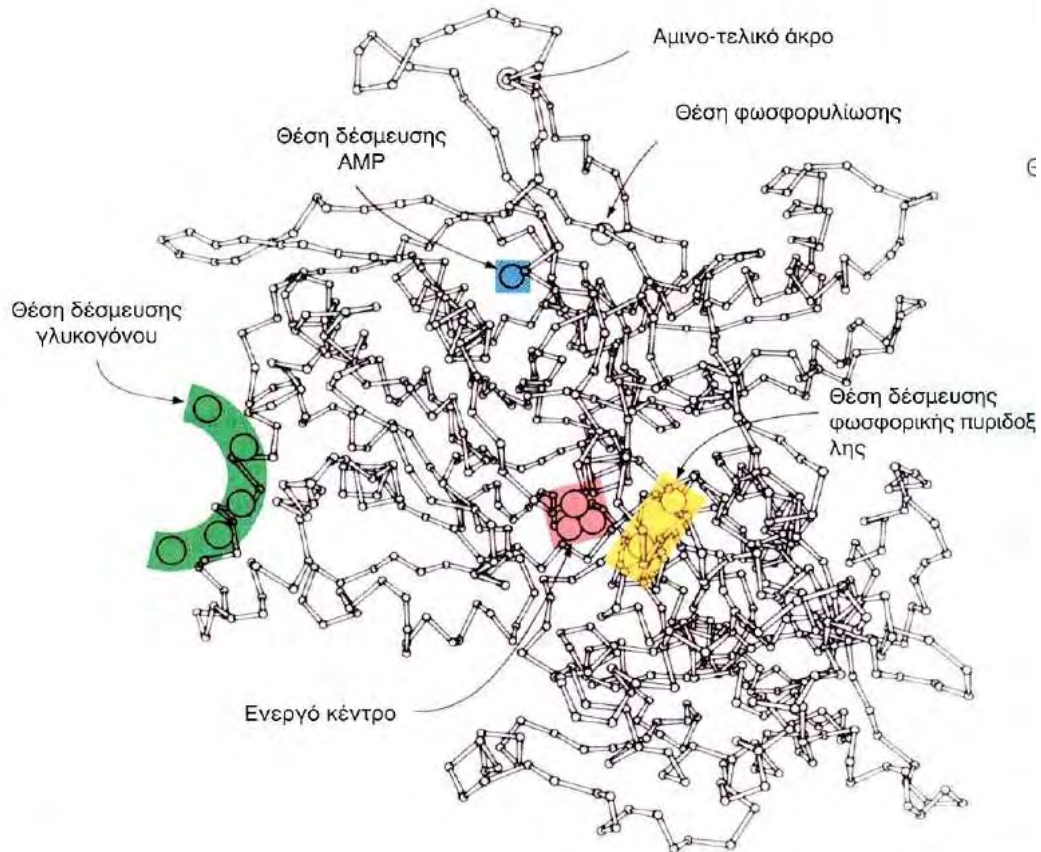


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Κοτσώνα Κατερίνα

Αξιολόγηση ενώσεων φυσικής προέλευσης ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με στόχο το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Λάρισα- Ιούνιος 2012

**Αξιολόγηση ενώσεων φυσικής προέλευσης ως αναστολείς της
φωσφορυλάσης του γλυκογόνου με στόχο το σχεδιασμό νέων
υπογλυκαιμικών φαρμάκων.**

Τριμελής επιτροπή:

- **Δρ Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**

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

- **Δρ Νικόλαος Μπαλατσός**

Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ Άννα Μαρία Ψαρρά**

Λέκτορας Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	6
1. Περίληψη	7
Abstract	7
2. Εισαγωγή	9
2.1. Σακχαρώδης διαβήτης	9
2.1.1. Τύπου 1	9
2.1.2. Τύπου 2	11
2.1.3. Κύησης	14
2.1.4. Άλλοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη	14
3. Βασικές γνώσεις	15
3.1. Ινσουλίνη	15
3.1.1. Δομή της ινσουλίνης	15
3.1.2. Βιολογικός ρόλος της ινσουλίνης	17
3.2. Γλυκόζη	20
3.2.1. Προσδιορισμός της δομής της γλυκόζης	20
3.2.2. Ο ρόλος της γλυκόζης	21
3.3. Γλυκογόνο	23
3.3.1. Ο ρόλος του γλυκογόνου	23
3.3.2. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου	26
3.4. Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου	28
3.5. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου	30
3.5.1. Ομοιοπολική και αλλοστερική ρύθμιση φωσφορυλάσης	32
3.5.2. Κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	35
3.6. Ενζυμική αντίδραση και δραστηριότητα	38
3.6.1. Χημικοί Παράγοντες που επηρεάζουν	38
3.6.1.1. Υπόστρωμα και προϊόν ως αναστολείς του ενζύμου	39
3.6.1.2. Συναγωνιστική και μη συναγωνιστική αναστολή του ενζύμου	40
3.6.1.3. Μη αντιστρεπτή αναστολή (αδρανοποίηση) του ενζύμου	42
3.7. Αναστολέας «Ασσύρτικο»	42
4. Γενική μεθοδολογία πειραμάτων και υλικά	44
4.1. Απομόνωση ενζύμου, παρασκευή φωσφορυλάσης b από σκελετικούς μυς κουνελιού	44
4.1.1. Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου	45
4.1.2. Όξινη καταβύθιση άλλων πρωτεϊνών	45
4.1.3. Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο	46

