



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Βιοχημική αξιολόγηση της
υπογλυκαιμικής δράσης εκχυλισμάτων
υποπροϊόντων επεξεργασίας ροδιών**



Μπουλιμάρη Ευρυδίκη

ΛΑΡΙΣΑ 2013



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Βιοχημική αξιολόγηση της υπογλυκαιμικής δράσης
εκχυλισμάτων υποπροϊόντων επεξεργασίας ροδιών**

**Biochemical evaluation of hypoglycemic action from
by-products extracts of industrial processing of
pomegranate**



Μπουλιμάρη Ευρυδίκη

ΛΑΡΙΣΑ 2013

Τριμελής επιτροπή

- Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Δρ. Κοντού Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	1
Περίληψη	2
Abstract	3
1. Εισαγωγή	
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης	4
1.2 Τύποι σακχαρώδους διαβήτη	8
1.2.1 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1	8
1.2.2 Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2	10
1.2.3 Διαβήτης κύησης	12
2. Βασικές γνώσεις	
2.1 Ινσουλίνη	14
2.1.1 Η δομή της ινσουλίνης	14
2.1.2 Ο ρόλος της ινσουλίνης	16
2.1.3 "Ανασυνδυσασμένη" ή "Ανθρώπινη" ινσουλίνη	19
2.1.4 Προβλήματα που σχετίζονται με αυξημένες συγκεντρώσεις ινσουλίνης	20
2.2 Γλυκόζη	21
2.3 Γλυκογόνο	23
2.3.1 Γενικά	23
2.3.2 Ο ρόλος του γλυκογόνου	24
2.3.3 Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου	24
2.4 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP)	29
2.4.1 Γενικά	29
2.4.2 Ο ρόλος της PLP στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου	30
2.5 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	32
2.5.1 Γενικά	32
2.5.2 Δομή	33
2.5.3 Μηχανισμός δράσης	33
2.5.4 Ρύθμιση	35
2.5.5 Κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	39
2.6 Κινητική ενζύμων και ενζυμική αναστολή	45
2.6.1 Γενικά	45
2.6.2 Συναγωνιστική και μη συναγωνιστική αναστολή του ενζύμου	48

2.7 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων	51
2.8 Ρόδι	53
3. Πειραματικό μέρος	
3.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού	58
3.2 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	62
3.2.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου	62
3.2.2 Προσδιορισμός της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)	64
3.2.3 Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέα	65
3.3 Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b	66
3.4 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης	66
3.5 Παρασκευή τυφλών	69
3.6 Προσδιορισμός φωσφόρου	69
3.7 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit	71
4. Αποτελέσματα	
4.1 Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	74
4.2 Κινητική μελέτη αναστολέα, εκχύλισμα ροδιού, ποικιλίας Wonderful	75
5. Συμπεράσματα	77
Βιβλιογραφία	78

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Λειτουργικής και Δομικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2012-Μάρτιος 2013.

Το θέμα της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας υποδείχθηκε από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ., Δρ. Δημήτρη Δ. Λεωνίδα, η συμβολή του οποίου ήταν καθοριστική σε όλη τη διάρκεια της εργασίας. Τον ευχαριστώ θερμά όχι μόνο για την ανάθεση αυτής της μελέτης αλλά και για την συνεχή επιστημονική καθοδήγησή του, τόσο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω πάρα πολύ την υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Π.Θ., Αναστασία Καντσάδη καθώς και το μεταπτυχιακό φοιτητή Γεώργιο Στροβοδήμο για την πολύτιμη βοήθειά τους στο εργαστήριο. Με τις γνώσεις, τις συνεχείς διευκρινίσεις και την υπομονή τους η παρούσα εργασία ήρθε εις πέρας. Επιπλέον, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, που βοήθησαν και συνέβαλαν στην εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και όλους όσους ήταν δίπλα μου, για την ηθική και υλική συμπαράστασή τους, χωρίς την οποία η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας θα ήταν αδύνατη.

Ευρυδίκη Α. Μπουλιμάρη
Λάρισα, 2013

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 της 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 (GPb) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Η εργασία απαρτίζεται από δυο μέρη, το θεωρητικό και το πειραματικό. Στο θεωρητικό μέρος αναφέρονται βασικές γνώσεις γύρω από το διαβήτη ενώ στο πειραματικό μέρος επιχειρείται μια προσπάθεια όσο το δυνατόν λεπτομερέστερης περιγραφής όλων των πειραματικών διαδικασιών που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο.

Στην παρούσα εργασία, απομονώσαμε το ένζυμο φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μυς κουνελιού και μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση εκχυλίσματος ροδιού, ποικιλίας Wonderful, στην ενζυμική δραστηριότητα. Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι η ένωση αυτή είναι ένας ισχυρός αναστολέας του ενζύμου με σταθερά αναστολής, $IC_{50} = 18.13 \pm 0.70$ $\mu\text{g/mL}$.

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 is to keep blood sugar as close as possible to limits. For that reason, enzymes involved in the regulation of glucose levels are used as molecular targets. In this way, the enzyme glycogen phosphorylase is one of the most important molecular targets for designing new hypoglycemic drugs.

The work is composed of two parts, the theoretical and the experimental. The theoretical part consists of basic knowledge about diabetes while the experimental section is composed by a detailed description of all the experimental procedures carried out in the laboratory.

In the present study, we purified the enzyme glycogen phosphorylase b (GPb) from rabbit skeletal muscles and studied by kinetic experiments the effect of extract from pomegranate, variety Wonderful, on enzymatic activity. The kinetic experiments, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that this extract displays a potent inhibitory action on the enzyme with $IC_{50} = 18.13 \pm 0.70 \mu\text{g/mL}$.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

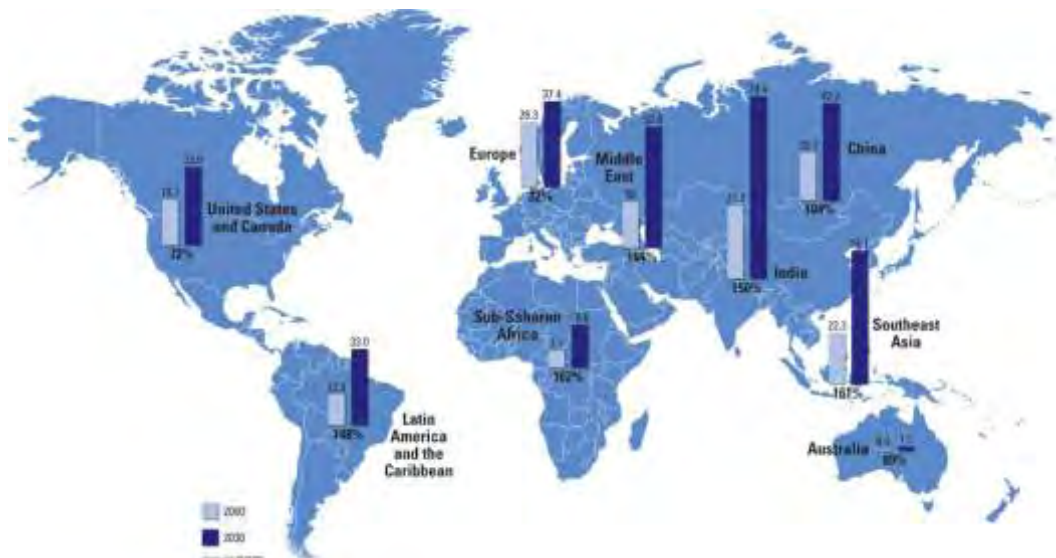
Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί σήμερα μείζον πρόβλημα υγείας στο δυτικό κόσμο, ώστε να θεωρείται πανδημία. Υπολογίζεται ότι σε παγκόσμιο επίπεδο περίπου 346 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από την ασθένεια αυτή (ΠΟΥ 2011) [1]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, μέχρι το 2030 περισσότερα από 300 εκατομμύρια άνθρωποι θα έχουν εκδηλώσει σακχαρώδη διαβήτη τύπου II [2]. Το 2004 περίπου 3,4 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν λόγω των επιπτώσεων υψηλής συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα. Ο οργανισμός προβλέπει ότι οι θάνατοι από διαβήτη θα διπλασιαστούν μεταξύ 2005 και 2030 [3]. Στη χώρα μας, το 6% του γενικού πληθυσμού πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη. Η νόσος έχει υψηλότερο επιπολασμό (συχνότητα εμφάνισης) στο δυτικό κόσμο (ιδιαίτερα ο διαβήτης τύπου II) και αυτό αποτελεί μια σαφή ένδειξη για τη συσχέτιση της νόσου με το σύγχρονο τρόπο ζωής, τις διατροφικές συνήθειες και την έλλειψη σωματικής άσκησης [2].

Επιπολασμός διαβήτη

	2000	2030
Παγκοσμίως	171.000.000	366.000.000
Ευρώπη	33.332.000	47.973.000
Ελλάδα	853.000	1.077.000

(WHO, 2006, Panagiotakos, 2004)

Στις ανεπτυγμένες χώρες, οι περισσότεροι άνθρωποι με διαβήτη έχουν ηλικία 65 ετών ή περισσότερο, ενώ στις αναπτυσσόμενες η ηλικιακή ομάδα είναι 45-64. Αυτό θα συνεχιστεί μέχρι το 2025. Οι χώρες με το μεγαλύτερο αριθμό διαβητικών είναι και θα είναι η Ινδία, η Κίνα και οι Η.Π.Α. Ιδιαίτερα στις ανεπτυγμένες χώρες υπάρχουν περισσότερες γυναίκες παρά άνδρες διαβητικοί. Στο μέλλον ο διαβήτης θα συγκεντρωθεί αυξανόμενα στις αστικές περιοχές [4].



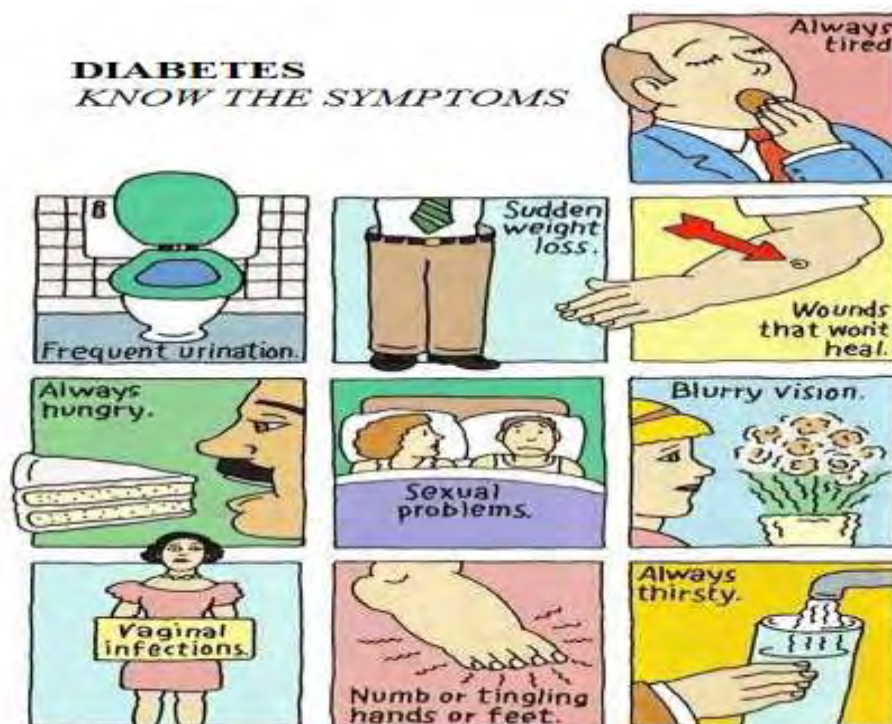
Εικόνα 1: Τα παγκόσμια ποσοστά του διαβήτη τύπου 2 το 2000 και τα αναμενόμενα ποσοστά το 2030.

http://www.bostonscientific-international.com/templatedata/imports/HTML/intl/WorldDiabetesDay/worlddiabetesday_prevalence_intl.html

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι 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) [1]. Η ινσουλίνη είναι μια ορμόνη που εκκρίνεται από το πάγκρεας και είναι απαραίτητη για τη μεταφορά της γλυκόζης που λαμβάνεται από τις τροφές, μέσα στα κύτταρα. Όταν το πάγκρεας δεν παράγει αρκετή ινσουλίνη ή η ινσουλίνη που παράγει δεν δρα σωστά, τότε η γλυκόζη που λαμβάνεται από τις τροφές δεν εισέρχεται στα κύτταρα ώστε να έχουν την απαραίτητη ενέργεια για τη λειτουργία τους και παραμένει στο αίμα με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης προκαλώντας έτσι βλάβες σε αρκετούς ιστούς του σώματος και άρα την εκδήλωση της νόσου [1,2]. 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 2: 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 [1].

Στην πλειοψηφία των ασθενών με διαβήτη, τα **αίτια** της ασθένειας δεν είναι κατανοητά και αυτό γιατί είναι μια χρόνια νόσος που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία, διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών και οφείλεται σε μειονεκτική έκκριση ή μειονεκτική δράση της ινσουλίνης ή σε συνδυασμό των δυο, με αποτέλεσμα την απόλυτη ή σχετική έλλειψη. Ειδικοί έχουν προτείνει μία ομάδα κριτηρίων για τη διάγνωση, και άλλη μία για την κατηγοριοποίηση (τύπου 1 ή 2). Τα κριτήρια

αυτά εξυπηρετούν δύο σκοπούς. Ο ένας είναι να εξασφαλίσουν την καλύτερη δυνατή θεραπεία για τον ασθενή και ο άλλος είναι η υποστήριξη ερευνών που στοχεύουν στην κατανόηση των αιτιών και της παθογένεσης συνδρόμων διαβήτη [5]. Φένεται 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, το διαβητικό κώμα, υπερωσμωτικό μη κετωτικό κώμα και η υπογλυκαιμία (επιπλοκή της θεραπείας), είτε για χρόνιες, όπως είναι η διαβητική μικροαγγειοπάθεια και η διαβητική μακροαγγειοπάθεια (αρτηριοσκλήρυνση, στεφανιαία νόσος).

Όσον αφορά τη **διάγνωση**, αυτή είναι εύκολη όταν υπάρχουν τα κλασικά συμπτώματα και αρκεί η επιβεβαίωση με τη μέτρηση του σακχάρου του αίματος (τιμή γλυκόζης σε οποιαδήποτε στιγμή > 200mg/dl). Για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος πραγματοποιείται το τεστ ανοχής γλυκόζης όπου λαμβάνονται η τιμή της γλυκόζης νηστείας (λαμβάνεται 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].

1.2 Τύποι σακχαρώδους διαβήτη

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

Ο διαβήτης τύπου 1 είναι η πιο σοβαρή μορφή διαβήτη, που οδηγεί σε εφόρου ζωής εξάρτηση από την καθημερινή χορήγηση ινσουλίνης [6]. Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 θεωρείται μια χρόνια αυτοάνοση νόσος και 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. Στον διαβήτη τύπου 1 απουσιάζει η ινσουλίνη με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η είσοδος της γλυκόζης στα κύτταρα και η συγκέντρωση της γλυκαγόνης να βρίσκεται σε υψηλότερο επίπεδο από το φυσιολογικό. 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 [1]. Ορισμένοι ασθενείς εμφανίζονται να έχουν οξεία αφυδάτωση και κετοξέωση ενώ άλλοι έχουν ελάχιστα ή καθόλου συμπτώματα. Μελέτες έχουν συνδέσει αυτές τις διαφορές με το ρυθμό απώλειας της λειτουργίας των β-κυττάρων και την υπολειμματική λειτουργία τους, που καθορίζονται από γενετικούς και άλλους παράγοντες, με αποτέλεσμα να αλλάζει η παθολογία της ασθένειας αναλόγως [6]. Στους ασθενείς η γλυκόζη δεν εισέρχεται στα κύτταρα, ούτε αποθηκεύεται σωστά στο ήπαρ και τους μύες, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στο αίμα. Έτσι, τα κύτταρα δε λαμβάνουν τα απαιτούμενα θρεπτικά συστατικά, υπάρχει φτωχή πρωτεϊνοσύνθεση, δεν μπορεί να παραχθεί ενέργεια για πολλές και σημαντικές σωματικές λειτουργίες. Συνέπειες όλων αυτών είναι η εμφάνιση συμπτωμάτων όπως:

- **αφυδάτωση**, η υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα προκαλεί αυξημένη διούρηση με αποτέλεσμα να αφυδατώνεται ο οργανισμός.

