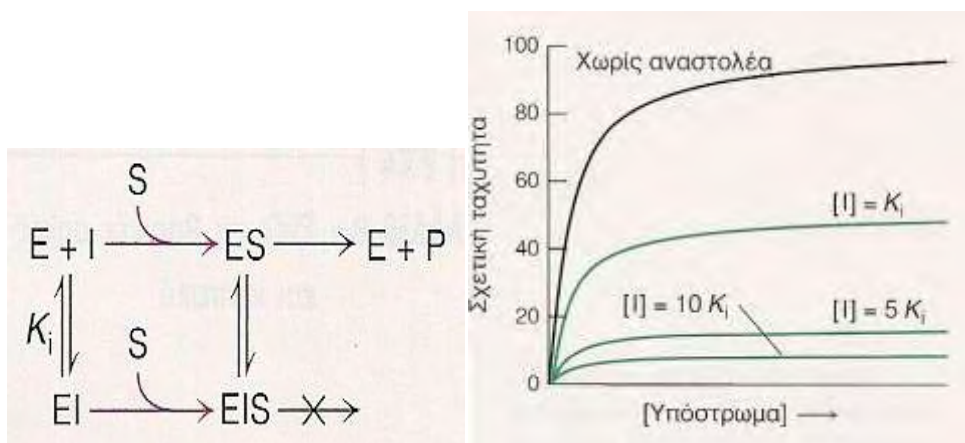
**Εικόνα 20: Διάκριση μεταξύ ενός συναγωνιστικού και ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα.** Α) Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος απουσία αναστολέα. Β) Συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το υπόστρωμα δεν συνδέεται. Γ) Μη συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται σε σημείο διαφορετικό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

Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο (E) μπορεί να προσδένει το υπόστρωμα (ES) ή τον αναστολέα (EI), αλλά όχι και τα δύο μαζί (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η πρόσδεση του υποστρώματος (**Εικόνα 21**). Δηλαδή, ο συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα σε ένα υπόστρωμα. Καθώς λοιπόν ο αναστολέας συναγωνίζεται το υπόστρωμα για πρόσδεση στο ενεργό κέντρο, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί αυξάνοντας τη συγκέντρωση του υποστρώματος. [Stryer, 2007]



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

Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδεθούν ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου (ESI) σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης. Ο μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα (**Εικόνα 22**) Συνεπώς, η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. [Stryer, 2007]



**Εικόνα 22: Κινητική ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα.** Η πορεία της αντίδρασης δείχνει ότι ο αναστολέας προσδένεται και στο ελεύθερο ένζυμο και στο

σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Συνεπώς, η ταχύτητα δεν μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή  $V_{max}$ , ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος.

## **2.6 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων**

Βιολογικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II καθώς είναι ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Οι σημερινές προληπτικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του ΣΔ2, δεν επιτυγχάνουν ικανοποιητικό έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, γι' αυτό το λόγο, υπάρχει ένα συνεχές ενδιαφέρον τόσο από την ακαδημαϊκή κοινότητα όσο και από τις φαρμακοβιομηχανίες για την ανάπτυξη και παραγωγή νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων (Somsak *et al*, 2008).

Μια μοριακή προσέγγιση στοχεύει στην μείωση παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ με αναστολή της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP). Καθώς η GP είναι ένα ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση της γλυκόζης, χρησιμοποιείται ως στόχος για την παρασκευή αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos, 2002].

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

Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP του οργανισμού (ηπατικής, μυϊκής, του εγκεφάλου), μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση

μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ. [Οικονομακος et al., 2008]

## 2.7 Vinsanto

Το Vinsanto (Vin Santo=άγιο κρασί) είναι ένα επιδόρπιο κρασί. Υπάρχουν πολλές θεωρίες για την προέλευση του ονόματος του. Οι δύο επικρατέστερες απόψεις είναι ότι πήρε το όνομά του από τη χρήση και σύνδεση του με το μυστήριο της Θείας Ευχαριστίας, ενώ η άλλη ότι υποδηλώνει την προέλευση του κρασιού (Ιταλικά *vino di Santorini*: "οίνος από την Σαντορίνη").