4.1.4.	Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH.....	46
4.1.5.	Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση	47
4.1.6.	Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου.....	47
4.2.	Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	48
4.2.1.	Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb.....	48
4.2.2.	Παρασκευή μίγματος φωσφορυλάσης b - γλυκογόνου	49
4.2.3.	Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)	50
4.2.4.	Υπολογισμός των αρχικών ταχυτήτων (v) και των τυπικών αποκλίσεων (σ).....	51
4.2.5.	Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων V_{max} και K_m και των τυπικών αποκλίσεων (σ).....	52
4.2.6.	Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} (ανασταλτική συγκέντρωση).....	53
4.2.7.	Παρασκευή τυφλών	53
4.2.8.	Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος	54
4.2.8.1.	Παρασκευή διαλυμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις Glc-1-P.....	54
4.2.9.	Προσδιορισμός φωσφόρου	56
4.2.10.	Μέθοδος ασκορβικού οξέος	56
4.3.	Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit	58
4.4.	Αποτελέσματα.....	59
4.4.1.	Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου	59
4.4.2.	Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων	60
4.4.2.1.	Προσδιορισμός K_m και V_{max}	60
4.4.3.	Κινητική μελέτη αναστολέων	62
4.4.4.	Προσδιορισμός του IC_{50} της αναστολής του ενζύμου	63
5.	Συμπεράσματα – Συζήτηση	64
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε το Φεβρουάριο του 2012 μέχρι το Μάιο του ίδιου έτους στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με υπεύθυνο τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας Dr. Λεωνίδα Δημήτριο, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση της διπλωματικής μου μελέτης και για τη συνεχή του καθοδήγηση ως προς τη διεκπεραίωση αυτής. Ευχαριστώ επίσης, την υποψήφια διδάκτορα Καντσάδη Αναστασία για την πολύτιμη συνεργασία μας και για τη βοήθεια που μου προσέφερε ακούραστα.

Μα πάνω απ όλα ευχαριστώ τους γονείς μου Χρήστο και Αθηνά, τις αδερφές μου Έλενα και Ιωάννα και τους γαμπρούς μου Άλκη και Νίκο που με σπρώχνουν να ζήσω τα όνειρα μου.

***Στην ομορφιά μου, Ιωάννα Μαρία
και στα άλλα που θα έρθουν!!!***

1. Περίληψη

Η παρούσα εργασία εστιάζει στην ανακάλυψη νέων ενώσεων για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2. Ο διαβήτης τύπου 2 αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες παθήσεις και χαρακτηρίζεται από την ανικανότητα του οργανισμού να ρυθμίσει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Με στόχο τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ο σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη μοριακή δομή (ή ο κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός φαρμάκων) έχει θέσει ως στόχο εξειδικευμένων μορίων, ένζυμα και υποδοχείς που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης. Μελέτες έδειξαν ότι το ένζυμο της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για τον σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Αντικείμενο του έργου είναι η ανακάλυψη νέων αναστολέων από φυτικά εκχυλίσματα αμπέλου και η αξιοποίηση τους ως ενώσεις οδηγούς στο σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Στην παρούσα εργασία, η μυϊκή φωσφορυλάση b του γλυκογόνου χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση με κινητικές μεθόδους ενός πολυφαινολικού εκχυλίσματος αμπέλου της ποικιλίας ασσύρτικο. Το εκχύλισμα βρέθηκε να αναστέλλει σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα της μυϊκής φωσφορυλάσης με τιμή σταθεράς αναστολής IC_{50} $30,63 \pm 2,51 \mu\text{g/ml}$.