- απώλεια βάρους, η απώλεια σακχάρων μέσω της ούρησης συνεπάγεται απώλεια θερμίδων που παράγουν ενέργεια και έτσι συχνά άτομα με υψηλό ζάχαρο χάνουν βάρος.
- κετοξέωση, τα κύτταρα χωρίς την ινσουλίνη δεν παράγουν ενέργεια, οπότε το σώμα διασπά λιπώδη κύτταρα. Παραπροϊόντα της διάσπασης είναι όξινα χημικά (κετόνες) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ενέργειας. Με τη συσσώρευση τους στο αίμα προκαλούν αυξημένη οξύτητα. Το ήπαρ εξακολουθεί να παρέχει τα σάκχαρα που έχει αποθηκευμένα για να βοηθήσει αλλά χωρίς ινσουλίνη ακόμη περισσότερα σάκχαρα συσσωρεύονται στο αίμα. Ο συνδυασμός υψηλών σακχάρων, αφυδάτωσης και συγκέντρωσης οξέων καλείται κετοξέωση και μπορεί να αποβεί μοιραία αν δεν αντιμετωπιστεί άμεσα.
- γενικές βλάβες, με το χρόνο τα υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα είναι πιθανόν να καταστρέψουν τα νεύρα και μικρά αγγεία στα μάτια, τα νεφρά και την καρδιά, οπότε να προδιαθέσουν τον ασθενή για αθηροσκλήρωση των μεγάλων αρτηριών με κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου και ανακοπής. Αν δεν υπάρξει διαχείριση του διαβήτη, μπορεί να αναπτυχθεί μια σειρά από σοβαρά ή και θανατηφόρα προβλήματα όπως αμφιβληστροειδοπάθεια, βλάβες στο ήπαρ και κακή κυκλοφορία του αίματος [7].

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων κάποιος αποκτά διαβήτη τύπου 1, όταν υπάρχει προδιάθεση και από τους δύο γονείς του. Η προδιάθεση αυτή κατά πάσα πιθανότητα βασίζεται σε παράγοντες που αφορούν τους λευκούς, γιατί οι λευκοί παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά διαβήτη τύπου 1.

Πιστεύεται ότι προκαλείται από περιβαλλοντικούς 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. 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.

Έρευνες έχουν δείξει ότι ο διαβήτης τύπου 1 εμφανίζεται συχνότερα το χειμώνα από το καλοκαίρι και σε περιοχές με ψυχρά κλίματα παρά θερμά. Επίσης συγκεκριμένο ρόλο φαίνεται να έχουν οι ιοί. Ίσως ένας ιός που δεν έχει και πολύ σοβαρά συμπτώματα να επηρεάζει τον ανθρώπινο οργανισμό με τέτοιο τρόπο, ώστε να ενισχύει τον διαβήτη τύπου 1. Επίσης σημαντική είναι και η διατροφή κατά τη βρεφική ηλικία. Έχει διαπιστωθεί ότι οι άνθρωποι που τρέφονταν δια θηλασμού περισσότερο χρονικό διάστημα, έχουν μικρότερες πιθανότητες να εμφανίσουν διαβήτη τύπου 1. Τέλος, έχει διαπιστωθεί από πειράματα, ότι οι άνθρωποι που είχαν χαμηλά ποσοστά αντισωμάτων στον οργανισμό τους στο παρελθόν, έχουν τώρα μεγαλύτερες πιθανότητες να εμφανίσουν διαβήτη τύπου 1.

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

Είναι το πιο συνηθισμένο είδος διαβήτη, στο οποίο συνυπάρχουν η διαταραχή της έκκρισης και της δράσης της ινσουλίνης, μεταβολές που μπορεί να προϋπήρχαν αρκετά χρόνια πριν την εμφάνισή του. Στον διαβήτη τύπου 2 παράγεται ινσουλίνη αλλά είτε το πάγκρεας δεν παράγει αρκετή είτε αυτή που παράγεται δεν είναι αρκετά αποτελεσματική. Συνέπεια είναι ότι η γλυκόζη δεν μπορεί να απορροφηθεί από τα κύτταρα και έτσι αυτά δε λειτουργούν σωστά. Έτσι ο οργανισμός έρχεται αντιμέτωπος με τα προαναφερθέντα συμπτώματα (αφυδάτωση, γενικές βλάβες) αλλά και με το διαβητικό κώμα το οποίο συμβαίνει σε ακραίες περιπτώσεις αφυδάτωσης.

Ο ΣΔ2 εμφανίζεται στον οποιονδήποτε αλλά αυτοί που διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο είναι οι παχύσαρκοι και υπέρβαροι, γυναίκες που έχουν εμφανίσει διαβήτη κύησης, άτομα με ιστορικό ΣΔ2 στην οικογένειά τους και όσοι εμφανίζουν κλινικά στοιχεία του μεταβολικού συνδρόμου (υπέρταση, αύξηση της περιμέτρου της κοιλιάς, διαταραχές των λιπιδίων του αίματος) [8]. 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.

Τα **συμπτώματα** εμφανίζονται σταδιακά, είναι πιο ήπια από αυτά του διαβήτη τύπου 1 και διαφέρουν από ασθενή σε ασθενή. Αρκετά συχνά τα συμπτώματα λείπουν τελείως και ο ασθενής αισθάνεται υγιής [1]. Τα κυριότερα είναι: αυξημένη δίψα, αυξημένη όρεξη, ξερό στόμα, ναυτία ή/και έμετοι, πολυουρία, κούραση, εξάντληση, διαταραχές της όρασης, μούδιασμα ή μυρμηγκιάσματα σε χέρια και πόδια και συχνές φλεγμονές του δέρματος, του ουροποιητικού και του κόλπου.

Αν και ο ΣΔ2 είναι πιο συχνός από τον ΣΔ1 (των νέων), η αιτιολογία του δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένη. Γνωρίζουμε μέχρι τώρα τα παρακάτω:

- Ο ΣΔ2 εμφανίζεται σε συγγενείς αλλά ο ακριβής τρόπος που κληρονομείται και η ταυτότητα του γονιδιακού παράγοντα που τον προκαλεί δεν είναι γνωστά.
- Προοδευτικά η έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας, ενώ αρχικά είναι αυξημένη για να εξισορροπήσει τη μειωμένη δράση της, μειώνεται με αποτέλεσμα την εμφάνιση ψηλού σακχάρου στο αίμα.

Η **διάγνωση** γίνεται με μέτρηση του σακχάρου στο αίμα. Επίσης ελέγχεται η παρουσία σακχάρου ή κετονικών σωμάτων στα ούρα. Μπορεί ακόμα να διαγνωστεί από την υψηλή χοληστερίνη και κυρίως τα τριγλυκερίδια στο αίμα. Μερικές φορές ο ΣΔ2 ανακαλύπτεται τυχαία από μία εξέταση ρουτίνας στο βυθό του ματιού όπου μπορεί να υπάρχουν οι χαρακτηριστικές βλάβες του διαβήτη.

Αν ο διαβήτης δεν ρυθμίζεται σωστά μπορεί να εμφανισθούν **επιπλοκές** που είναι επικίνδυνες ακόμη και για τη ζωή. Οι κυριότερες από αυτές είναι:

- Η αμφιβληστροειδοπάθεια. Οι βλάβες στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού είναι συχνές και γίνονται πιο συχνές με τη πάροδο του χρόνου. Η εμφάνιση τους προλαμβάνεται ή καθυστερεί με την καλή ρύθμιση όχι μόνο του σακχάρου αλλά και της αρτηριακής πίεσης και της χοληστερίνης. Η τύφλωση δεν είναι συχνή επιπλοκή.
- Βλάβες στα νεφρά. Ο κίνδυνος για νεφρική βλάβη αυξάνεται με το χρόνο. Η επιπλοκή αυτή είναι σοβαρή γιατί μπορεί να οδηγήσει σε νεφρική ανεπάρκεια και καρδιακή νόσο.
- Μειωμένη αισθητικότητα και κακή κυκλοφορία του αίματος. Η βλάβη στα νεύρα και η σκλήρυνση των αρτηριών οδηγεί σε μειωμένη αισθητικότητα και κακή κυκλοφορία του αίματος στα πόδια. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των φλεγμονών του δέρματος και σε έλκη που δεν επουλώνονται εύκολα. Η κακή κυκλοφορία μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε ακρωτηριασμό. Η βλάβη στα νεύρα μπορεί επίσης να προκαλέσει διαταραχές από το πεπτικό όπως ναυτία, έμετοι και διάρροια.

Πολλοί ασθενείς με διαβήτη ζουν πολλά χρόνια και σε καλή υγεία. Το μυστικό είναι η διατήρηση του σακχάρου σε καλά επίπεδα που επιτυγχάνεται με τη σωστή δίαιτα, την άσκηση και φαρμακευτική θεραπεία με χάπια. Χρειάζεται επίσης η συχνή μέτρηση του σακχάρου, της πίεσης και των λιπιδίων στο αίμα.

1.2.3 Διαβήτης κύησης

Υπάρχει επίσης ο διαβήτης κύησης που είναι ένα σημαντικό πρόβλημα, προσβάλλει περίπου το 4% των κυήσεων και σχεδόν πάντοτε εξαφανίζεται μετά τον τοκετό [8]. Είναι πολύ σημαντική η έγκαιρη διάγνωσή της γιατί μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές. Γι' αυτό το λόγο μεταξύ 24-28^{ης} εβδομάδας κύησης γίνεται έλεγχος αποκλεισμού του διαβήτη κύησης [4]. Οι μητέρες με διαβήτη κύησης έχουν αισθητά αυξημένες πιθανότητες να αναπτύξουν διαβήτη μετά τον τοκετό [8].

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται ορισμένα χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τους δύο τύπους διαβήτη.

	Τύπου 1(IDDM)	Τύπου 2(NIDDM)
Ηλικία έναρξης	Συνήθως <30 ετών	Συνήθως >40 ετών
Σωματικό βάρος	Απουσία παχυσαρκίας	Παχυσαρκία στο 80%
Συχνότητα	0,2-0,3%	2-4%
Θεραπεία με ινσουλίνη	Πάντοτε απαραίτητη	Συνήθως όχι απαραίτητη
Έκκριση ινσουλίνης	Σοβαρή ανεπάρκεια	Ποικίλλει (από ήπια ανεπάρκεια έως υπερινσουλιναιμία)
Αντίσταση στην ινσουλίνη	Περιστασιακά (σε μη καλή ρύθμιση ή σε περίσσεια αντισωμάτων κατά της ινσουλίνης)	Συνήθης (λόγω διαταραχής των υποδοχέων ή σε επίπεδο μετά τους υποδοχείς)
Σχέση με άλλα αυτοάνοσα φαινόμενα	Περιστασιακά	Όχι
Κέτωση	Συχνή	Σπάνια
Γενετικοί παράγοντες Συσχέτιση HLA	Ναι	Όχι
Κυκλοφορούντα αντισώματα στα β-κύτταρα	Ναι(90-95%)	Όχι

Wynyarden JB, Smith LH, Bennett GC: Cecil Textbook of Medicine, 19th ed. Saunderw, 1992.

Και οι δύο μορφές διαβήτη είναι σύνθετες ασθένειες που προκαλούνται από μεταλλάξεις σε περισσότερα από ένα γονίδια, καθώς και από περιβαλλοντικούς παράγοντες [4].

2. Βασικές γνώσεις

2.1 Ινσουλίνη

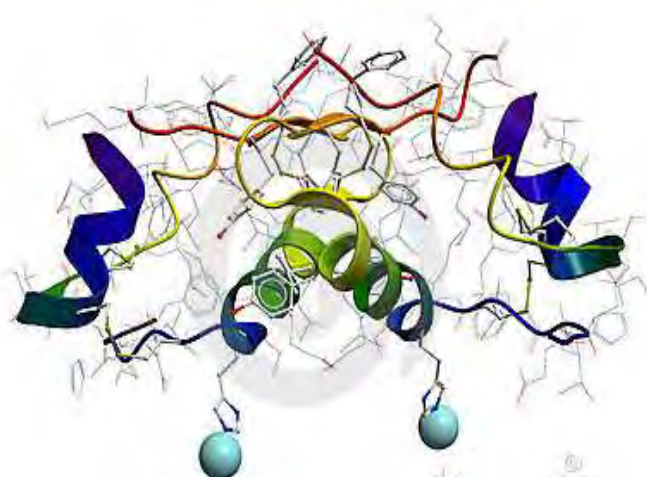
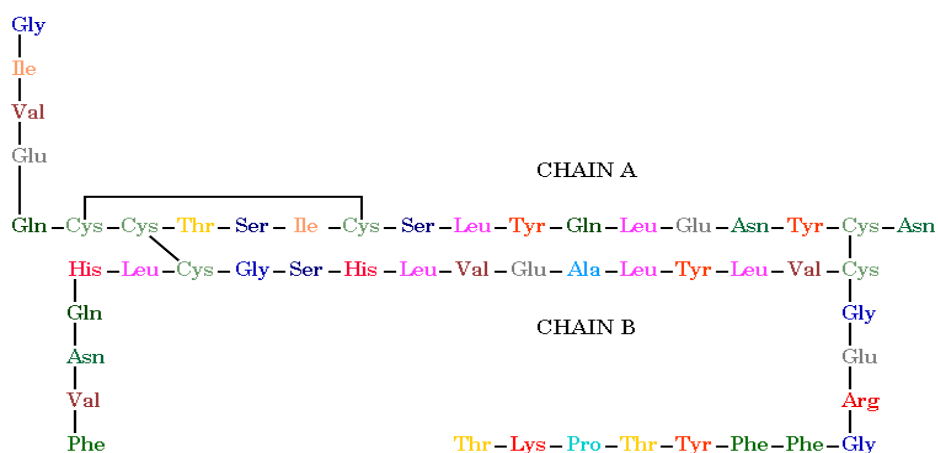
2.1.1 Η δομή της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη είναι η κύρια ορμόνη που ρυθμίζει το μεταβολισμό της γλυκόζης και δρα ως αναβολική ορμόνη αλλά και ως 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 ήπατικός, ο λιπώδης και ο μυϊκός, ωστόσο η ινσουλίνη παρεμβαίνει στην κυτταρική ανάπτυξη και το μεταβολισμό των περισσότερων ιστών [1].

Παράγεται από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, που αποτελούν το 60-85% των κυττάρων των νησιδίων Langerhans και εκκρίνεται απ' ευθείας στην κυκλοφορία του αίματος (ενδοκρινής ορμόνη). Τα β-κύτταρα "διεγείρονται" από τα μόρια γλυκόζης και η δράση της είναι ξεκάθαρα αναβολική. Αρχικά, παράγεται ένα πολυπεπτίδιο 11,5 kDa, η προ-προϊνσουλίνη, η οποία στο ενδοπλασματικό δίκτυο μετατρέπεται σε προ-ινσουλίνη (9 kDa). Στα κυστίδια του συστήματος 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 [1,8]. Το μοριακό βάρος της είχε προσδιορισθεί γύρω στο 12.000, το οποίο εκ των υστέρων διαπιστώθηκε ότι ήταν περίπου διπλάσιο από το πραγματικό εξαιτίας της τάσης της ινσουλίνης να σχηματίζει σταθερά μη-ομοιοπολικά διμερή.

Η ινσουλίνη είναι πολυπεπτιδική ορμόνη, μια σχετικά μικρή πρωτεΐνη, που αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες (A και B) που περιέχουν συνολικά 51 αμινοξέα, 21 αμινοξέα στην A αλυσίδα και 30 αμινοξέα στη B αλυσίδα. Από τα 20 κοινά αμινοξέα των πρωτεϊνών δεν διαθέτει τα αμινοξέα θρυπτοφάνη (Try) και μεθειονίνη (Met). Διαθέτει τρεις δισουλφιδικές γέφυρες (-S-S-) από τις οποίες οι δύο συγκρατούν τις δύο αλυσίδες. Οι δύο αλυσίδες μπορούν να χωρισθούν εύκολα με διάνοιξη των -S-S- γεφυρών με οξειδωση (για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε υπερμυρμηκικό οξύ, HCOOOH). Καμία από τις δύο αλυσίδες χωριστά δεν εμφανίζει κάποια

φυσιολογική δραστικότητα και επομένως η δράση της ινσουλίνης οφείλεται στη συνολική διαμόρφωση του μορίου της (τριτοταγής δομή) και όχι στα επιμέρους συστατικά της πεπτιδία ή αμινοξέα.

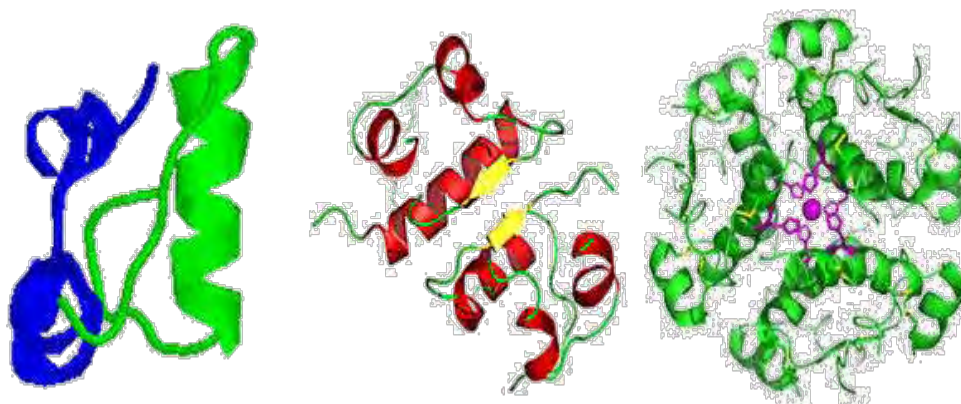


Εικόνα 3: Η δομή της ινσουλίνης.