Ο τρύγος γίνεται γύρω στα μέσα Σεπτεμβρίου και αρχικά γίνεται λιάσιμο (έκθεση στον ήλιο) των σταφυλιών για μερικές - δέκα με δεκαπέντε - ημέρες. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε απώλεια νερού και αύξηση της περιεκτικότητας σε σάκχαρα. Το πάτημα των σταφυλιών γίνεται με μάγγανα. Ο μούστος που προκύπτει, οδηγείται σε ξύλινα βαρέλια, για να ακολουθήσει η διαδικασία της ζύμωσης για τουλάχιστον τέσσερις μήνες. Στην συνέχεια αφήνεται να ωριμάσει τουλάχιστον για δύο χρόνια μέσα σε δρύινα βαρέλια. Σύμφωνα με την νομοθεσία, τα σταφύλια πρέπει κατά να είναι τουλάχιστον κατά 51% της ποικιλίας Ασύρτικο, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό θα πρέπει να είναι σταφύλια των ποικιλιών Αηδάνι και Αθήρι. Το κρασί που προκύπτει είναι γλυκό με σκούρο μπρούτζινο χρώμα (**Εικόνα 23**).

Το κρασί βινσάντο θεωρείται συνεχιστής των *πάσσων*, όπως ονομάζονταν στην αρχαιότητα οι λιαστοί οίνοι, για τους οποίους φημίζονταν τα νησιά του Αιγαίου.



**Εικόνα 23: Κρασί Vinsanto**

### **3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

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

Για την απομόνωση της φωσφορυλάσης β 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
- Όξινο ανθρακικό κάλιο, MB. 100.12
- 2-μερκαπτο-αιθανόλη, MB. 78.3
- EDTA, MB. 372.24
- Οξικό οξύ 99-100%, MB. 60.05
- β-γλυκερινοφωσφορικό νάτριο 0.005M, MB. 306.12
- 5'-φωσφορική αδενοσίνη, MB. 367.2

- Τρίς- (υδροξυμεθυλο)- αμινομεθένιο, MB. 121.1
- Οξικό μαγνήσιο, MB. 214.46
- Θειικό αμμώνιο, MB. 132.14
- C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> - Γλυκερόλη 100%
- Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης. Πριν από τη χρήση τους υφίστανται κατεργασία με 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και 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 θειικού αμμωνίου κορεσμού 90% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρεις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα οξικού μαγνησίου 1.0M ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg)

#### ✓ Όργανα

- Φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο
- Πεχάμετρο
- Αναλυτικός ζυγός
- Χρονόμετρο

- Φασματοφωτόμετρο
- Αντλία κενού Buchner
- Συσκευή Vortex
- Χειροκίνητη κρεατομηχανή

## Διαδικασία

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

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

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

Στη συνέχεια, ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH<sub>3</sub>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 KHCO<sub>3</sub>.

### Βήμα 3<sup>ο</sup>: Καταβύθιση του ενζύμου με θειϊκό αμμώνιο

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, για συλλογή του ιζήματος. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl 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. Το υπερκείμενο διάλυμα 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 στη συνέχεια ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου όπου προστίθεται διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το διάλυμα 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 μετουσίωση.*

### 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 β του γλυκογόνου. Ακολούθως, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος (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:  $C_{\text{ενζύμου}} = \text{OD}_{280} / 1,32$ .

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

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

### **3.2.1 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 ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1  $\mu\text{mol}$  υποστρώματος (ή παρασκευή 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 ( $\text{P}_i$ ) 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 αραιώσης ένζυμου β-GP 2,5 mM, β-Merc 2,5 mM, EDTA 0,05mM

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

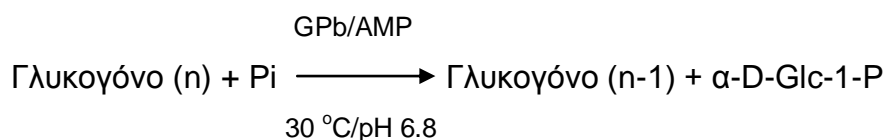
Στη συνέχεια, το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C για 15 λεπτά. Μετά την επώαση, προστίθενται 180μL από το ενζυμικό μείγμα στον σωλήνα του υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες: 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 %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

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

### 3.2.2 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (Km)

Η σταθερά Michaelis-Menten ( $K_m$ , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης ( $V_{max}$ ). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος ( $\alpha$ -D- Glc-1-P).

Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου  $\beta$  (GPb) βασίζεται στην ακόλουθη αντίδραση:



Στην αντίδραση αυτή η λιγότερο ενεργή μορφή του ενζύμου (T διαμόρφωση), μετά από ενεργοποίηση με AMP, δρα αντίστροφα, προς σχηματισμό γλυκογόνου, παρουσία G-1-P ( $\alpha$ -D-1-φωσφορικής γλυκόζης), και ελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi). Η καταλυόμενη αντίδραση σε συνθήκες κορεσμού σε AMP 1.0 mM και γλυκογόνο 0.2 % w/v, ακολουθεί μία κινητική κατά Michaelis-Menten, σύμφωνα με την οποία η καμπύλη της ταχύτητας ως προς το υπόστρωμα, την 1-φωσφορική γλυκόζη, αποτελεί τμήμα υπερβολής. Σε μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση του υποστρώματος όσο και την ποσότητα του ενζύμου. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, όπου επέρχεται κορεσμός, η ταχύτητα εξαρτάται αποκλειστικά από την ποσότητα του ενζύμου στο μίγμα της αντίδρασης.

#### Διαδικασία:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου/mL, γλυκογόνο 1% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου 5% (v/v). Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων  $\alpha$ -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, και 4 λεπτών) 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
- Συσσκευή vortex
- pHμετρο
- Χρονόμετρο

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

Το ένζυμο φυλάσσεται σε εναιώρημα γλυκερόλης στους -20 °C. Από αυτό το εναιώρημα παίρνουμε 10  $\mu$ L και το αραιώνουμε σε 1 mL ρυθμιστικού

διαλύματος 50:50:1. Το διάλυμα φωτομετρείται στα 280 nm για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενζύμου, με χρήση κυψελίδας χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm.

Στη συνέχεια, σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα. Περιέχει το ένζυμο σε συγκέντρωση 25 μg/mL, γλυκογόνο 1% (w/v), ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου και νερό. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα με την προσθήκη του διαλύματος υποστρώματος γίνεται σε καθορισμένες συνθήκες: 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2% w/v γλυκογόνο, σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος α-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 αραίωση 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 αραίωση 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  $-20^{\circ}\text{C}$  για να αποφευχθεί υδρόλυση της Glc-1-P.

#### Διαδικασία

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

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
$\alpha\text{-D-Glc-1-P}$	200 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$
AMP (50mM)	18 $\mu\text{L}$	18 $\mu\text{L}$
Αναστολέας	-	X $\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$	502 $\mu\text{L}$	720-(200+18+X) $\mu\text{L}$
Τελικός όγκος	720 $\mu\text{L}$	720 $\mu\text{L}$

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

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

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

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

Στη συνέχεια ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit, προκειμένου να προσδιοριστεί η  $\text{IC}_{50}$ .

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

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

Οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που μελετήθηκαν ήταν:

- 0,005 mg/mL
- 0,006 mg/mL



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

### **3.5 Παρασκευή τυφλών**

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

- Τυφλό νερού για την ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με την συγκέντρωση της  $\alpha$ -D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται στην  $IC_{50}$  ή με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της G1P στην περίπτωση της Km, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της
- Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών
- Τυφλό διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε  $\mu\text{mol Pi}$ .

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

### **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 'simple weighting'). Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων είναι η εξής:

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

όπου k: είναι η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης

t: ο χρόνος της αντίδρασης

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

Οι αρχικές ταχύτητες που προκύπτουν από την παραπάνω εξίσωση επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων (ετεροσκεδαστικότητα 'explicit weighting'). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους  $V_{\max}$  και  $K_m$

και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ ) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten με την προϋπόθεση σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος :

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



όπου  $v$  : Η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης.

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

$[S]$ : Η συγκέντρωση του υποστρώματος

$E$ : Το ένζυμο

$S$ : Το υπόστρωμα

$ES$ : Το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος

$P$ : Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης

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

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

$$\% \text{αναστολή} = \frac{S.a_{\text{control}} - S.a_i}{S.a_{\text{control}}} \times 100\%$$

όπου:  $s.a_{\text{control}}$  : η ειδική 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 **%αναστολή=f([I])**. Από την τιμή της  $IC_{50}$  προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής  $K_i$  που αποτελεί όπως και η  $K_m$  έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

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

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

### **3.8 Ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων της Grb**

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

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

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

✓ Υλικά

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

✓ Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο UV

### Διαδικασία

Για την ανάπτυξη τετραγωνικών κρυστάλλων (ομάδας συμμετρίας χώρου P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2) της GP χρησιμοποιείται η στατική μέθοδος (batch method). Το ένζυμο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από AMP ( $A_{260}/A_{280} = 0.53-0.54$ ). Η μέθοδος batch αποτελεί κλασική μέθοδο κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και στηρίζεται στην

προσθήκη του διαλύματος καταβύθισης μαζί με το διάλυμα της πρωτεΐνης, δημιουργώντας κατάσταση υψηλού κορεσμού, όπου σταδιακά αναπτύσσονται κρύσταλλοι. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρεται σε μικρούς σωλήνες μήκους περίπου 3 cm και εσωτερικής διαμέτρου 2-3 mm, των οποίων τα δύο άκρα κλείνονται με parafilm.