Abstract

Type 2 diabetes (T2D) is one of the most common diseases and is characterized by the inability of the human organism to control the glucose levels in the bloodstream. Rational structure-based drug design has exploited a number of promising targets for the treatment of T2D. Hepatic glycogen phosphorylase is considered to be one of the most promising therapeutic targets for the design of new hypoglycaemic drugs.

In the present study, glycogen phosphorylase b from rabbit muscle has been employed as molecular target for the evaluation of a polyphenolic extract of the grape variety assyrtiko for the purpose to discover new leads for the structure-assisted design of new hypoglycaemic agents.

In specific, the kinetic experiments, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that the extract reduced the enzyme activity to 50% (IC₅₀ values) at concentration of 30, 63 ± 2, 51 µg/ml.

2.Εισαγωγή

2.1. Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μία ετερογενής ομάδα από διαταραχές, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αυξημένη γλυκόζη πλάσματος. Στην πλειοψηφία των ασθενών με διαβήτη, η αιτιολογία της ασθένειας δεν είναι κατανοητή 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 [1].

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization) αυτή τη στιγμή περισσότεροι από 220 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από διαβήτη. 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 [2].

Ο διαβήτης τύπου 1 είναι η πιο σοβαρή μορφή διαβήτη, που οδηγεί σε εφόρου ζωής εξάρτηση από την καθημερινή χορήγηση ινσουλίνης. Το πιο συνηθισμένο είδος διαβήτη είναι ο τύπου 2. Υπάρχει επίσης ο διαβήτης κύησης που είναι ένα σημαντικό πρόβλημα και προσβάλλει περίπου το 4% των κυήσεων. Οι μητέρες με διαβήτη κύησης έχουν αισθητά αυξημένες πιθανότητες να αναπτύξουν διαβήτη μετά τον τοκετό.

2.1.1. Τύπου 1

Χαρακτηρίζεται από απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης. Παλαιότερα ονομαζόταν νεανικός σακχαρώδης διαβήτης και ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης. Αυτού του είδους ο διαβήτης είναι ένα αυτοάνοσο νόσημα που

ενισχύει την καταστροφή των β-κυττάρων τα οποία παράγουν ινσουλίνη στα νησίδια του παγκρέατος. 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 των β-κυττάρων που καθορίζονται από γενετικούς και άλλους παράγοντες με αποτέλεσμα να αλλάζει η παθολογία της ασθένειας αναλόγως [3].

Ο πρωταρχικός ρόλος της ινσουλίνης είναι να βοηθά στην κίνηση ορισμένων θρεπτικών συστατικών – ειδικά της γλυκόζης – μέσα στα κύτταρα των ιστών. Το ποσό της γλυκόζης στο αίμα μειώνεται όταν αυτή εισέρχεται στα κύτταρα. Σε φυσιολογικούς ανθρώπους αυτό δίνει σήμα στα β-κύτταρα που βρίσκονται στο πάγκρεας να μειώσουν την ποσότητα της εκκρινόμενης ινσουλίνης ώστε να μην προκληθεί υπογλυκαιμία. Η καταστροφή όμως των β-κυττάρων που συμβαίνει κατά το διαβήτη τύπου 1, αποσυντονίζει την όλη διαδικασία.

Στους ασθενείς η γλυκόζη δεν εισέρχεται στα κύτταρα, ούτε αποθηκεύεται σωστά στο συκώτι και τους μύες, λόγω έλλειψης ινσουλίνης, 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 ούρηση με αποτέλεσμα να αφυδατώνεται ο οργανισμός. *Απώλεια βάρους*, με την απώλεια σακχάρων μέσω της ούρησης συνεπάγεται η 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 λιπικά κύτταρα. Παραπροϊόντα της διάσπασης είναι όξινα χημικά (κετόνες) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ενέργειας. Με τη συσσώρευση τους στο αίμα προκαλούν αυξημένη οξύτητα. Το συκώτι 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. Με το χρόνο τα υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα είναι πιθανόν να καταστρέψουν τα νεύρα και μικρά αγγεία στα μάτια, τα νεφρά, την καρδιά και 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 συκώτι και κακή κυκλοφορία του αίματος [4].

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.

Όσον αφορά τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, έρευνες έχουν δείξει ότι έχουν να κάνουν κυρίως με το κρύο νερό. Ο Διαβήτης Τύπου 1 εμφανίζεται συχνότερα το χειμώνα από το καλοκαίρι και σε περιοχές με ψυχρά κλίματα από 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.