Η ινσουλίνη υπήρξε η πρώτη πρωτεΐνη της οποίας προσδιορίστηκε η τριτοταγής κρυσταλλική δομή. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε το 1969 με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ [9].

Η ινσουλίνη σε υδατικό διάλυμα σχηματίζει σταθερά μη-ομοιοπολικά διμερή, αλλά υπάρχουν ακόμη τετραμερή και εξαμερή, με τη μόνη δραστική μορφή της ινσουλίνης να είναι η μονομερής. Τα τελευταία, σταθεροποιούνται ιδιαίτερα παρουσία ιόντων ψευδαργύρου. Ο σχηματισμός τους αλλά και σύνθετα συμπλέγματα με απλές πρωτεΐνες (όπως η πρωταμίνη)

αξιοποιούνται φαρμακευτικά για την παραγωγή ινσουλινών "βραδείας αποδέσμευσης" και αυξημένης διάρκειας δράσης [10].



Εικόνα 4: (α) Μονομερές ινσουλίνης (βιολογικώς δραστική μορφή).
(β) Διμερές ινσουλίνης (η κυριότερη μορφή σε υδατικό διάλυμα.
(γ) Εξαμερές ινσουλίνης συγκρατούμενο από δύο ιόντα $Zn(II)$
που συμπλέκονται μέσω της ιστιδίνης της β -αλυσίδας (B10-His) [8β].

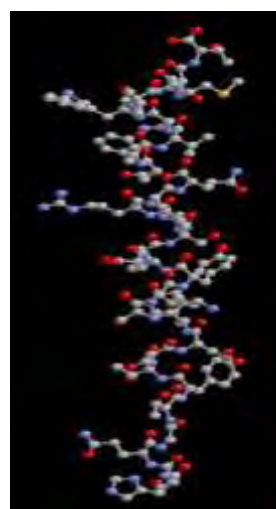
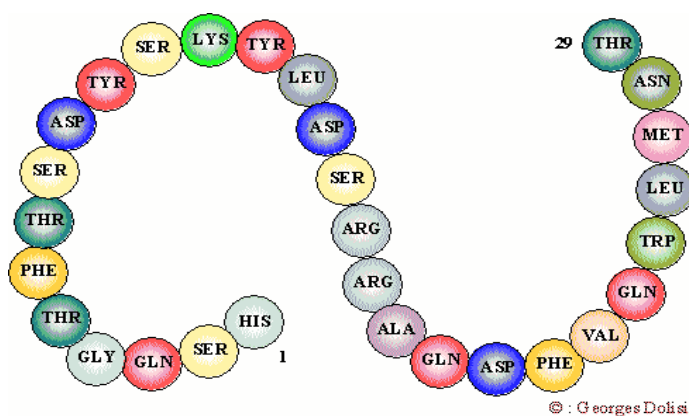
2.1.2 Ο ρόλος της ινσουλίνης

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 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 από τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης (αλλά και την σύνθεση ινσουλίνης).

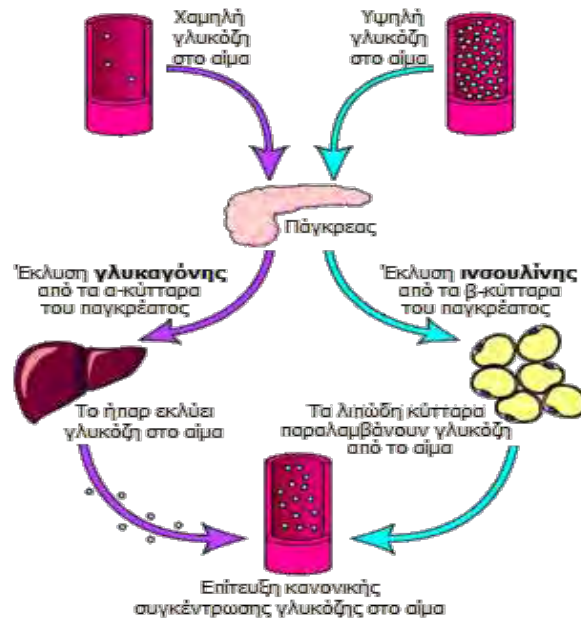
Η ινσουλίνη μετά την έκκρισή της από το πάγκρεας και πριν φτάσει στην περιφερική (συστηματική) κυκλοφορία διέρχεται αναγκαστικά από το ήπαρ, όπου μπορεί να αδρανοποιηθεί το 40% περίπου της ινσουλίνης.

Η γλυκαγόνη είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Kimball το 1923. Εκκρίνεται από το πάγκρεας με στόχο την αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Παράγεται από τα α-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans, που βρίσκονται στην ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος και η δράση της είναι καθαρά καταβολική. Προέρχεται από τη διάσπαση της προ-γλυκαγόνης. Η ώριμη γλυκαγόνη αποτελείται από 29 αμινοξέα, με μοριακό βάρος 3485 daltons. Η έκκρισή της ενισχύεται από ορισμένα αμινοξέα και από τη μυϊκή δραστηριότητα. Αντίθετα με την ινσουλίνη, η έκκρισή της διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος.



Εικόνα 5: 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 6** παρουσιάζεται ο γενικός μηχανισμός δράσης των εν λόγω ορμονών στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος.



Εικόνα 6: Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα.

Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα αυξηθούν περίπου **πάνω από 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, με επακόλουθο τη μείωση της συγκέντρωσης σακχάρου στο αίμα.

Η μείωση της γλυκόζης στο αίμα, σε επίπεδα **κάτω από 4 mmol/L**, οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης από το πάγκρεας η οποία προσλαμβάνεται από το ήπαρ. Εκεί η γλυκαγόνη, που εκκρίνεται από τα α κύτταρα, προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης. Η γλυκαγόνη αυξάνει τα επίπεδα της γλυκόζης κυρίως μέσω της γλυκογονόλυσης και της γλυκονεογένεσης. Όταν το ήπαρ κορεσθεί σε γλυκογόνο, η γλυκόζη κατευθύνεται προς το λιπώδη ιστό για σύνθεση λιπαρών οξέων, γλυκερόλης και τελικά τριγλυκεριδίων. 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.

Και οι δύο ορμόνες, στόχο έχουν να επαναφέρουν την γλυκόζη στα φυσιολογικά της επίπεδα. 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].

2.1.3 "Ανασυνδυασμένη" ή "Ανθρώπινη" ινσουλίνη

Το 1966 ο χημικός Παν. Κατσόγιαννης (Διευθυντής Τμήματος Βιοχημείας στο Medical Research Center of Brookhaven National Laboratory, Upton, Νέα Υόρκη, ΗΠΑ, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Λεωνίδα Ζέρβα) μετά από την επιτυχή σύνθεση της ινσουλίνης του προβάτου, πέτυχε τη σύνθεση της ανθρώπινης ινσουλίνης [11].

Ωστόσο οι μεγάλες ποσότητες της απαιτούμενης ινσουλίνης δεν θα ήταν δυνατόν να καλυφθούν από οποιοδήποτε σχήμα ολικής σύνθεσης, με βάση τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης. Έτσι, ενώ αρχικά η ινσουλίνη λαμβανόταν κυρίως από το πάγκρεας βοοειδών, σήμερα ουσιαστικά στο σύνολό της η ινσουλίνη, και μάλιστα η "ανθρώπινη" ινσουλίνη, παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και προσιτό κόστος με βιοτεχνολογικές μεθόδους.

Η ευρύτητα πλέον χορηγούμενη ανθρώπινη ινσουλίνη δεν λαμβάνεται από τα β-κύτταρα του ανθρώπινου παγκρέατος, αλλά παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα από γενετικώς τροποποιημένα βακτήρια *E. coli* ή κύτταρα ζύμης με ανθρώπινα γονίδια συνδεδεμένα στο γονιδίωμα τους. Παράγονται και απομονώνονται οι δύο αλυσίδες (Α και Β) της ινσουλίνης από δύο διαφορετικά κλωνοποιημένα *E. coli* ή κύτταρα ζύμης και στη συνέχεια "συνενώνονται" στο εργαστήριο μέσω των δεσμών S-S.

Η πρώτη "ανθρώπινη" ινσουλίνη από κλωνοποιημένα *E. coli* παρασκευάστηκε το 1982 από την εταιρεία Lilly στις ΗΠΑ. Την ίδια χρονιά, μια "ημισυνθετική ανθρώπινη" ινσουλίνη παρασκευάστηκε επίσης από

ινσουλίνη χοίρου, με αντικατάσταση της αλανίνης της θέσης B30 με θρεονίνη από την εταιρεία Novo Industrie AS, Hoechst.

Η "ανθρώπινη" ινσουλίνη θα έπρεπε θεωρητικά να προκαλεί μικρότερες ανοσολογικές αντιδράσεις στον άνθρωπο, όμως οι κλινικές μελέτες δεν απέδειξαν κάτι τέτοιο. Σε σύγκριση όμως με τη βόειο ή άλλες ινσουλίνες ζωικής προέλευσης, η ανθρώπινη είναι "ταχύτερη" ως προς τη φυσιολογική δράση [12,α-β].

2.1.4 Προβλήματα που σχετίζονται με αυξημένες συγκεντρώσεις ινσουλίνης

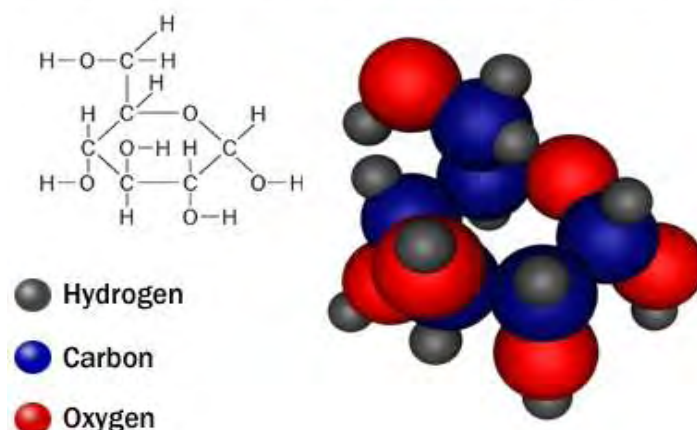
Ενώ τα μυϊκά και τα λιπώδη κύτταρα χρειάζονται ινσουλίνη για να μπορέσουν να προσλάβουν γλυκόζη από το αίμα, τα νευρικά κύτταρα την απορροφούν αμέσως. Σε περίπτωση νηστείας, η πτώση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα ενεργοποιεί τον μηχανισμό διάσπασης του γλυκογόνου του ήπατος.

Σε περίπτωση υπερβολικής συγκέντρωσης ινσουλίνης στο αίμα, η συγκέντρωση γλυκόζης μειώνεται σε επικίνδυνα επίπεδα και επέρχεται μια κατάσταση γνωστή ως υπογλυκαιμία. Το νευρικό σύστημα παύει να τροφοδοτείται ενεργειακά με γλυκόζη, οπότε εμφανίζονται συμπτώματα όπως ίλιγγοι, ταραχή, αδυναμία σωστής ομιλίας, λιποθυμία. Η λιποθυμία συχνά αναφέρεται ως υπογλυκαιμικό κώμα και αποτελεί κατάσταση που μπορεί να απειλήσει τη ζωή. Οι πάσχοντες από διαβήτη κινδυνεύουν να υποστούν υπογλυκαιμία αν χορηγηθεί μεγαλύτερη από την απαιτούμενη ποσότητα ινσουλίνης. Το υπογλυκαιμικό κώμα προλαμβάνεται αν ο ασθενής με τα πρώτα συμπτώματα υπογλυκαιμίας λάβει ποσότητα γλυκόζης. Για τον λόγο αυτό οι διαβητικοί πρέπει να έχουν πάντοτε μαζί τους δισκία γλυκόζης ή ακόμα και απλές καραμέλες [12,γ].

2.2 Γλυκόζη

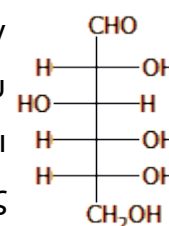
Η γλυκόζη ή δεξτρόζη είναι το πιο γνωστό σάκχαρο. Πρόκειται για έναν μονοσακχαρίτη που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα (εξόζη) συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου (δομή αλδόζης) με γενικό τύπο $C_6H_{12}O_6$. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι 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 [1].

Molecular Construction of Glucose



Εικόνα 7: Η δομή της γλυκόζης (συντακτική και τρισδιάστατη δομή).

Το 1891 ο Fischer, με πειράματα καθόρισε τη στεreoχημεία των ανθράκων C2, C3 και C4 της γλυκόζης σε σχέση με εκείνη του C5 και απέδειξε ότι η γλυκόζη ήταν ή η ένωση που φαίνεται δίπλα ή η εναντιομερής μορφή της. Ως ένωση αναφοράς θεώρησε τη γλυκεραλδεύδη και για τον προσδιορισμό αυτό χρειάστηκε δουλειά πολλών ετών και πολλά διαφορετικού τύπου πειράματα [13].



Η γλυκόζη υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές, κυρίως στα φρούτα και ειδικότερα στα ώριμα σταφύλια, όπου παράγεται μέσω του κύκλου του Calvin κατά τις φωτοσυνθέσεις. Επίσης παράγεται στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα

της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων (π.χ. γλυκογόνο) αλλά και από μη υδατανθρακικές ενώσεις (π.χ. γαλακτικό οξύ).

Αποτελεί 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 [1]. 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 [14].

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) [1].

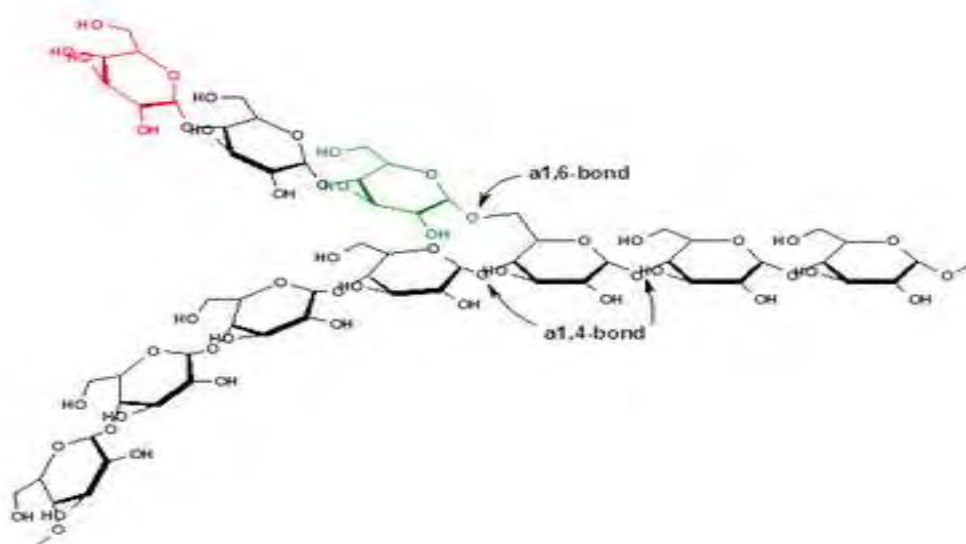
Συνηθέστερα όμως η γλυκόζη μετατρέπεται σε έναν πολυσακχαρίτη για να αποθηκευτεί και να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, που στα φυτά είναι το άμυλο και στα θηλαστικά το γλυκογόνο.

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 [14].

2.3 Γλυκογόνο

2.3.1 Γενικά

Το γλυκογόνο είναι η αποθηκεύσιμη μορφή της γλυκόζης στα ζωικά κύτταρα. Πρόκειται για ένα μεγάλο, διακλαδιζόμενο πολυμερές που αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης (μέχρι και 100.000 μονάδες 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 [1]. Οι διακλαδώσεις συμβάλουν στη διαλυτότητα του γλυκογόνου καθώς και στην αύξηση των μη-αναγωγικών άκρων, με σκοπό την ταχύτερη αξιοποίηση του [15].



Εικόνα 8: Η δομή του γλυκογόνου.

Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες, όπου και αποθηκεύεται στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή ένυδρων κόκκων διαμέτρου 10 έως 40 nm. Η συγκέντρωσή του είναι υψηλότερη στο ήπαρ παρά στους μύες (10% έναντι 2% w/w), όμως 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 στο σύνολό του. Αντίθετα, στους μύες οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών

των μυών μόνο. Ο ιστός προμηθεύεται με γλυκόζη, που μέσω της γλυκόλυσης θα δώσει το ATP που απαιτείται για την μυϊκή δραστηριότητα.

2.3.2 Ο ρόλος του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο είναι ένα σημαντικό απόθεμα καυσίμων για διάφορους λόγους. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς, το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Ο ρόλος αυτός 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. Σε αντίθεση με τα λιπαρά οξέα, η γλυκόζη μπορεί να επιτρέψει την παροχή ενέργειας απουσία οξυγόνου και έτσι μπορεί να παρέχει ενέργεια για αναερόβια δραστηριότητα.

2.3.3 Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου

Η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι σχετικά απλές διαδικασίες, οι οποίες 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.

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.