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

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

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

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Αποτελέσματα απομόνωσης της GPb

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



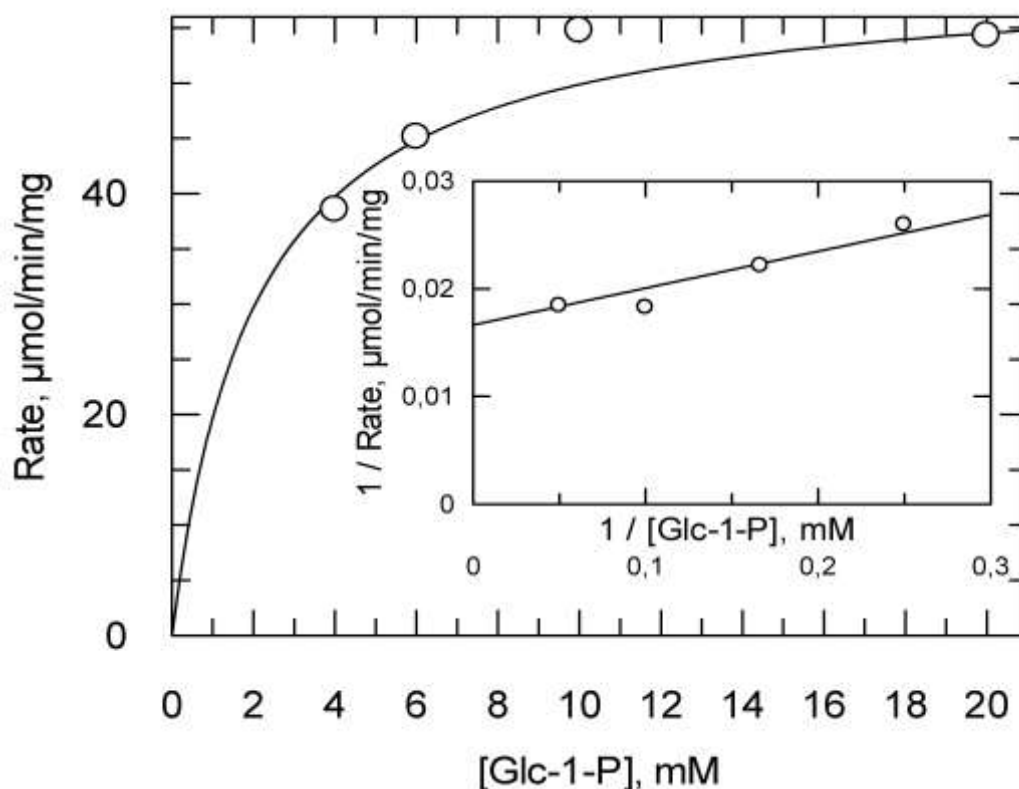
**Εικόνα 24:** Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την παραλαβή του μυϊκού εκχυλίσματος. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην τρίτη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



#### 4.2 Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

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

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι:  $K_m=2.05 \pm 0.5$  mM, και  $V_{max}=60.11 \pm 2.06$   $\mu\text{mol Pi/mg/min}$ .