2.1.2. Τύπου 2

Είναι ο συχνότερος τύπος και χαρακτηρίζεται από τη συνύπαρξη διαταραχής της έκκρισης και της δράσης της ινσουλίνης. Παλαιότερα ονομαζόταν σακχαρώδης διαβήτης των ενηλίκων και μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης. Ο ΣΔ2 μπορεί να εμφανισθεί στον οποιονδήποτε. Αυτοί που διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο είναι οι

παχύσαρκοι και υπέρβαροι, γυναίκες που έχουν εμφανίσει διαβήτη της εγκυμοσύνης, άτομα με ιστορικό ΣΔ2 στην οικογένειά τους και αυτοί που εμφανίζουν κλινικά στοιχεία του μεταβολικού συνδρόμου (υπέρταση, αύξηση της περιμέτρου της κοιλιάς, διαταραχές των λιπιδίων του αίματος). Όσο προχωράει η ηλικία, το σώμα μας γίνεται λιγότερο ανεκτικό στα σάκχαρα.

Σε αντίθεση με τους ασθενείς με διαβήτη τύπου 1, στον τύπου 2 διαβήτη παράγεται ινσουλίνη αλλά είτε το πάγκρεας δεν παράγει αρκετή, είτε αυτή που παράγεται δεν είναι αρκετά αποτελεσματική. Η συνέπεια είναι ότι η γλυκόζη δεν μπορεί να απορροφηθεί από τα κύτταρα και έτσι αυτά δε λειτουργούν σωστά. Πάλι λοιπόν ο οργανισμός έρχεται αντιμέτωπος με τα προαναφερθέντα συμπτώματα (αφυδάτωση, γενικές βλάβες) αλλά και με το διαβητικό κώμα το οποίο συμβαίνει σε ακραίες περιπτώσεις αφυδάτωσης. Και στην περίπτωση του τύπου 2, αν δε γίνει προσεκτική διαχείριση της νόσου ελλοχεύουν οι ίδιοι κίνδυνοι με τον τύπου 1 καθώς και βλάβες στα νεύρα και σκλήρυνση των αρτηριών με αποτέλεσμα να υπάρχει μειωμένη αίσθηση και κυκλοφορία στα πόδια. Κάτι τέτοιο, με τη σειρά του, οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο για τη δημιουργία πληγών που δεν επουλώνονται στα άκρα και σε δριμείες περιπτώσεις σε ακρωτηριασμό.

Αν και ο ΣΔ2 είναι πιο συχνός από τον ΣΔ1 (των νέων), η αιτιολογία του δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένη. Πιθανότατα προκαλείται από πολλούς παράγοντες και όχι από ένα μόνο αίτιο. Γνωρίζουμε μέχρι τώρα τα παρακάτω:

- Ο ΣΔ2 εμφανίζεται σε συγγενείς στα πλαίσια της οικογένειας αλλά ο ακριβής τρόπος που κληρονομείται και η ταυτότητα του γονιδιακού παράγοντα που τον προκαλεί δεν είναι γνωστά.
- Τα άτομα με ΣΔ2 εμφανίζουν αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης και σχετική ανεπάρκεια της έκκρισής της από το πάγκρεας. Οι μεταβολές αυτές μπορεί να προϋπάρχουν αρκετά χρόνια πριν την εμφάνιση του κλινικού διαβήτη. 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.

Τα συμπτώματα διαφέρουν από ασθενή σε ασθενή αλλά τα κυριότερα είναι:

- Αυξημένη δίψα
- Αυξημένη όρεξη
- Ξερό στόμα
- Ναυτία ή/και έμετοι
- Πολυουρία
- Κούραση, εξάντληση
- Διαταραχές της όρασης
- Μουδιάσματα η μυρμηγκιάσματα σε χέρια και πόδια
- Συχνές φλεγμονές του δέρματος, του ουροποιητικού και του κόλπου

Σπάνια ο διαβήτης τύπου 2 μπορεί να διαγνωσθεί μετά από μεταφορά του ασθενούς στο νοσοκομείο σε κώμα.

Η διάγνωση γίνεται με τη μέτρηση του σακχάρου στο αίμα. Επιπρόσθετα ελέγχεται η παρουσία σακχάρου ή κετονικών σωμάτων στα ούρα. Μπορεί επίσης να διαγνωστεί από τη ψηλή 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.

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 διαίτα, την άσκηση και φαρμακευτική θεραπεία με χάπια. Χρειάζεται επίσης η συχνή μέτρηση του σακχάρου στο αίμα.