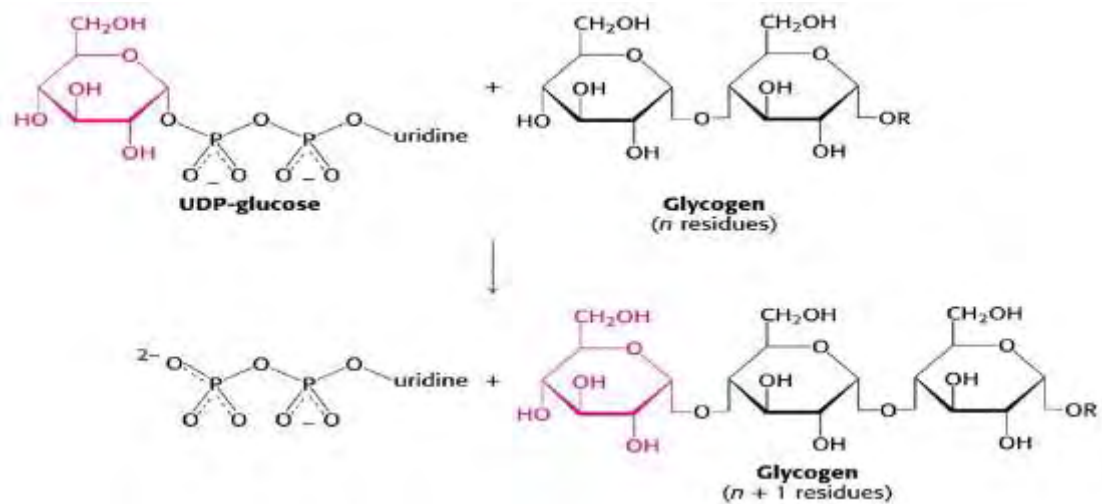
Η **αποικοδόμηση** συνίσταται σε 3 βήματα:

1. Απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο. Το μεγαλύτερο ποσοστό του μορίου του γλυκογόνου αποικοδομείται προς 1-φωσφορική γλυκόζη με τη δράση της φωσφορυλάσης.
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 να μετατραπεί σε ελεύθερη γλυκόζη προς απελευθέρωση στην κυκλοφορία.

α) Σύνθεση του γλυκογόνου

Η σύνθεση του γλυκογόνου απαιτεί ένα μόριο εκκινήτη (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. Η πρωτεΐνη αυτή συνδέει τα πρώτα μόρια γλυκόζης και βρίσκεται στο κέντρο των σφαιριδίων γλυκογόνου. Έπειτα αναλαμβάνουν άλλα ένζυμα τη μεγέθυνση του μορίου όπως ένα ένζυμο διακλάδωσης. Είναι επίσης απαραίτητη η ενεργοποίηση της γλυκόζης σε UDP-γλυκόζη.

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 9**.



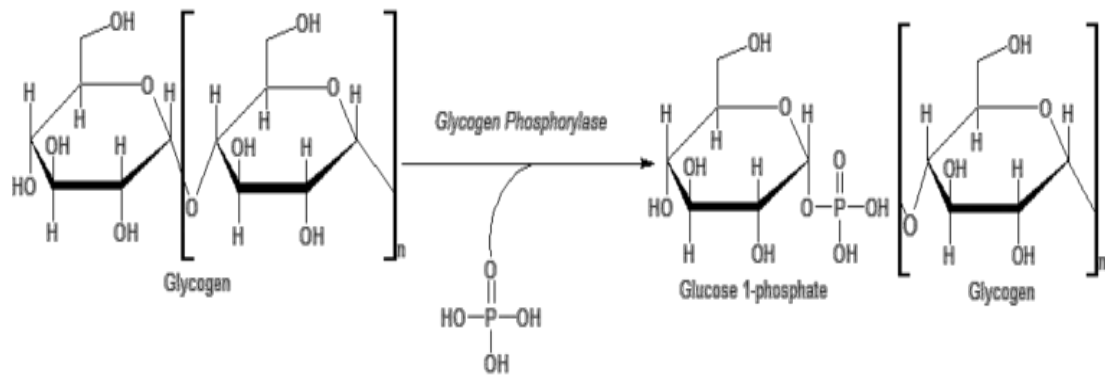
Εικόνα 9: Η σύνθεση του γλυκογόνου.

Η GS καταλύει τη μεταφορά της ενεργοποιημένης γλυκοζυλικής μονάδας από την UDP στο υδροξύλιο του C4 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.

β) 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 (P_i), 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 10**.

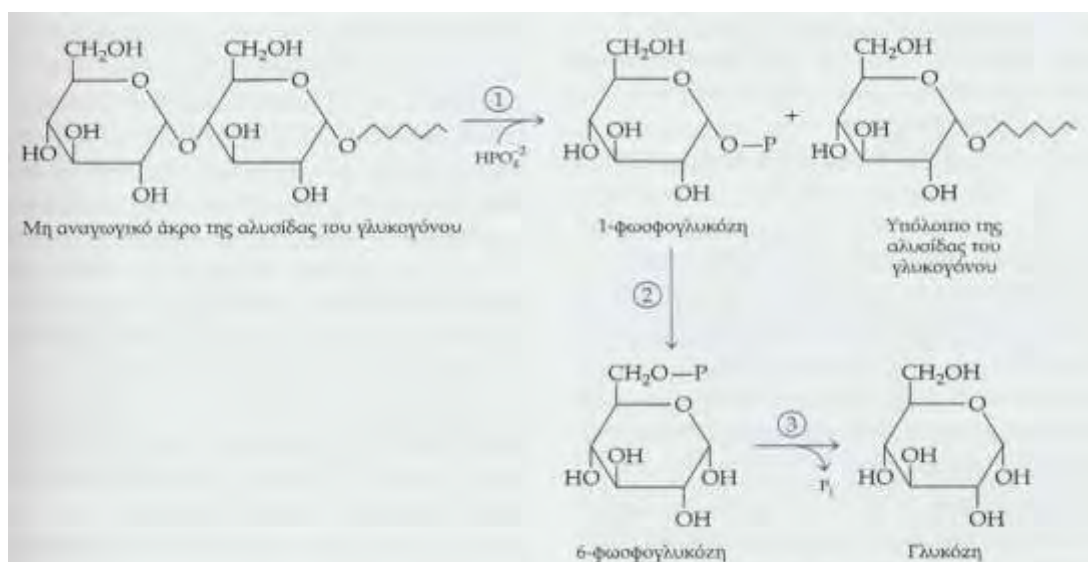


Εικόνα 10: Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου.

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν σε 1-φωσφορική γλυκόζη, η οποία μετατρέπεται αντιστρεπτά σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται.

Η ρύθμιση της δραστηριότητας της GP γίνεται ομοιοπολικά (με φωσφορυλίωση-αποφωσφορυλίωση) ή αλλοστερικά (πρόσδεση αλλοστερικών ενεργοποιητών και αναστολέων). 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 ίδια δεν μπορεί να διασπάσει τους δεσμούς α-1,6 των διακλαδώσεων. Για το σκοπό αυτό, συμμετέχουν και δύο άλλα ένζυμα: μια μεταφοράση ολιγοσακχαριτών και μια γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6 (γνωστή και ως ένζυμο αποδιακλάδωσης). 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 υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης. Στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου συμμετέχει η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), ένα παράγωγο της βιταμίνης B6.

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι αντιστρεπτή *in vitro*. 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 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 [1]. Στην **εικόνα 11** φαίνεται η συνολική διαδικασία της γλυκογονόλυσης.

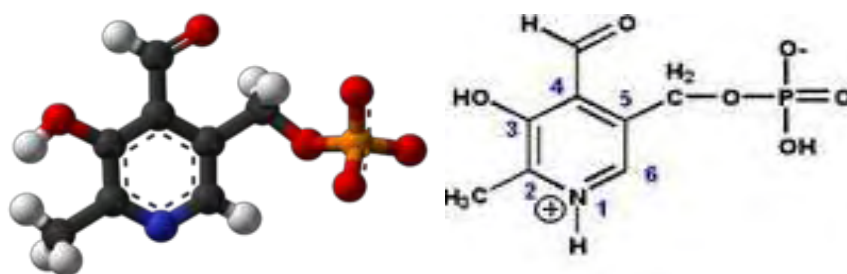


Εικόνα 11: Γλυκογονόλυση. Έλεγχος από γλυκαγόνη (ήπαρ), επινεφρίνη (μυελός επινεφριδίων). Καταλύουν το βήμα 1 (ένζυμο GP που υπόκειται σε ομοιοπολικό και αλλοστερικό έλεγχο). Η διαδικασία σταματά έως να δράσει στους α 1-6 ένα αποδιακλαδωτικό ένζυμο. Το βήμα 3 το υδρολύει η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης που λειτουργεί στα ηπατικά και νεφρικά κύτταρα και όχι στα μυικά και λιπώδη. Επομένως ο μύς και ο λιπώδης ιστός δεν μπορούν να τροφοδοτήσουν με γλυκόζη άλλα σημεία του σώματος.

2.4 Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP)

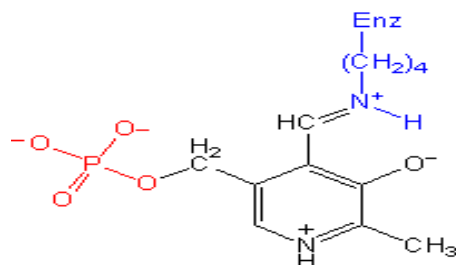
2.4.1 Γενικά

Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP, φωσφορική-5-πυριδοξάλη, P5P) είναι μια προσθετική ομάδα ορισμένων ενζύμων. Είναι από τις 6 βιταμίνες B6 η πιο σημαντική ποσοτικά και βιολογικά, η οποία αποτελείται από τρεις φυσικές οργανικές ενώσεις, την πυριδοξάλη, την πυριδοξίνη και την πυριδοξαμίνη. Η φωσφορική πυριδοξάλη αποτελεί συμπράγοντα πολλών ενζύμων στα οποία περιλαμβάνονται οι τρανσαμινάσες, οι αποκαρβοξυλάσες των α-αμινοξέων και η γλυκογονική φωσφορυλάση.



Εικόνα 12: 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 της PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με την ε-αμινομάδα μιας συγκεκριμένης πλευρικής αλυσίδας λυσίνης στο εκάστοτε ένζυμο (ενεργό κέντρο του).



Εικόνα 13: Δεσμός βάσης Schiff της PLP.

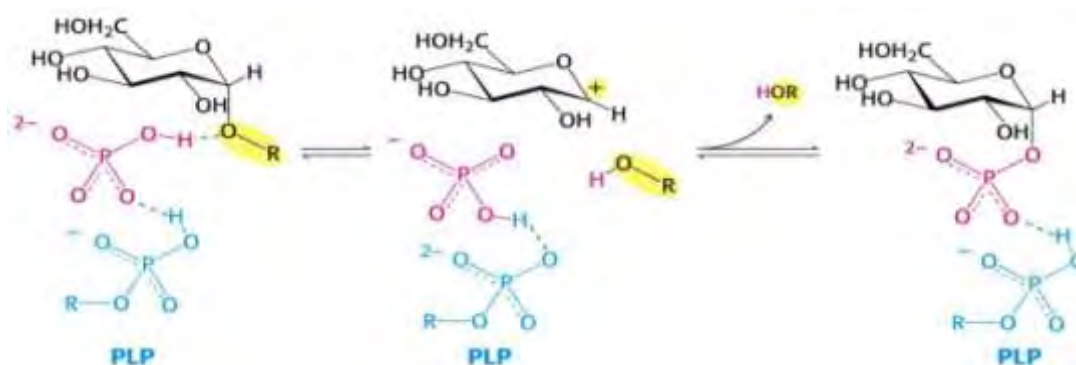
Η PLP χρησιμοποιείται από αμινοτρανσφεράσες (ή τρανσαμινάσες) που δρουν σε ασυνήθιστα σάκχαρα, όπως η περοξαμίνη και σε αυτές τις

αντιδράσεις αντιδρά με το γλουταμινικό οξύ. Είναι επίσης ενεργή στην αντίδραση συμπύκνωσης κατά τη σύνθεση της αίμης. Η PLP παίζει ρόλο στη μετατροπή της ντόπα σε ντοπαμίνη, επιτρέπει τη μετατροπή του διεγερτικού νευροδιαβιβαστή γλουταμινικό στον ανασταλτικό νευροδιαβιβαστή GABA και τέλος επιτρέπει στο SAM να αποκαρβοξυλιωθεί ώστε να σχηματιστεί προπυλαμίνη, πρόδρομο μόριο των πολυαμινών.

2.4.2 Ο ρόλος της PLP στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση διασπά το γλυκογόνο φωσφορολυτικά, με απουσία νερού από το ενεργό κέντρο (για εξοικονόμηση ATP) το οποίο απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης

Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C1 (ο χαρακτηρισμός α σημαίνει ότι το άτομο οξυγόνου που συνδέεται με τον C1 είναι κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου), πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C1 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 14**).



Εικόνα 14: Μηχανισμός οξειοβασικής κατάλυσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα HPO_4^{2-} (μόβ) 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 (P5P). 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 (O4) 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 [1].

2.5 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

2.5.1 Γενικά

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα από τα κυριότερα φωσφορολυτικά ένζυμα. Ανήκει στην τάξη των τρανσφερασών, στην υπόταξη των γλυκοζυλοτρανσφερασών και στην υπό-υπόταξη 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 και βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ότι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B₆. Με βάση διάφορα πειράματα που έγιναν στο παρελθόν, αποδείχτηκε ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστικότητα του ενζύμου. Από την άλλη, 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.

Μεταλλάξεις στα γονίδια της GP των μυών και του εγκεφάλου οδηγούν σε διάφορες νόσους, όπως η νόσος McArdle's (πάνω από 65 μεταλλάξεις στο

γονίδιο της μυϊκής φωσφορυλάσης έχει ως κύριο σύμπτωμα την αδυναμία των μυών και τη μυαλγία). Αυτή η νόσος οφείλεται σε έλλειψη ενός ενζύμου του μεταβολισμού του γλυκογόνου, συγκεκριμένα της GP, ενώ η συνθετάση του γλυκογόνου λειτουργεί κανονικά. Χαρακτηρίζεται από ύπαρξη αυξημένης ποσότητας γλυκογόνου στους μυς, αδυναμία διάσπασής του και τα άτομα που την παρουσιάζουν έχουν περιορισμένη δυνατότητα για έντονη άσκηση εξαιτίας οδυνηρών σπασμών των μυών. Κατά τα άλλα οι ασθενείς αυτοί δεν έχουν πρόβλημα και η ανάπτυξή τους είναι φυσιολογική. Άλλη μία νόσος είναι αυτή του Her, στην οποία συμβαίνουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της ηπατικής φωσφορυλάσης και ένα από τα συμπτώματα είναι η υπογλυκαιμία. Η ισομορφή του εγκεφάλου έχει προταθεί σαν βιοδείκτης για τον καρκίνο του γαστρικού.

2.5.2 Δομή

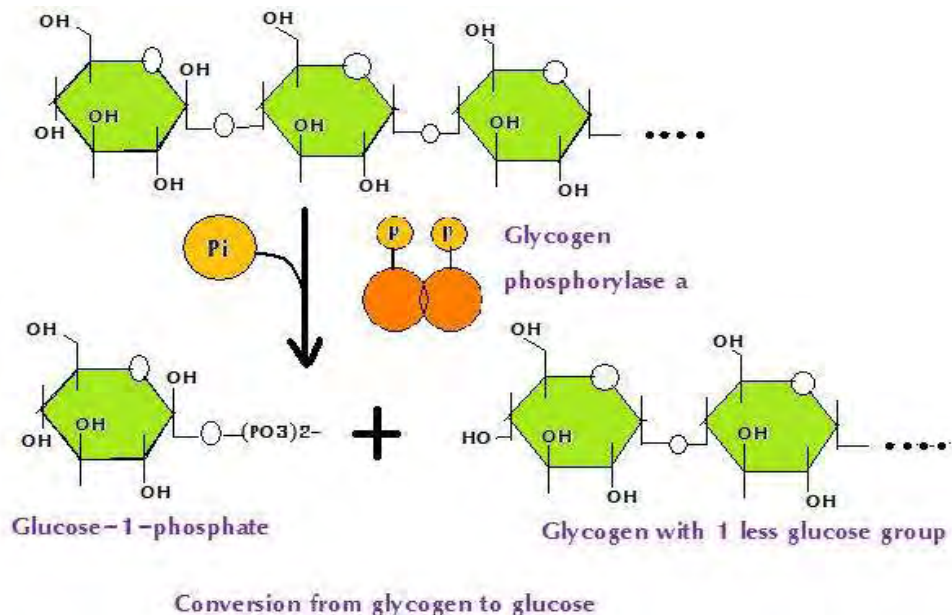
Η GP είναι μια ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97.434kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα.

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

2.5.3 Μηχανισμός δράσης

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ενεργοποιείται σε καταστάσεις έλλειψης γλυκόζης, ως απόκριση στην ορμόνη γλυκαγόνη. Το σήμα της έλλειψης γλυκόζης στο αίμα μεταβιβάζεται μέσα στα κύτταρα μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει μια σειρά από φωσφορυλιώσεις πρωτεϊνών με

τελευταίο το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Αυτή αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης και ελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη η οποία λαμβάνει χώρα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (**Εικόνα 15**). 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 H₂O. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) 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 15: 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).