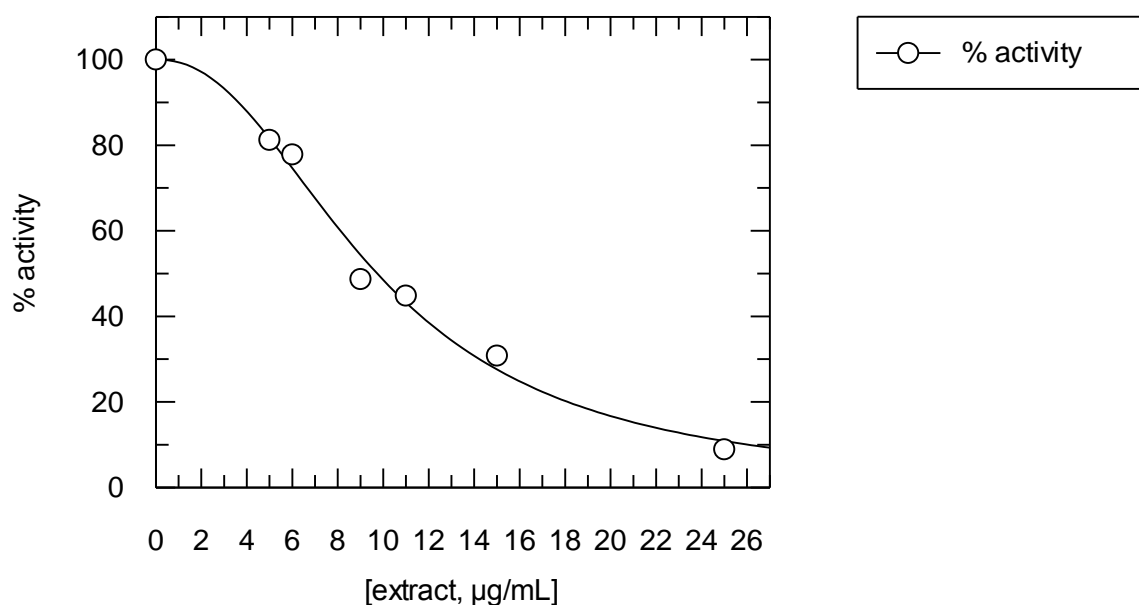


**Εικόνα 25:** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος G-1-P (4.0, 6.0, 10.0, 20.0 mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση AMP

(1.0mM) και γλυκογόνου (0.2%w/v). Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στο ένθετο είναι το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές  $K_m$  και  $V_{max}$

#### 4.3 Κινητική μελέτη εκχυλίσματος σταφυλιού-Vinsanto

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η ανασταλτική επίδραση εκχυλίσματος σταφυλιού Vinsanto. Ακολουθεί η γραφική παράσταση που προέκυψε από το πρόγραμμα Grafit για τον υπολογισμό της  $IC_{50}$ .



$$IC_{50} = 9.73 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$$

**Εικόνα 26:** Καμπύλη της % αναστολής της δραστικότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος. Η  $IC_{50}$  υπολογίστηκε στα  $9.73 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$ .

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη εκχυλίσματος από βόστρυχους σταφυλιού ποικιλίας Vinsanto. Ειδικότερα, η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας ως προς την ανασταλτική επίδραση φυσικών εκχυλισμάτων από βόστρυχους, γίγαρτα και στέμφυλα από διάφορες ποικιλίες Ελληνικών σταφυλιών έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ένα ένζυμο που αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II.

Τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων έδειξαν ότι το εκχύλισμα έχει μέτρια ανασταλτική επίδραση με την τιμή της IC<sub>50</sub> να είναι  $9.73 \pm 0.31$   $\mu\text{g/mL}$ .

Ωστόσο βρίσκεται σε εξέλιξη η κρυσταλλογραφική μελέτη του υπό μελέτη εκχυλίσματος, έτσι ώστε να μπορέσουμε να ταυτοποιήσουμε την δραστική ουσία που προκαλεί την αναστολή του ενζύμου, σε ποιο από τα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου προσδένεται, καθώς και το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσεται μεταξύ της πρωτεΐνης και της ουσίας έτσι ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής.

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

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- **Hossain P et al.** Obesity and Diabetes in the Developing World - a Growing Challenge. **NEJM 2007**; 356(3):213-215
- Stryer L., 2007, Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 3<sup>η</sup>, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
- Σωτήριος Α. Ράπτης, 1998, Εσωτερική Παθολογία, Τόμος ΙV, Επιστημονικές Εκδόσεις «Γρηγόριος Παρισιανός» Μαρία Γρ. Παρισιανού, Αθήνα
- McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., 2000, Essentials of Exercise Physiology, Τόμος Ι, Έκδοση 2<sup>η</sup>, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.
- Oikonomakos, N.G. 2002, Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586
- Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák L., Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B. and Gergely, P., 2002, The binding of N'-acetyl- and Benzoyl-N'-β-D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696.
- Oikonomakos, N. G.; Somsak, L. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2008, 9, 379.
- Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. 2008, New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents, *Curr. Med. Chem*, 15, 2933-2983