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 στον ΣΔ2 (αιμορραγίες, εξιδρώματα) και γίνονται πιο συχνές με τη πάροδο του χρόνου. Η εμφάνισή τους προλαμβάνεται ή καθυστερεί με την καλή ρύθμιση όχι μόνο του σακχάρου αλλά και της αρτηριακής πίεσης και της χοληστερίνης. Ευτυχώς 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.

Για μια απόλυτα φυσιολογική ζωή ο ασθενής θα πρέπει να διατηρεί το βάρος του σε φυσιολογικά επίπεδα, να ασκείται έστω και λίγο κάθε μέρα, ο προγραμματισμός των γευμάτων να γίνεται με τη βοήθεια διαιτολόγου και να ελέγχει το σάκχαρο, την πίεση και τα λιπίδια στο αίμα.

2.1.3. Κύησης

Ορίζεται ως η διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων ποικίλης βαρύτητας με έναρξη ή πρώτη αναγνώριση στην εγκυμοσύνη. Είναι ένα σημαντικό πρόβλημα που προσβάλλει περίπου το 4% των κυήσεων. Οι μητέρες με διαβήτη κύησης έχουν αισθητά αυξημένες πιθανότητες να αναπτύξουν διαβήτη μετά τον τοκετό.

2.1.4. Άλλοι τύποι σακχαρώδους διαβήτη

Οφείλονται σε γενετικές διαταραχές των β-κυττάρων, νοσήματα της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, φάρμακα, κλπ.

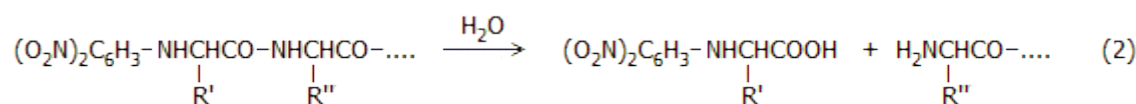
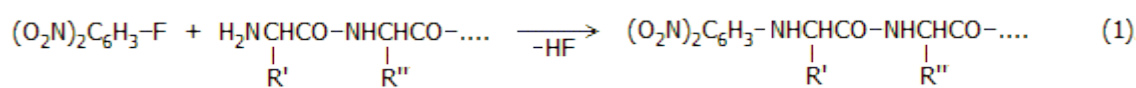
3. Βασικές γνώσεις

3.1. Ινσουλίνη

3.1.1. Δομή της ινσουλίνης

Η ακολουθία των αμινοξέων και η δομή της ινσουλίνης προσδιορίσθηκε από τον καθηγητή Frederick Sanger στο Πανεπιστήμιο του Cambridge, στην Αγγλία και περιγράφεται σε μια σειρά 9 επιστημονικών δημοσιεύσεων του κατά το χρονικό διάστημα 1949-1953. Η ανακάλυψη αυτή θεωρήθηκε ως ένα από τα σημαντικότερα επιστημονικά επιτεύγματα εκείνης της εποχής και ο Sanger τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Χημείας του 1958. Να σημειωθεί ότι το 1980 ο Sanger (με τους Paul Berg και Walter Gilbert) τιμήθηκε για δεύτερη φορά με το βραβείο Nobel για τη συνεισφορά του στον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων στο DNA.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας βασιζόταν στη χρήση του αντιδραστηρίου 1-φθορο-2,4-δινιτροβενζολίου (FDNB), μετέπειτα γνωστού ως αντιδραστηρίου Sanger. Το FDNB αντιδρά με την εκτεθειμένη (ελεύθερη) αμινοομάδα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας κάτω από ήπιες συνθήκες (αντίδραση 1). Με υδρόλυση αποσπάται εύκολα το 2,4-δινιτροφαινυλο-παράγωγο (DNP-παράγωγο) του πρώτου αμινοξέος (αντίδραση 2), η ταυτότητα του οποίου προσδιορίζεται στη συνέχεια με χρωματογραφία χάρτου.



Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τα υπόλοιπα αμινοξέα της πεπτιδικής αλυσίδας. Αν και η αρχή της μεθόδου είναι απλή, στην πράξη οι πειραματικές δυσκολίες είναι σημαντικές.

Ο Sanger επέλεξε την ινσουλίνη για να δοκιμάσει τη μέθοδό του, επειδή ήταν μια σχετικά μικρή πρωτεΐνη, σχεδόν στο όριο μεταξύ πεπτιδίων και πρωτεϊνών (συμβατικά το όριο αυτό είναι τα 50 αμινοξέα) και υπήρχε σε πολύ καθαρή (κρυσταλλική) κατάσταση. 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.