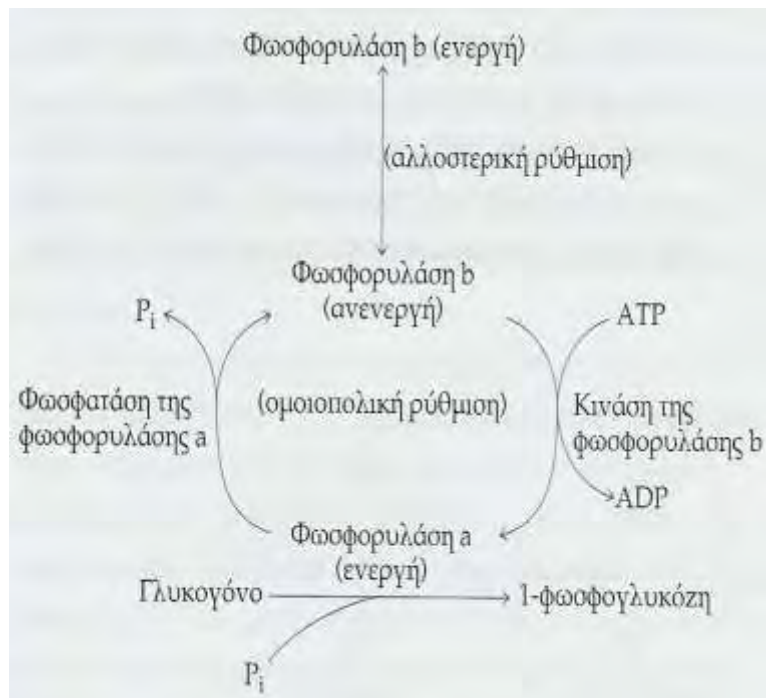
2.5.4 Ρύθμιση

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ρυθμίζεται με διάφορους **αλλοστερικούς τροποποιητές** (που σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου) και με την **αντιστρεπτή φωσφορυλίωση** (ως απόκριση σε ορμονικά σήματα, όπως της ινσουλίνης, της γλυκαγόνης και της επινεφρίνης).

Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατροπόμενες μορφές: μια συνήθως ενεργή **φωσφορυλάση a** και μια συνήθως ανενεργή **φωσφορυλάση b**. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα.

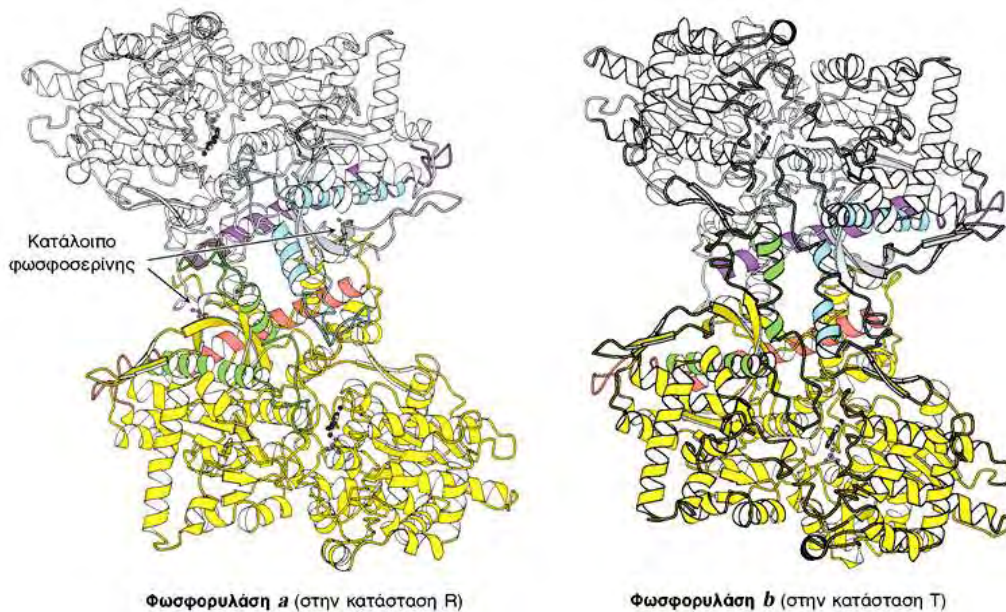
Η ομοιοπολική ρύθμιση επηρεάζεται από την επινεφρίνη (γλυκογονόλυση στους μύες) και τη γλυκαγόνη (ήπαρ). Δρουν μέσω της ενεργοποίησής της, δηλαδή μέσω της προώθησης του σχηματισμού της ενεργής a μορφής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Αυτή η ορμονική ενεργοποίηση της κινάσης της φωσφορυλάσης b πραγματοποιείται μέσω του cAMP, η κυτταρική συγκέντρωση του οποίου αυξάνεται με την δράση αυτών των ορμονών. Οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις μπορεί να επηρεάσουν τη βιολογική δράση των πρωτεϊνών. Η δράση ορισμένων ενζύμων μπορεί να ρυθμιστεί με προσθήκη φωσφορικών ομάδων σε υδροξυλομάδες πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων όπως η σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη. Η σύνδεση των φωσφορικών ομάδων μεταβάλλει τη δομή του ενζύμου έτσι ώστε αυτό να μεταπέσει από μία ανενεργό μορφή σε ενεργό, ή αντίστροφα.

Πιο συγκεκριμένα, η **κινάση** της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση ρυθμίζοντας φυσιολογικά τη δραστικότητα της GP. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου Ca^{2+} προκαλεί φωσφορυλίωση της GP στη σερίνη 14 της κάθε υπομονάδας οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα, μία ειδική **πρωτεϊνική φωσφατάση** υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP). Στην **εικόνα 16** παρουσιάζεται η ομοιοπολική και η αλλοστερική ρύθμιση της GP.



Εικόνα 16: Η ομοιοπολική και η αλλοστερική ρύθμιση της GP. Το ένζυμο που προσθέτει την φωσφορική ομάδα στη φωσφορυλάση είναι κινάση της φωσφορυλάσης ενώ η απομάκρυνσή της γίνεται από την πρωτεϊνική φωσφατάση.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Changeux και Wyman. Οι δύο μορφές της (a και b) βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όπως προαναφέρθηκε. Η T μορφή, με φωσφορυλίωση ή με την πρόσδεση κάποιων τροποποιητών, ευνοεί την κατάσταση R ενώ η R μορφή, με απόσπαση της φωσφορικής ομάδας ή με την πρόσδεση κάποιων άλλων τροποποιητών, μεταπίπτει στην T μορφή (**Εικόνα 17**). Η μετάβαση από την κατάσταση T στην R συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α-έλικες, οι οποίες μετακινούν μια θηλιά έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό είναι καλά οργανωμένη.



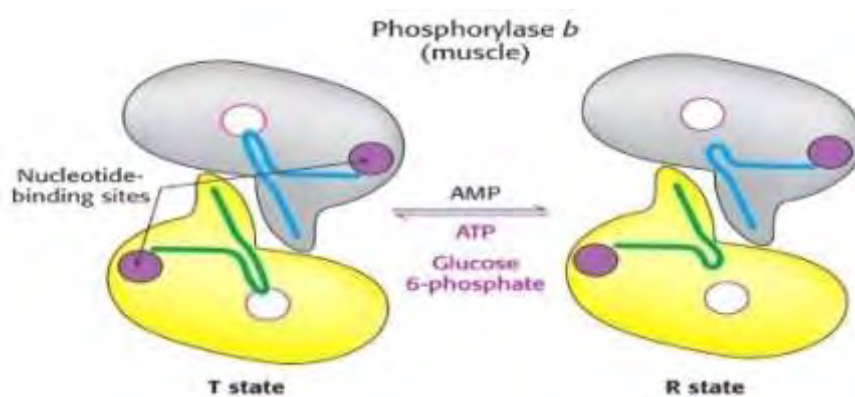
Εικόνα 17: Δομή της φωσφορυλάσης *a* και *b*. Η φωσφορυλάση *a* φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο Ser14 κάθε υπομονάδας. Αυτή η τροποποίηση ευνοεί τη δομή της περισσότερο ενεργής R διαμόρφωσης. Η μία υπομονάδα φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα φαίνεται με κίτρινο χρώμα με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση *b* δεν είναι φωσφορυλιωμένη και υπάρχει κυρίως στην T διαμόρφωση.

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

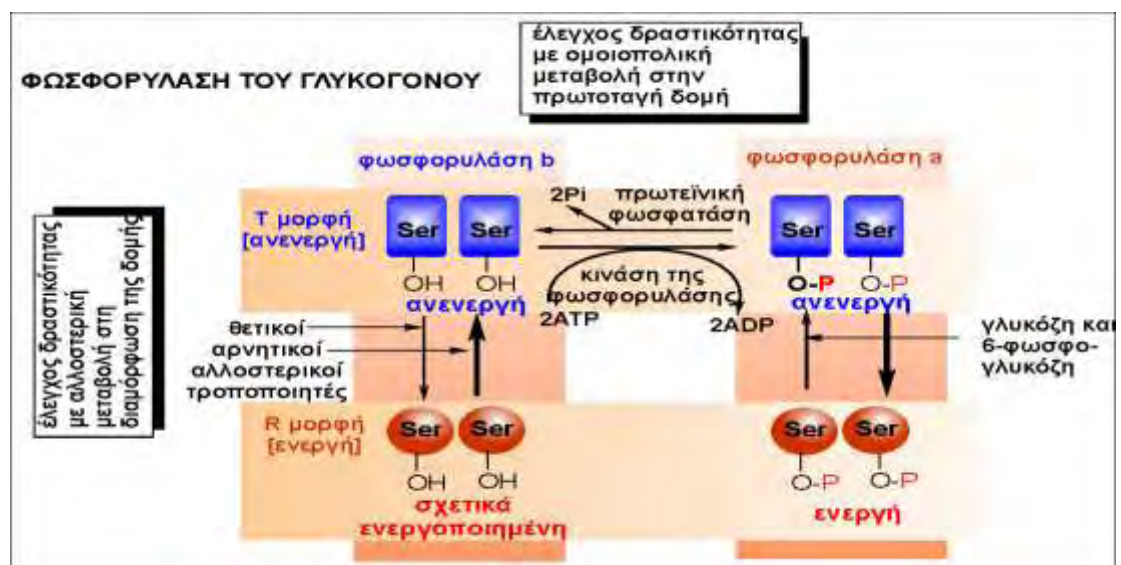
Η μυϊκή φωσφορυλάση *b* είναι ενεργή μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP (θετικός τροποποιητής ο οποίος προκαλεί μία μορφολογική τροποποίηση της ανενεργής *b* μορφής σε ενεργή *a* μορφή), η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης *b* στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Τα υψηλά επίπεδά του εμποδίζουν την μετατροπή του ενζύμου από την ανενεργή στην ενεργή μορφή.

Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης *b* από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η φωσφορυλάση *b* είναι

ανενεργή λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα η **φωσφορυλάση a** είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP, του ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης (**Εικόνα 18**). Η απουσία της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης στους μύς εξασφαλίζει την παραμονή της 6-φωσφορικής γλυκόζης που παράγεται από το γλυκογόνο μέσα στο κύτταρο για μετασχηματισμό σε ενέργεια. Στις αλλοστερικές τροποποιήσεις δεν πραγματοποιούνται ομοιοπολικές τροποποιήσεις μέσω φωσφορυλίωσης [1].

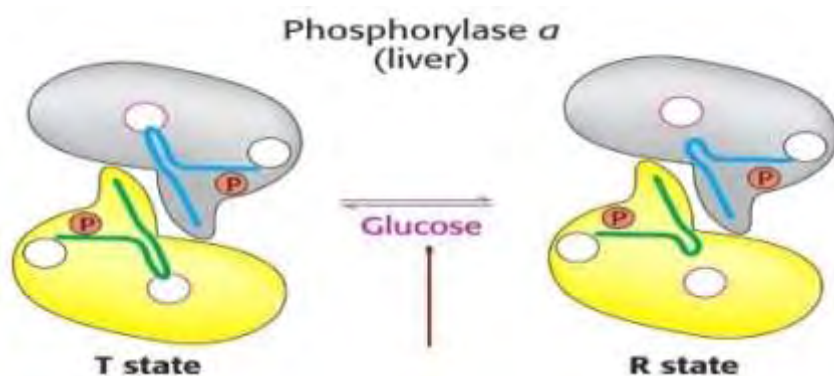


Εικόνα 18: Αλλοστερική ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης. Ένα χαμηλό ενεργειακό φορτίο που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP, ευνοεί την μετάβαση στη μορφή R.



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση ενεργής και ανενεργής φωσφορυλάσης.

Η ρύθμιση της δράσης της **φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ήπατος** διαφέρει σημαντικά από εκείνη των μυών, λόγω του ρόλου του ήπατος στην ομοιόσταση της γλυκόζης για τον οργανισμό στο σύνολό του. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση *a* και όχι η *b* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης *a* από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο (**Εικόνα 20**). 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 [1].



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

2.5.5 Κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Οι κρυσταλλικές δομές της GP_a και της GP_b (T και R διαμόρφωση) προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990 από τους Barford και Johnson. Οι μελέτες αυτές απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP περιέχουν μεγάλα ποσοστά νερού (γύρω στο 48%) το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Αυτό συμβαίνει γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών

μορίων είναι τέτοια ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους.

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 δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής) μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου περιέχει 6 κέντρα σύνδεσης:

A) Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14

Το κέντρο αυτό είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή a στη μορφή b. Εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων. Κεντρικό ρόλο έχει η Ser 14, η οποία φωσφορυλιώνεται και οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο του ενζύμου. Στην GPb, αυτά τα αμινοξέα είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στη GPa έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των 2 υπομονάδων [1].

B) Το αλλοστερικό κέντρο

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 [1].

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å περίπου από την Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις 2 διαμορφώσεις, T και R, της GPb και της GPα. 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, SO₄²⁻) τη δράση του ενζύμου ευνοώντας την R μορφή της μη φωσφορυλιωμένης φωσφορυλάσης b , είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν, πουρίνες όπως η καφεΐνη και η D γλυκόζη, υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες) τη δράση του ενζύμου και ευνοούν την T μορφή της. Παρόμοια δράση ασκούν η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺ .Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP, όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων [16]. Η GPα επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για τα ATP, ADP και την G6P [1].

Γ) Το καταλυτικό κέντρο

Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη (φυσιολογικός αναστολέας), που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική Τ διαμόρφωση [1].

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 Τ 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 Τ 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 [16].

Δ) Το κέντρο αναστολής

Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την Τ διαμόρφωση.

Όταν συνδεθεί στη φωσφορυλιωμένη μορφή του ενζύμου (τη φωσφορυλάση a) μια γλυκόζη ή μια 6-φωσφογλυκόζη, η R φωσφορυλιωμένη μορφή μεταπίπτει στην Τ φωσφορυλιωμένη μορφή, που είναι ανενεργή. Όταν συνδεθεί μια 6-φωσφογλυκόζη, τότε επιπλέον, προσδένεται η φωσφορυλάση a στην πρωτεϊνική φωσφατάση και υδρολύεται η φωσφορική της ομάδα, μετατρέπόμενη σε φωσφορυλάση b (ανενεργή) [1].

Βρίσκεται κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου και όταν δεχθεί καφεΐνη, πουρίνες, νουκλεοζίτες, νουκλεοτίδια π.χ. AMP, IMP ή κάποιες άλλες ενώσεις (π.χ. το FMN) αναπτύσσει σχετική παρεμπόδιση στη σύνδεση του υποστρώματος, δίνοντας ένα πολύ λίγο δραστικό μη φωσφορυλιωμένο ένζυμο. Περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (13-484 αα), καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (485-842 αα) [1,16].

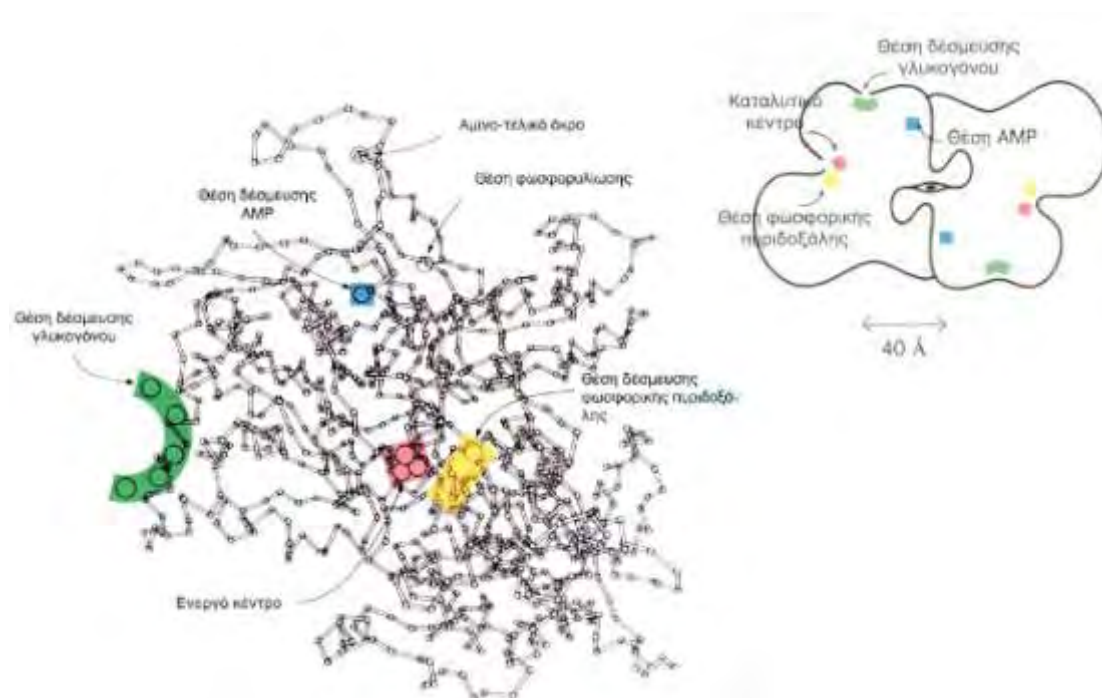
Στην T διαμόρφωση, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού, που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχθεί ότι: πουρίνες όπως η αδενίνη, νουκλεοσίδια όπως η αδενοσίνη και η ινοσίνη, φωσφονουκλεοτίδια όπως το AMP, το IMP και το ATP, το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σωμάτια, συνδέονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GP_a και GP_b, όχι όμως και στη ηπατική GP_a, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα. 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 [16].

E) 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 [16].

ΣΤ) Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Είναι ένα αλλοστερικό κέντρο επαφής με την άλλη υπομονάδα. Εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPb [16].



Εικόνα 21: Δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και των θέσεων πρόσδεσης των υποστρωμάτων και ρυθμιστών.

Ανακεφαλαιώνοντας, η T μορφή δείχνει μικρή συγγένεια για το υπόστρωμα και τους θετικούς αλλοστερικούς τροποποιητές και μεγάλη συγγένεια για τους αναστολείς. Αντίθετα η R μορφή δείχνει μεγάλη συγγένεια για το υπόστρωμα και τους θετικούς αλλοστερικούς τροποποιητές και μικρή συγγένεια για τους αναστολείς.

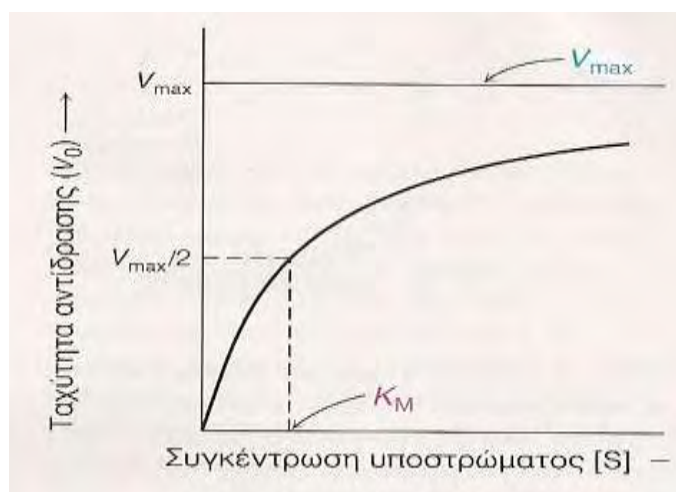
Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας της σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των φωσφορικών ιόντων Pi. Η μείωση αυτή εκφράζεται ως αναστολή, σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) δρουν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή, διότι η σύνδεση τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος και συνεπώς τη φυσιολογική δράση του ενζύμου. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτής της αναστολής, ο αναστολέας δεσμεύεται στο καταλυτικό κέντρο και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

2.6 Κινητική ενζύμων και ενζυμική αναστολή

2.6.1 Γενικά

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 22**. 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.



Εικόνα 22: 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}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α-D-Glc-1-P).

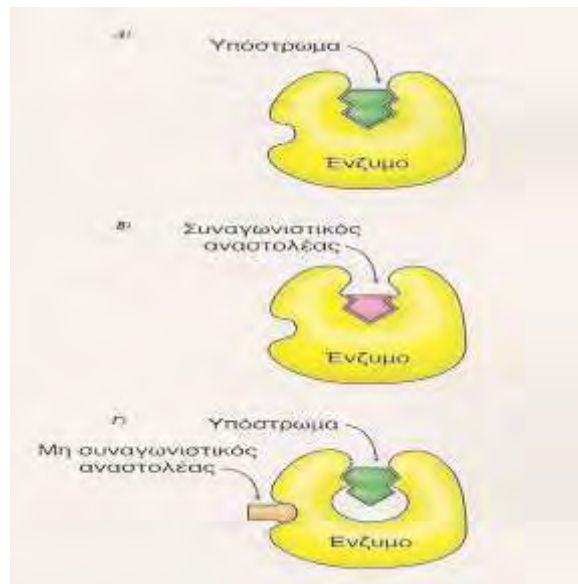
Η δραστηριότητα πολλών ενζύμων μπορεί να ανασταλεί από την πρόσδεση ειδικών μικρών μορίων ή ιόντων. Ως αναστολείς (παρεμποδιστές, inhibitors) θεωρούνται ουσίες οι οποίες, σε χαμηλή συγκέντρωση, ελαττώνουν της ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, έχοντας την ικανότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με το ένζυμο και να παρεμποδίζουν τη δράση του. Οι αναστολείς λειτουργούν εκλεκτικά, αλληλεπιδρώντας με λίγες και συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης επί του ενζυμικού μορίου. 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. Στην περίπτωση αυτή, ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του δραστικού ενζύμου.

Σε αντίθεση, η **αντιστρεπτή αναστολή** χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος οπότε το ένζυμο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστικότητά του όταν αφαιρεθεί ο αναστολέας. Ο βαθμός αναστολής της ενζυμικής αντιδράσεως παρουσία αναστολέα παραμένει σταθερός τουλάχιστον για το αρχικό στάδιο της αντιδράσεως, και εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις αναστολέα, ενζύμου και υποστρώματος.

Στην κλασική ενζυμική κινητική διακρίνονται διάφορα είδη αντιστρεπτής αναστολής όπως: συναγωνιστική, μη συναγωνιστική, ανταγωνιστική, μικτή, μερική, υποστρώματος, προϊόντος και αλλοστερική. Όλες διακρίνονται μεταξύ τους μέσω κινητικής μελέτης που βασίζεται στην αρχική αντίδραση (**Εικόνα 23**).

Στην εφαρμοσμένη ενζυμολογία πάλι, το ενδιαφέρον εστιάζεται κυρίως στην ολική αντίδραση και την επίδραση του αναστολέα σε αυτή και πολύ λιγότερο στο μηχανισμό αναστολής [1].



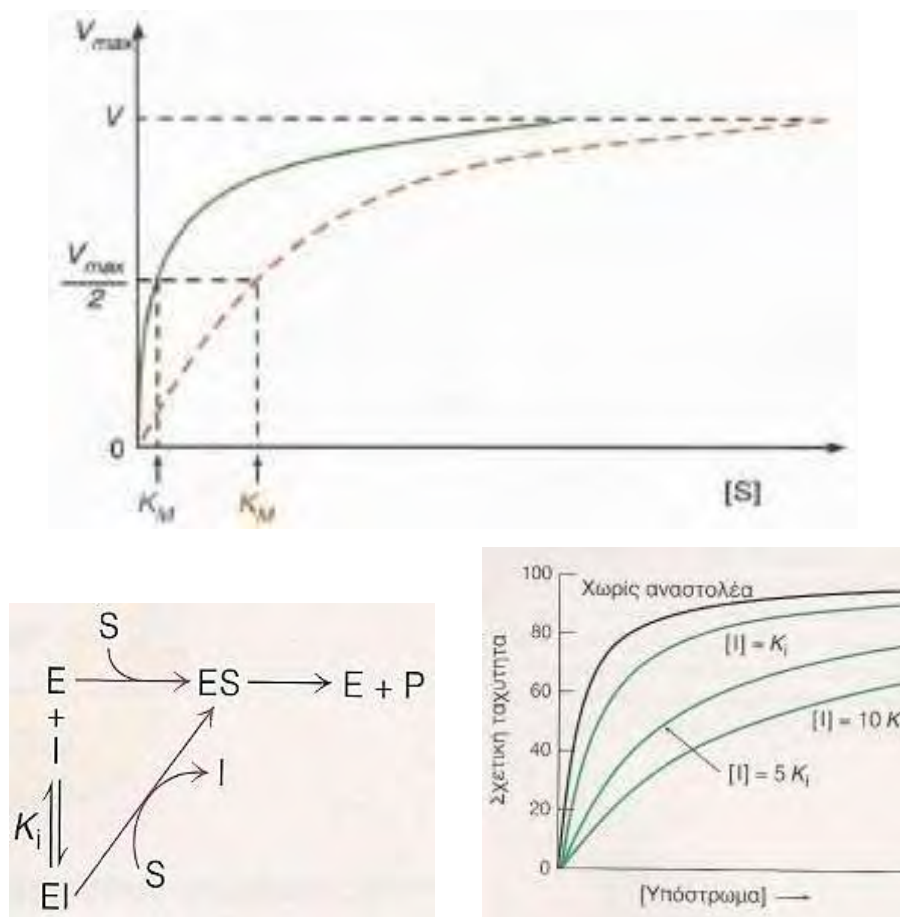
Εικόνα 23: Διάκριση μεταξύ ενός συναγωνιστικού και ενός μη συναγωνιστικού αναστολέα. Α) Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος απουσία αναστολέα. Β) Συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το υπόστρωμα δεν συνδέεται. Γ) Μη συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται σε σημείο διαφορετικό με το ενεργό κέντρο. Το υπόστρωμα συνεχίζει να συνδέεται, αλλά το ένζυμο δεν καταλύει την αντίδραση λόγω της παρουσίας του αναστολέα.

2.6.2 Συναγωνιστική και μη συναγωνιστική αναστολή του ενζύμου

Οι παραπάνω περιπτώσεις αφορούν μόρια-αναστολείς που δεσμεύονται κατά τρόπο αντιστρέψιμο με το ένζυμο και παρεμποδίζουν την καταλυτική του αντίδραση. Ωστόσο, το ένζυμο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστηριότητά του μετά την απομάκρυνση του αναστολέα. Αν στην αντίδραση είναι παρών ένας αναστολέας I, τότε η ταχύτητα της υπό αναστολή ενζυμικής αντίδρασεως δίνεται από τις σχέσεις που παρουσιάζονται στη συνέχεια, ανάλογα με τον τύπο της αναστολής.

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 δομικά με το υπόστρωμα και προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η πρόσδεση του υποστρώματος (**Εικόνα 24**). Δηλαδή αναστολέας και υπόστρωμα συναγωνίζονται για την ίδια θέση του ενζύμου. 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.



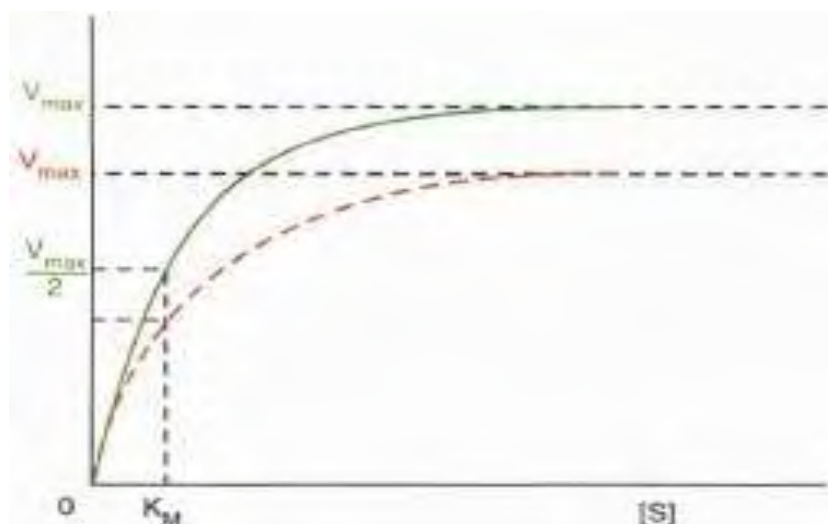
Εικόνα 24: Κινητική ενός συναγωνιστικού αναστολέα. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα, απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος για να επιτευχθεί μια ιδιαίτερη ενζυμική ταχύτητα. Η πορεία της αντίδρασης υποδηλώνει πόσο υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να υπερνικηθεί η συναγωνιστική αναστολή.

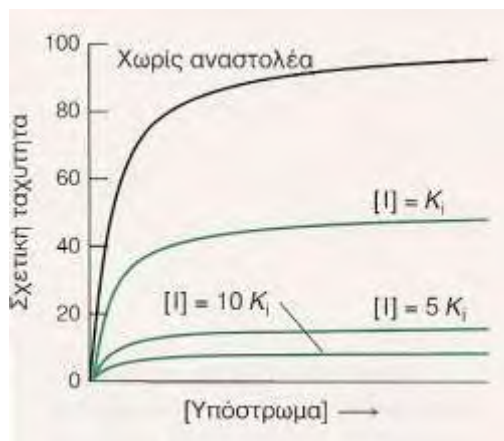
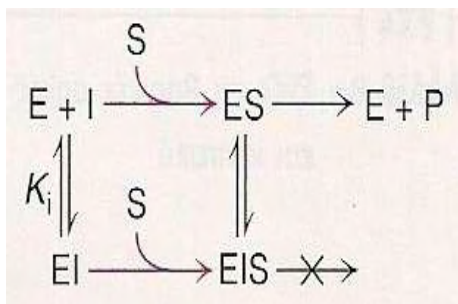
Στη μη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα μπορούν να προσδεθούν ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου (ESI), σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης, σχηματίζοντας ένα καταλυτικό (αδρανές) σύμπλοκο. Ο μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων

ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα (**Εικόνα 25**). Συνεπώς, η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος.

Αρχικά, το σύμπλοκο ES σχηματίζεται μέσω διαφορετικών οδών και δεν ισχύει η υπόθεση ότι το στάδιο ελέγχου (περιορισμού) της αντιδράσεως καθορίζεται από τη σταθερά k_3 . Είναι εμφανές ότι η ταχύτητα ενζυμικής αντιδράσεως υπό μη συναγωνιστική αναστολή ουδέποτε θα φθάσει την τιμή V_{max} της αντιδράσεως χωρίς αναστολή. Η διαφορά μεταξύ της κινητικής χωρίς αναστολή, είναι ότι στη μη συναγωνιστική αναστολή η παρουσία αναστολέα συγκεντρώσεως $[I]$ μειώνει τη μέγιστη ταχύτητα V_{max} κατά $1 + ([I]/K_i)$, ενώ η K_m παραμένει αμετάβλητη. Αντίθετα, στη συναγωνιστική αναστολή η σταθερά K_m αυξάνεται κατά την ίδια ποσότητα, $1 + ([I]/K_i)$. Συνεπώς, είναι αδύνατον να φανεί το είδος της αναστολής με βάση την εικόνα της ολικής αντιδράσεως, κάτι που είναι εφικτό εάν εφαρμοσθεί κινητική μελέτη χρησιμοποιώντας αρχική ταχύτητα αντιδράσεως.

Η μη συναγωνιστική αναστολή αποτελεί υποπερίπτωση της ονομαζόμενης μικτής αναστολής (mixed inhibition) στην οποία τα δύο ενζυμικά σύμπλοκα έχουν διαφορετικές σταθερές K_i .





Εικόνα 25: 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.

Συμπερασματικά, η ποιοτική διαφορά μεταξύ μη αντιστρεπτής και μη συναγωνιστικής αναστολής είναι η μη αντιστρεψιμότητα της ελάττωσης της ενζυμικής δραστηριότητας (πρακτικά της συγκεντρώσεως δραστικού ενζύμου) στην πρώτη περίπτωση, σε αντίθεση με την δεύτερη. Ποσοτικές διαφορές μεταξύ μη συναγωνιστικής και μη αντιστρεπτής αναστολής είναι, (α) κάθε αντιστρεπτή αναστολή εμφανίζεται γρήγορα από την αρχική φάση I της αντιδράσεως κατά την ισορροπία μεταξύ E, S και I, ενώ η μη αντιστρεπτή αναστολή εξελίσσεται αργά και σταδιακά, εκτείνεται στη φάση II της αντιδράσεως και ολοκληρώνεται εφόσον έχει χρησιμοποιηθεί όλη η ποσότητα αδρανοποιητή ή ενζύμου, και (β) η ποσότητα κατά την οποία ελαττώνεται στις δύο περιπτώσεις η V_{max} είναι διαφορετική, αντίστοιχα κατά $1 + ([I]/K_i)$ και $[E_t]\{1 - ([I]/[E_t])\}$, ενώ η K_m παραμένει αμετάβλητη [1].