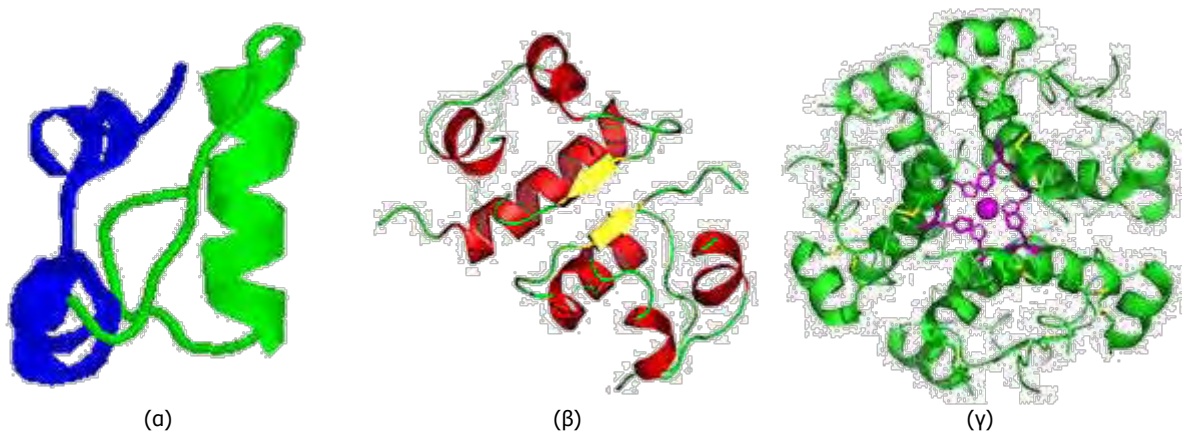
Ο Sanger πραγματοποίησε υδρόλυση της ινσουλίνης κάτω από διαφορετικές συνθήκες (με HCl ή χυμοθρυψίνη), οπότε το μόριό της "κοβόταν" σε διαφορετικά σημεία δίνοντας κάθε φορά διαφορετικά πεπτίδια. Διαχώριζε και καθάριζε τα πεπτίδια με χρωματογραφία δύο διαστάσεων (με ηλεκτροφόρηση ως προς τη μία διάσταση και με χρωματογραφία ως προς την άλλη) και προχωρούσε στον επίπονο προσδιορισμό της αλληλουχίας τους των επιμέρους πεπτιδίων με το FDNB. Συνδυάζοντας τις δομές-αλληλουχίες των διαφόρων πεπτιδίων, ο Sanger εξακρίβωσε την ορθή δομή της ινσουλίνης, γεγονός πρωτοποριακό για την εποχή εκείνη [5].

Η ινσουλίνη είναι πολυπεπτιδική ορμόνη, μια σχετικά "μικρή" πρωτεΐνη, που αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες (Α και Β) που περιέχουν συνολικά 51 αμινοξέα, 21 αμινοξέα στην Α αλυσίδα και 30 αμινοξέα στη Β 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 (ο Sanger χρησιμοποίησε για τον σκοπό αυτό υπερμυρμηκικό οξύ, HCOOOH). Καμία από τις δύο αλυσίδες χωριστά δεν εμφανίζει κάποια φυσιολογική δραστηριότητα και επομένως η δράση της ινσουλίνης οφείλεται στη συνολική διαμόρφωση του μορίου της (τριτοταγής δομή) και όχι στα επιμέρους συστατικά της πεπτίδια ή αμινοξέα.

Η ινσουλίνη υπήρξε η πρώτη πρωτεΐνη της οποίας προσδιορίστηκε η τριτοταγής κρυσταλλική δομή. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε το 1969 με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ από την Dorothy Crowfoot

Hodgkin (Πανεπιστήμιο Οξφόρδης). Ο προσδιορισμός αυτός υπήρξε σημαντικό επίτευγμα για εκείνη την εποχή, που δεν υπήρχαν ηλεκτρονικοί υπολογιστές να διεξάγουν τους απαιτούμενους δύσκολους υπολογισμούς. Για το επιστημονικό αυτό επίτευγμα αλλά και για άλλους προσδιορισμούς δομών με την ίδια τεχνική (πενικιλίνης το 1949, βιταμίνης B-12 το 1955), η Hodgkin τιμήθηκε με το Βραβείο Nobel Χημείας το 1964 [6].