2.7 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. Οι σημερινές προληπτικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση του ΣΔ2 δεν επιτυγχάνουν ικανοποιητικό έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα και γι' αυτό το λόγο

υπάρχει ένα συνεχές ενδιαφέρον τόσο από την ακαδημαϊκή κοινότητα όσο και από τις φαρμακοβιομηχανίες, για την ανάπτυξη και την παραγωγή νέων αντιδιαβητικών φαρμάκων.

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, συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας καθώς επίσης και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας.

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

Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP του οργανισμού (ηπατικής, μυϊκής, εγκεφαλικής), 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 [16].

2.8 Ρόδι

Το ρόδι είναι ένας φαγώσιμος καρπός που άρχισε να γίνεται δημοφιλής τα τελευταία χρόνια για τις ευεργετικές του ιδιότητες. Παραδοσιακά, το ρόδι αποτελεί σύμβολο ευτυχίας και καλοτυχίας, γι' αυτό πολλά γούρια την πρωτοχρονιά έχουν σχήμα ροδιού. Σαν συμβολική κίνηση γονιμότητας, από τους Ελληνιστικούς χρόνους έως και σήμερα, σπάμε ένα Ρόδι στο πάτωμα σε γάμους και την πρωτοχρονιά ως ένδειξη αφθονίας, γονιμότητας και καλής τύχης [17α]. Επίσης ήταν το έμβλημα των Ελευσίνιων Μυστηρίων και καταγράφηκε ακόμα και στη μυθολογία. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι το έθαβαν μαζί με τους νεκρούς τους ενώ αποτελεί ένα από τα τρία «ευλογημένα φρούτα» του Βουδισμού. Χρησιμοποιήθηκε ως διακοσμητικό στοιχείο στο ναό του Σολομώντα και στους μανδύες των ιερέων και αναφέρεται στο Άσμα Ασμάτων στην Παλαιά Διαθήκη [17β].



Εικόνα 26: Το ρόδι.

Το ρόδι πρωτοεμφανίστηκε στην κεντρική Ασία και συγκεκριμένα στην Περσία. Είναι ένα από τα πρώτα φρούτα καλλιέργειας και η βοτανική ονομασία του είναι *Punica granatum*. Η ροδιά είναι ένα μικρό φυλλοβόλο δέντρο με γυαλιστερά φύλλα και πορτοκαλοκίτρινα λουλούδια. Πολλές φορές μοιάζει με θάμνο και είναι αυτογόνιμη. Αναπτύσσεται περίπου στα μέσα Απριλίου και οι περισσότερες ποικιλίες ροδιάς ωριμάζουν τέλη Σεπτεμβρίου με αρχές Οκτωβρίου. Οι καρποί της συλλέγονται το φθινόπωρο και αντέχουν έως 8 εβδομάδες στο ψυγείο στους 5 °C. Μια νέα ροδιά αρχίζει να παράγει καρπούς μετά τον 3 με 4 χρόνο. Τα άνθη της μπορεί να είναι λευκά ή κόκκινα

ανάλογα την ποικιλία. Ο καλύτερος καρπός παράγεται από τα πρώιμα άνθη πιθανόν γιατί αναπτύσσονται κατά την διάρκεια πιο ευνοϊκών μετεωρολογικών συνθηκών. Είναι φυτό ανθεκτικό στη ζέστη, στην ξηρασία και στην έλλειψη φροντίδας και προσαρμόζεται εύκολα σε διαφορετικά εδάφη. Αντέχει ακόμη και πότισμα με υφάλμυρο νερό. Όμως για ικανοποιητική ποσοτική και ποιοτική παραγωγή χρειάζεται εδάφη πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, βαθιά και αμμοαργιλώδη (με pH 5.5-7.0) ενώ και τα ποτίσματα θα πρέπει να είναι τακτικά. Στα ξηρά εδάφη οι καρποί γίνονται μικροί χωρίς χυμούς και σκίζεται ο φλοιός τους, ενώ σε βαριά πηλώδη ο καρπός δεν χρωματίζεται ικανοποιητικά. Το δένδρο της ροδιάς υφίσταται ζημιά σε θερμοκρασίες μικρότερες από 8-10 βαθμούς υπό του μηδενός. Όσο θερμότερη είναι η περιοχή καλλιέργειας τόσο καλύτερης ποιότητας γίνονται οι καρποί, παρόλο που τα δένδρα αναπτύσσονται και ανθίζουν και σε ημισκιερά μέρη. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε περιοχές με υψόμετρο 800-1200m όταν φυτεύεται σε θέσεις με νοτιοανατολική έκθεση. Η ροδιά θέλει σταθερή υγρασία εδάφους αλλιώς θα σκάσει ο καρπός. Το κλάδεμα αποσκοπεί στον καλό φωτισμό και αερισμό του δένδρου. Τα φρούτα της είναι στρογγυλά, κόκκινα (ή κίτρινα όταν ωριμάσουν) και γεμάτα με σπόρους[17α,β].

Υπάρχουν τόσο ξένες όσο και ελληνικές ποικιλίες. Ξένες ποικιλίες ροδιάς είναι οι: angel red, balegal, crab, cloud, early wonderful, fleshman, francis, granada, green globe, home, king, phoenicia, sweet, utah sweet και η wonderful. Από την άλλη οι ελληνικές ντόπιες ποικιλίες ροδιάς χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες: α) Ξυνοροδιές, β) Γλυκές ροδιές και γ) Καλλωπιστικές ροδιές [17γ].

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ρόδι ποικιλίας Wonderful. Αυτή είναι η πιο διαδεδομένη παγκοσμίως ποικιλία ροδιού. Δίνει καρπούς πολύ μεγάλου μεγέθους, με σχήμα πεπλατυσμένο, πορφυρού χρώματος και επιδερμίδα σκληρή μέσου πάχους. Οι καρποί της είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται για χυμό. Οι σπόροι είναι μαλακοί, βυσσινοί χρώματος, χυμώδης με ωραία γεύση και πολύ καλή ποιότητα. Τα δένδρα αυτής της ποικιλίας είναι πολύ ζωηρά και παραγωγικά με ύψος που φτάνει τα 6 μέτρα. Τα ρόδια της ποικιλίας Wonderful ωριμάζουν στα τέλη Σεπτεμβρίου με αρχές Οκτώβριου σε

περιοχές με ήπιο κλίμα. Σε βόρειες περιοχές η ωρίμανση είναι πιο όψιμη και μπορεί να κυμανθεί από αρχές Οκτωβρίου έως αρχές Νοεμβρίου. Η ποικιλία αυτή προσαρμόζεται σε διάφορα περιβάλλοντα και γι' αυτό καλλιεργείται σε πολλά μέρη του κόσμου. Δυστυχώς σε περιοχές με ψυχρό κλίμα ο καρπός δεν προλαβαίνει να ωριμάσει εγκαίρως και με τους πρώιμους παγετούς του χειμώνα εμφανίζεται έντονο σκάσιμο στους καρπούς κάτι που τους κάνει μη εμπορεύσιμους για νωπή κατανάλωση παρά μόνο για μεταποίηση. Έτσι, οι καρποί αγοράζονται σε πολύ χαμηλές τιμές μεταξύ 0,30 -0,50 ευρώ το κιλό.

Η ποικιλία Wonderful καλλιεργήθηκε πρώτη φορά στην Καλιφόρνια το 1896 και έπειτα στη Νότιο Αφρική, που είναι διαθέσιμη από το Μάρτιο έως τον Ιούνιο. Στην Ελλάδα έχουν γίνει μαζικές φυτεύσεις με την ποικιλία Wonderful. Η ποικιλία αυτή έχει αναπτυχθεί κατά κύριο λόγο στη Θεσσαλία και στην Μακεδονία σε έκταση που ίσως να υπερβαίνει τα 5.000 στρέμματα. Μειονέκτημα της ποικιλίας θεωρείται ότι ο χυμός της είναι ημίγλυκος, με οξέα 1,8% [17γ,δ,ε,στ].



Εικόνα 27: Ποικιλία *Wonderful*.

Το ρόδι είναι πλούσιο σε βιταμίνες (Α, C, E, φυλλικό οξύ), σίδηρο, κάλιο και φυτικές ίνες, ενώ είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε θερμίδες. Μάλιστα, ένα ρόδι καλύπτει το 40% της ποσότητας της βιταμίνης C και το 25% του φυλλικού οξέος που έχει καθημερινά ανάγκη ένας ενήλικος. Είναι πλούσιο σε τρεις διαφορετικές μορφές αντιοξειδωτικών ουσιών (τανίνες, ανθοκυανίνες, ελλαγικό οξύ) και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητά του έχει υπολογιστεί ότι

είναι 2-3 φορές μεγαλύτερη από αυτήν του κόκκινου κρασιού ή του πράσινου τσαγιού. Σε πρόσφατη μελέτη, φάνηκε ότι το ρόδι και οι διάφορες ποικιλίες μούρων έχουν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε κυτταρικό επίπεδο, σε σύγκριση με άλλα 25 φρούτα που εξετάστηκαν [17β].

Χάρη στις αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις, αντιβηχικές, στυπτικές, επουλωτικές και αντιδιαρροϊκές του ιδιότητες, ο χυμός του ροδιού χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς σκοπούς εδώ και αιώνες. Σε προκαταρκτικές κλινικές έρευνες σε ανθρώπους, βρέθηκε ότι ο χυμός του ροδιού είναι αποτελεσματικός στη μείωση του κινδύνου από παθήσεις της καρδιάς, αρτηριοσκλήρωση και καρδιαγγειακά νοσήματα εμποδίζοντας την οξείδωση της «κακής» χοληστερίνης (LDL) καθώς φαίνεται να μειώνει και τα επίπεδα της ολικής και της «κακής» χοληστερίνης σε διαβητικούς ασθενείς με υπερλιπιδαιμία. Σε μία περιορισμένη έρευνα σε υπερτασικούς ασθενείς, βρέθηκε ότι η κατανάλωση χυμού από ρόδι για δύο εβδομάδες οδήγησε σε μείωση της συστολικής πίεσης [17α,β]. Η παρουσία πολλών αντιοξειδωτικών ουσιών στα ρόδια έχει αποδειχθεί και επιστημονικά ότι περιέχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση μαγνησίου ανά μάζα απ' όλα τα φρούτα, αποτελώντας ένα πολύτιμο «σύμμαχο» σε όσους πάσχουν από οστεοπόρωση [17ε]. Η κατανάλωση χυμού από ρόδι αναχαιτίζει τις ιογενείς λοιμώξεις, ενώ εκχυλίσματα από ρόδι έχουν αντιβακτηριδιακή δράση έναντι της οδοντικής πλάκας. Ανάμεσα στα άλλα, προστατεύει από εγκεφαλικές βλάβες και υπάρχουν ενδείξεις ότι η μακρόχρονη κατανάλωσή του βελτιώνει την ερωτική λειτουργία ανδρών με πρόβλημα στύσης. Επίσης, θεωρείται ότι συμβάλλει στην πρόληψη του καρκίνου του δέρματος, του μαστού και του προστάτη, αλλά και στην επιβράδυνση της ανάπτυξής τους. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της χρόνιας διάρροιας, της δυσεντερίας και των αιμορραγιών, και για την αντιμετώπιση της οστεοαρθρίτιδας. Τέλος, καθαρίζει και προστατεύει το δέρμα, χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση των εγκαυμάτων και του ιού του έρπητα και μειώνει τις ρυτίδες και τα έλκη [17α,β].



Εικόνα 28: Καρπόφορία της ποικιλίας *Wonderful* στο στάδιο ωρίμανσης (Ξάνθη, 10 Οκτωβρίου 2012).

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού

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

✓ Υλικά

- 3 κουνέλια
- Απιονισμένο H₂O
- Όξινο ανθρακικό κάλιο (KHCO₃), 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- (υδροξυμεθύλο)-αμινομεθάνιο, MB. 121.1
- Οξικό μαγνήσιο, MB. 214.46
- Θειικό αμμώνιο, MB. 132.14
- C₃H₈O₃ - Γλυκερόλη 100%
- Ημιπερατές μεμβράνες διαπίδυσης. Πριν από τη χρήση τους υφίστανται κατεργασία με 1% Na₂CO₃ και 10mM EDTA στους 100°C (30 min) και στη συνέχεια έκπλυση με απεσταγμένο ύδωρ 100°C (30 min).

✓ Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης/HCl, 50mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)

- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃)
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N (CH₃COOH)
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% (NH₄)₂SO₄
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρεις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH 7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH 7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH 7.0
- Διάλυμα οξικού μαγνησίου 1.0M ((CH₃COO)₂Mg)

✓ **Όργανα**

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

✓ **Διαδικασία**

Βήμα 1^ο: Παραλαβή μυϊκού εκχυλίσματος

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από 3 κουνέλια, αλέθονται με χειροκίνητη κρεατομηχανή και ζυγίζονται. Ο κιμάς που προκύπτει συγκεντρώνεται σταδιακά και διατηρείται σε ψυγείο στους 4°C. Με το πέρας του αλέσματος, ο κιμάς αναμιγνύεται με ίση ποσότητα απιονισμένου κρύου νερού σε μία ανοιχτή λεκάνη όπου ζυμώνεται έντονα το μίγμα για 10 min. Έπειτα 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 min και όταν πραγματοποιείται η ζύμωση του κιμά με το νερό το εκχύλισμα διατηρείται στους 4°C. Τέλος, το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα, για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

Βήμα 2^ο: Όξινη καταβύθιση ανεπιθύμητων πρωτεϊνών

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

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

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

Βήμα 4^ο: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται από τα σακουλάκια διαπίδυσης και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 17000 rpm για 10 min στους 20-25°C με χρήση μικρής κεφαλής. Το υπερκείμενο ογκομετρείται και προστίθενται: α) διάλυμα 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH 7.0 όγκου ίσο με τα 3/27 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, β) διάλυμα EDTA 0.1M pH 7.0 ίσο με τα 5/1000 του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και γ) αλκαλικό διάλυμα Tris 2M για ρύθμιση του pH στο 8.8. Το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 1 h με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου όπου προστίθεται διάλυμα CH₃COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 17000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20-25°C (με μικρή κεφαλή) και ογκομετρείται το υπερκείμενο.

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

Βήμα 5^ο: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση του ενζύμου

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη AMP 0.1M (pH 7.0) και (CH₃COO)₂Mg 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 h όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου. Ακολούθως, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8). Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 20-25°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων. Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH₃COO)₂Mg, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 3h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης

και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

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

Βήμα 6^ο: Συλλογή και αποθήκευση του ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C σε ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1. Η ενζυμική συγκέντρωση προσδιορίζεται με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280nm 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 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

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



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

Διαδικασία

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται με 1ml ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1 pH 6.8 (50 mM β-γλυκερινοφωσφορικού νατρίου, 50mM 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), ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου β-GP 2.5mM, β-Merc 2.5mM, EDTA 0.05mM και νερό.

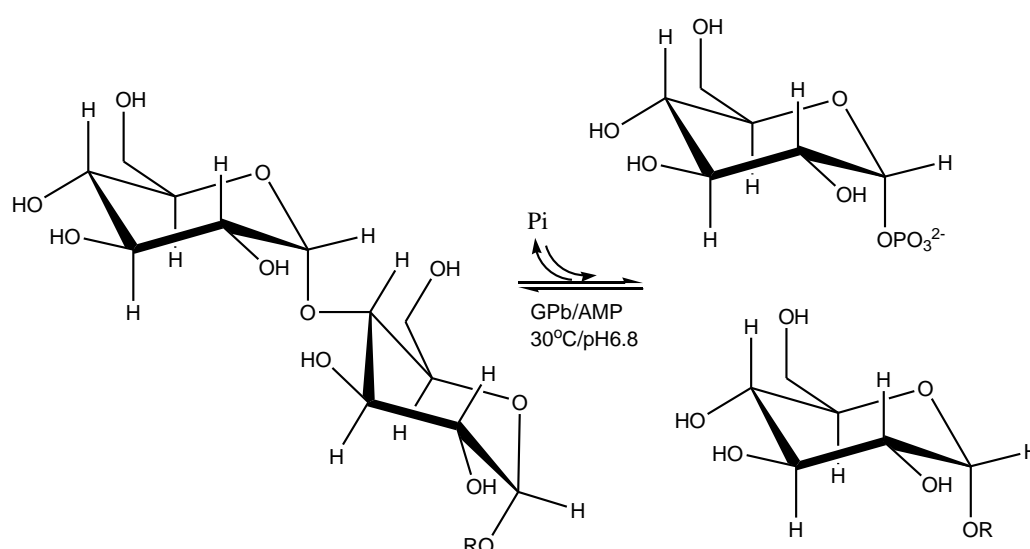
Επίσης, σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α-D-Glc-1-P 2.0, 4.0, 6.0, 10.0 και 20mM με προσθήκη 200μL υποστρώματος α-D-Glc-1-P 9.0, 18.0, 27.0, 45.0 και 90.0mM αντίστοιχα, 18μL AMP 50mM και 502μL H₂O.

Στη συνέχεια, το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση στους 30°C για 15 min. 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: 5.0mg ενζύμου ανά mL, 1.0mM AMP, 0.2% (w/v) γλυκογόνο, υποστρώματα α-D-Glc-1-P από 2mM έως 20mM , η θερμοκρασία είναι 30° C και το pH 6.8. Ανά τακτά και καθορισμένα χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού), λαμβάνονται δείγματα των 200μL από το διάλυμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50μL SDS 1%. Το SDS είναι απορρυπαντικό που 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 (K_m)

Η σταθερά *Michaelis-Menten* (K_m , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α -D-Glc-1-P). Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (GPb) βασίζεται στην ακόλουθη αντίδραση:



Εικόνα 29: Αντίδραση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (GPb).

Στην αντίδραση αυτή η λιγότερο ενεργή μορφή του ενζύμου (T διαμόρφωση), μετά από ενεργοποίηση με AMP, δρα αντίστροφα προς σχηματισμό γλυκογόνου, παρουσία G-1-P (α -D-1-φωσφορικής γλυκόζης), και ελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (P_i). Η καταλυόμενη αντίδραση σε συνθήκες κορεσμού με AMP 1.0mM 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.

Για τον προσδιορισμό της σταθεράς K_m της GPb πραγματοποιείται κινητική μελέτη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος G-1-P.

3.2.3 Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέα

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

Η σταθερά IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση Glc-1-P (1-φωσφορικής γλυκόζης). Συνήθως οι ποσότητες των προς εξέταση ουσιών δεν είναι μεγάλες και αυτό περιορίζει την δυνατότητα για μεγάλο αριθμό πειραμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να καλύψουν την πιθανότητα για την εξαγωγή τόσο των κινητικών παραμέτρων (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%. Η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των τιμών IC_{50} (Cheng και Prussof, 1973) είναι η ακόλουθη:

$$\% \text{Αναστολή} = 100 / (IC_{50} / [I])$$

Όπου [I] η συγκέντρωση του αναστολέα.

Ο προσδιορισμός των τιμών IC_{50} της αναστολής πραγματοποιήθηκε για μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις ροδιού, ποικιλίας Wonderful.

3.3 Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b

Το ένζυμο φυλάσσεται σε εναιώρημα γλυκερόλης στους -20°C . Από αυτό το εναιώρημα παίρνουμε 10μL και το αραιώνουμε σε 1mL 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 25μg/mL, γλυκογόνο 1% (w/v), ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου και νερό. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα με την προσθήκη του διαλύματος υποστρώματος γίνεται σε καθορισμένες συνθήκες: 5.0mg ενζύμου ανά mL, 1.0mM AMP, 0.2% (w/v) γλυκογόνο, σταθερή συγκέντρωση υποστρώματος α-D-Glc-1-P και μεταβαλλόμενης αναστολέα. Το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση σε υδατόλουτρο στους 30°C για 15 min.

3.4 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης

Παρασκευάζονται 2 ρυθμιστικά διαλύματα:

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

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

Φυλάσσονται στους 4°C .

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

Έτσι προκύπτουν τα παρακάτω διαλύματα:

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

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

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

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

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

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

Διαδικασία

Παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC_{50} , σε σταθερή συγκέντρωση α-D- Glc-1-P 9mM και AMP 50mM ώστε μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος (180μL) η συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P να είναι 2mM και της AMP 1mM. Επίσης συμπληρώνεται με απιονισμένο ύδωρ μέχρι τελικού όγκου 720μL. Τέλος σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα. Τα διαλύματα υποστρώματος, τοποθετούνται επίσης στο υδατόλουτρο, ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με τον ενζυμικό διάλυμα, πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία.

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D-Glc-1-P	200 μL	200 μL
AMP (50mM)	18 μL	18 μL
Αναστολέας	-	X μL
H₂O	502 μL	720-(200+18+X) μL
Τελικός όγκος	720 μL	720 μL

Ταυτόχρονα ετοιμάζονται και δοκιμαστικοί σωλήνες που περιέχουν 50μL 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 180μL από το ενζυμικό διάλυμα σε κάθε διάλυμα υποστρώματος με τη σειρά (χρόνος 0'), έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια ανά 1 λεπτό και σε χρόνους 1, 2, 3, και 4 λεπτών λαμβάνονται και μεταφέρονται 200μL 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 2.5mL διάλυμα ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα τα δείγματα επωάζονται για 15 min στους 30 °C και μετά ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των φωσφορικών ιόντων (Pi), που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση.

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

Στη συνέχεια ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit, προκειμένου να προσδιοριστεί η IC_{50} .

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

G1P: 2mM

AMP: 1mM

Γλυκογόνο: 0.2% (w/v)

Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν:

2 μg/mL, 5 μg/mL, 8 μg/mL, 10 μg/mL, 25 μg/mL και 35 μg/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 και γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να διορθωθούν οι απορροφήσεις λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων, τα οποία δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά :

- Τυφλό νερού για την ρύθμιση του μηδενός.
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται στην IC_{50} ή με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση της G1P στην περίπτωση της K_m , λόγω της φυσικής υδρόλυσης της.
- Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος), λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.
- Τυφλό διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του οποίου 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 P_i πρέπει να είναι μεταξύ 0,05-0,4μM, προκειμένου να είναι γραμμική η οπτική απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο.

✓ Υλικά

- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου, με ρύθμιση pH 5.0. Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15mM και οξικό ψευδάργυρο 100mM. 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 προς 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 (με χρήση vortex) οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C για 15 min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Επίσης γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών.

3.7 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit

Οι απορροφήσεις των δειγμάτων διορθώνονται με την αφαίρεση της τιμής απορρόφησης των τυφλών της Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσής της) και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό διάλυμα, για την κάθε συγκέντρωση και του γλυκογόνου, ενώ από την τιμή της απορρόφησης του τυφλού του πρότυπου διαλύματος φωσφορικών προκύπτει η τιμή της απορρόφησης του 1μmol φωσφορικών. Οπότε όλες οι τιμές των απορροφήσεων ανάγονται σε μmol φωσφορικών ιόντων σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Οι τιμές των αρχικών ταχυτήτων (v) και το τυπικό τους σφάλμα (σ^2) υπολογίζονται με τη στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων, που 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:

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

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 δίνοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων (ετεροσκεδαστικότητα 'explicit

weighting'). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους V_{\max} και K_m καθώς 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

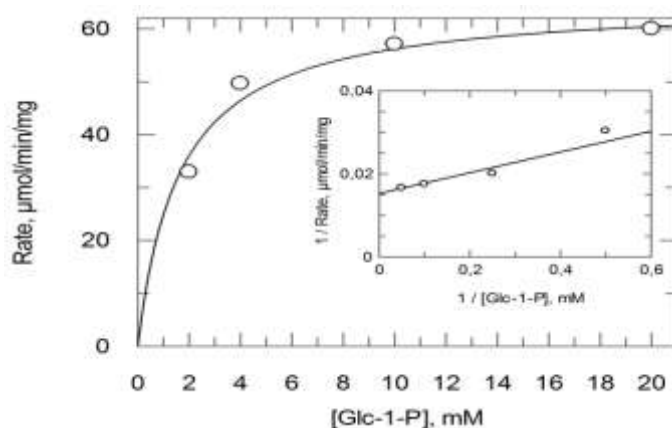
$[S]$: Η συγκέντρωση του υποστρώματος

E : Το ένζυμο

S : Το υπόστρωμα

ES : Το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος

P : Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης



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

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

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

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

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

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

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC_{50} θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC_{50} προκύπτει από το διάγραμμα $\% \text{αναστολή} = f([\text{I}])$. 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:

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

Όπου $[\text{S}]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος ως προς το οποίο εξετάζεται η GPb, δηλαδή η συγκέντρωση της Glc-1-P.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

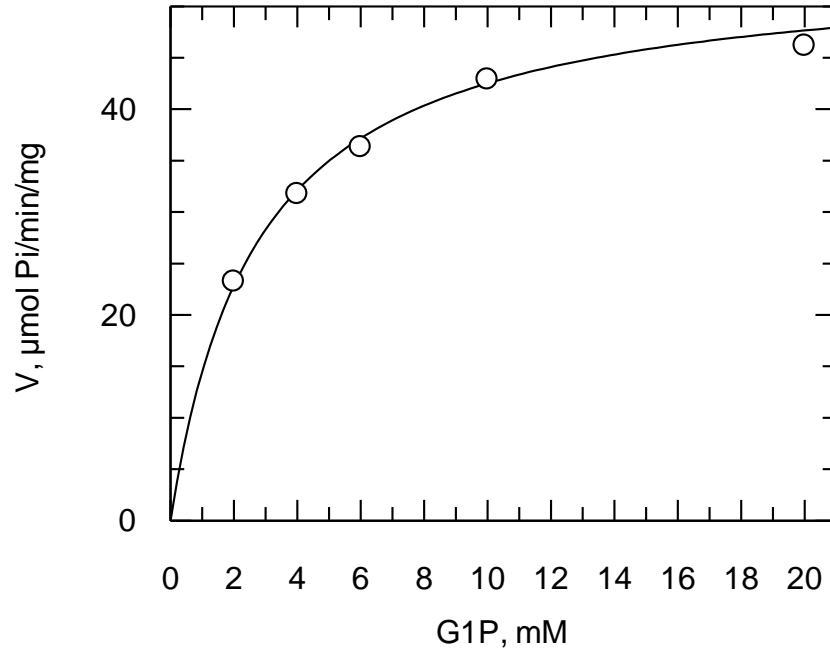
Η σταθερά K_m (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (G1P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η K_m ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 3.0mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m .

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν ότι είναι:

$$K_m = 2.75 \pm 0.16 \text{ mM και}$$

$$V_{max} = 54.20 \pm 1.08 \text{ } \mu\text{mol/min/mg}$$

Η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστικότητα, sp. activity, μmol φωσφορικών/ $\text{min} \cdot \text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G1P) παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (GPb) για διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος (2.0, 4.0, 6.0, 10.0 και 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.

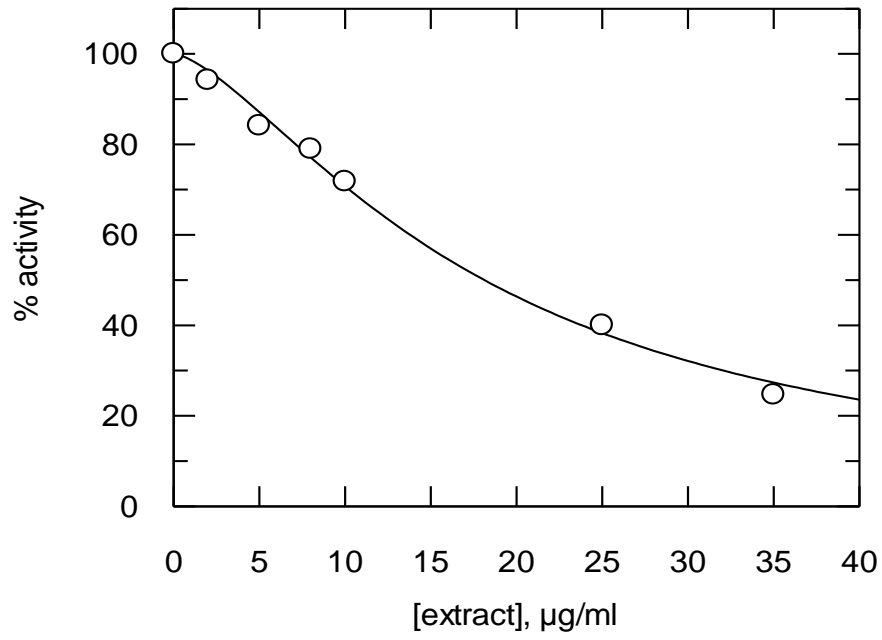


Εικόνα 31: Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

4.2 Κινητική μελέτη αναστολέα, εκχυλίσμα ροδιού, ποικιλίας Wonderful

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η ανασταλτική επίδραση εκχυλίσματος ροδιού, ποικιλίας Wonderful. Ακολουθεί η γραφική παράσταση που προέκυψε από το πρόγραμμα Grafit, στην οποία προσδιορίζεται η τιμή IC_{50} της αναστολής που πραγματοποιήθηκε για μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις του ροδιού. Όπως έχει προαναφερθεί, η IC_{50} είναι η συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% και για το ρόδι η τιμή ισούται με:

$$IC_{50} = 18.13 \pm 0,70 \mu\text{g/ml}$$



Εικόνα 32: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, ως προς την ανασταλτική επίδραση φυσικών εκχυλισμάτων ροδιού, τα οποία προέκυψαν κατά τα διάφορα στάδια επεξεργασίας του. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη εκχυλίσματος ροδιού, ποικιλίας Wonderful. Το δείγμα που μελετήθηκε προέκυψε κατά το στάδιο πολτοποίησης του ροδιού (όλο το φρούτο χωρίς τη φλούδα του) δηλαδή ο χυμός του. Αυτό που ερευνάται είναι η ανασταλτική επίδραση φυσικών εκχυλισμάτων ροδιού έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ένα ένζυμο που αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων όσον αφορά τη θεραπεία του διαβήτη τύπου II.

Τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων έδειξαν ότι τα χαρακτηριστικά του ενζύμου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι: $K_m = 2.75 \pm 0.16$ mM και $V_{max} = 54.20 \pm 1.08$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ενώ το εκχύλισμα έχει ισχυρή ανασταλτική δράση, καθώς η συγκέντρωση του εκχυλίσματος του ροδιού που προκάλεσε 50% αναστολή (IC_{50}) είναι ίση με 18.13 ± 0.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Stryer L., 2007, Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 3^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- [2] Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία, www.endo.gr.
- [3] WHO Media Centre, Diabetes, 2011, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
- [4] Αξιολόγηση διατροφικής παρέμβασης σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη, πτυχιακή εργασία, Τμήμα Επιστήμης Διατροφής και Διαιτολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, 2006.
- [5] Lernmark, Ake, "Type 1 Diabetes", 1999.
- [6] Greenbaum, Carla J. and Harrison, Leonard C., on behalf of the Immunology of Diabetes Society, "Guidelines for Intervention Trials in Subjects With Newly Diagnosed Type 1 Diabetes", 2003.
- [7] Healthwise Inc. authors, "Type 1 Diabetes - Topic Overview", 2008, <http://diabetes.webmd.com>.
- [8] (α) Wikipedia: "Frederick Sanger". (β) Stretton AOW: "The First Sequence: Fred Sanger and Insulin", Genetics 162:527-532, 2002. (γ) Brown H, Sanger F, Kitai R: "The structure of pig and sheep insulin", Biochem J. 60:556-565, 1955. (δ) Sanger F: "Chemistry of insulin: determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes", Science 129:1340-1344, 1959. (ε) Sanger F: "Chemistry of insulin", Brit Med Bull 16:183-188, 1960.
- [9] (α) NobelPrize.org: "Dorothy Crowfoot Hodgkin". (β) Wikipedia: "Dorothy Hodgkin". (γ) Sweet Briar College: "Nobel Lecture: The X-Ray Analysis Of Complicated Molecules by Dorothy Crowfoot Hodgkin".
- [10] (α) Dodson GG, Whittingham JL: "3.5 Insulin Structure and Diabetes Treatment" (York Structural Biology Laboratory). (β) Turkenburg-van Diepen MGW: "Crystallographic studies of modified insulin: Chapter 6, Metal binding in insulin", (PhD Thesis, York University). (γ) PetDiabetes.org: "Aminoacids sequence of insulin".
- [11] (α) Katsoyannis PG, Tometsko A, Zalut C: "Insulin peptides XII: Human insulin generation by combination of synthetic A and B chains", J Am Chem

Soc 88:166-167, 1966. (β) Katsoyannis PG: "Synthesis of insulin", Science 154:3756, 1966.

[12] (α) Teuscher A: "Insulin: A voice for choice", Karger, 2007 (Google, e-book). (β) "Recombinant DNA Technology in the Synthesis of Human Insulin" (γ) Asada H, Douen T, Waki M, Adachi S, Fujita T, Yamamoto A, Muranishi S: "Absorption characteristics of chemically modified-insulin derivatives with various fatty acids in the small and large intestine", J Pharm Sci. 84(6):682-7, 1995 (PubMed).

[13] Wikipedia: "Fischer Projection".

[14] McArdle W. D., Katch F. I. & Katch V. L., 2000, Essentials of Exercise Physiology, Τόμος Ι, Έκδοση 2^η, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης Π. Χ.

[15] Ophard CE: "Starch", "Glycogen", "Cellulose" in Virtual Chembook, 2003.

[16] Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με στόχο το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών ενώσεων, πτυχιακή εργασία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2012.

[17] (α) <http://www.trimis.eu/juice.html>,

(β) <http://www.vita.gr/html/ent/834/ent.7834.asp>,

(γ) [www.agro-help.com/.../blog post_3994.ht](http://www.agro-help.com/.../blog_post_3994.ht),

(δ) <http://www.sfakianakisplants.gr>,

(ε) www.froustona.gr,

(στ) <http://www.nagref.gr/journals/ethg/images/38/ethg38p4-6.pdf>.