Η ινσουλίνη σε υδατικό διάλυμα σχηματίζει σταθερά μη-ομοιοπολικά διμερή, αλλά υπάρχουν ακόμη, τετραμερή και εξαμερή. Τα τελευταία σταθεροποιούνται ιδιαίτερα παρουσία ιόντων ψευδαργύρου. Ωστόσο, η φυσιολογικώς δραστική μορφή της ινσουλίνης είναι μόνο η μονομερής. Ο σχηματισμός εξαμερούς παρουσία ψευδαργύρου, αλλά και συνθέτων συμπλεγμάτων με απλές πρωτεΐνες (όπως η πρωταμίνη) αξιοποιούνται φαρμακευτικά για την παραγωγή ινσουλινών "βραδείας αποδέσμευσης" και αυξημένης διάρκειας δράσης [7].

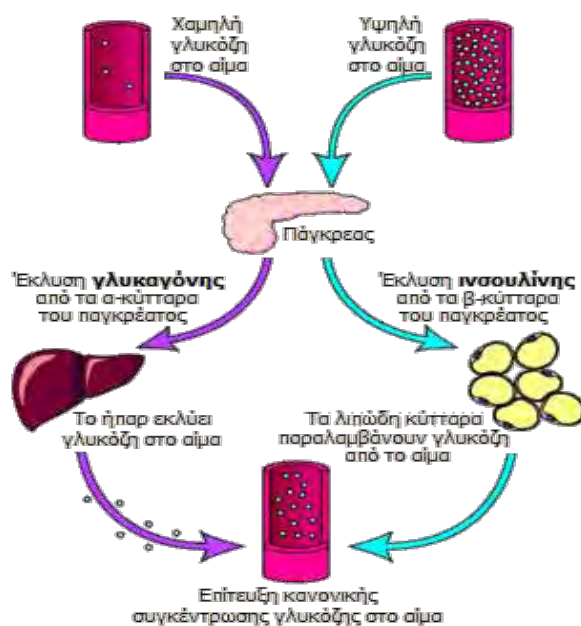


(α): Μονομερές ινσουλίνης (βιολογικώς δραστική μορφή). (β) Διμερές ινσουλίνης (η κυριότερη μορφή σε υδατικό διάλυμα). (γ) Εξαμερές ινσουλίνης συγκρατούμενο από δύο ιόντα $Zn(II)$ που συμπλέκονται μέσω της ιστιδίνης της β -αλυσίδας (B10-His) [7β].

3.1.2. Βιολογικός ρόλος της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη (glucagon) είναι πολυπεπτιδικές ορμόνες οι οποίες εκκρίνονται απ' ευθείας στην κυκλοφορία του αίματος από το πάγκρεας (ενδοκρινείς ορμόνες).

Με τις δύο αυτές ορμόνες ρυθμίζεται η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, που κατά μέσον όρο πρέπει να παραμένει σε μια στενή περιοχή (70 mg/dL έως 110 mg/dL). Και οι δύο ορμόνες παράγονται στα νησίδια Langerhans του παγκρέατος και έχουν ακριβώς αντίθετη δράση, γεγονός στο οποίο οφείλεται και η ρυθμιστική τους ικανότητα. Ακολουθεί ένα αρκετά απλουστευμένο σχήμα που δείχνει τον κεντρικό ρόλο του παγκρέατος στη ρύθμιση της γλυκόζης:



Η ινσουλίνη εκκρίνεται από τα β-κύτταρα που αποτελούν το 60-85% των κυττάρων των νησιδίων Langerhans. Τα β-κύτταρα "διεγείρονται" από τα μόρια γλυκόζης και η δράση της είναι ξεκάθαρα αναβολική. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, τόσο αυξάνει ο ρυθμός έκκρισης ινσουλίνης. Με τη σειρά της η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα είδη κυττάρων του οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα (adipocytes). Χωρίς την ινσουλίνη τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη που αποτελεί την κύρια πηγή χημικής ενέργειας. Επιπλέον, η ινσουλίνη προκαλεί την "αποταμίευση" γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ υπό τη μορφή γλυκογόνου (glycogen).

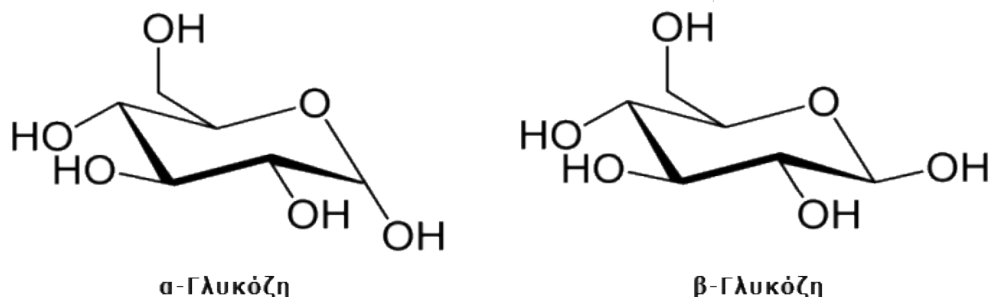
Εάν το ήπαρ "κορεσθεί" σε γλυκογόνο, η γλυκόζη αρχίζει να κατευθύνεται στα λιπώδη κύτταρα όπου χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και γλυκερόλης και τελικά τριγλυκεριδίων. Η ινσουλίνη "καθοδηγεί" τα κύτταρα,

όταν αυτά αναζητούν ενέργεια, να καταναλώσουν γλυκόζη αντί λιπαρών οξέων και επομένως εμπλέκεται στους μηχανισμούς συσσώρευσης λίπους στο σώμα. Πέραν της εμπλοκής της ινσουλίνης στο ισοζύγιο σακχάρου/λίπους, η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη αμινοξέων για σχηματισμό πρωτεϊνών, ενώ η έλλειψή της (όπως π.χ. σε καταστάσεις νηστείας) οδηγεί σε κατανάλωση και αλλοίωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών.

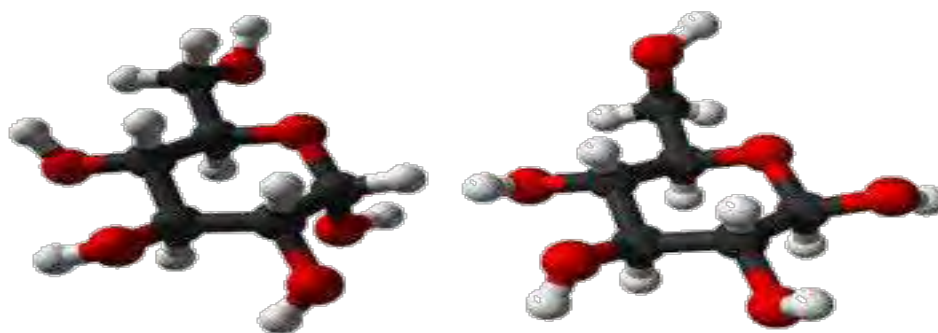
Η γλυκαγόνη εκκρίνεται από τα α-κύτταρα των παγκρεατικών νησιδίων και η δράση της είναι ξεκάθαρα καταβολική. Αντίθετα με την ινσουλίνη, η έκκρισή της διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης γλυκόζης του αίματος. Η έκκρισή της ενισχύεται από ορισμένα αμινοξέα και από τη μυϊκή δραστηριότητα. Η γλυκαγόνη αυξάνει τη στάθμη γλυκόζης στο αίμα επειδή διασπά το αποταμιευμένο στο ήπαρ (κυρίως) και στους μύες προς γλυκόζη. Επιπλέον, ενεργοποιεί τη λιπόλυση στους λιπώδεις ιστούς με αποτέλεσμα την αποδέσμευση λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία.

3.2. Γλυκόζη

3.2.1. Προσδιορισμός της δομής της γλυκόζης



Χημικός τύπος των δύο ανωμερών μορφών της γλυκόζης.



Τρισδιάστατες απεικονίσεις των δύο ανωμερών μορφών της γλυκόζης. Αριστερά: α -γλυκόζη, δεξιά: β -γλυκόζη.

Η γλυκόζη, η οποία ονομάζεται επίσης και δεξτρόζη ή σάκχαρο του αίματος, είναι ένας από τους κυριότερους μονοσακχαρίτες και αποτελείται από μια αλυσίδα έξι ατόμων άνθρακα συνδεδεμένων με δώδεκα άτομα υδρογόνου και έξι άτομα οξυγόνου με βάση τον χημικό τύπο $C_6H_{12}O_6$. Υπάρχει σαν φυσική ζάχαρη στις τροφές ενώ μπορεί να παραχθεί και στον οργανισμό σαν αποτέλεσμα της πέψης πιο περίπλοκων υδατανθράκων [McArdle et al., 2000].

Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς, αφού αποτελεί το προτιμώμενο καύσιμο για το κεντρικό νευρικό σύστημα. Εάν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα μειωθεί πολύ, τότε μειώνεται αντίστοιχα και η λειτουργία του εγκεφάλου [Γεωργάτσου, 1989]. Η γλυκόζη αποτελεί το ενεργειακό υπόστρωμα για τον μεταβολισμό του εγκεφάλου και υπολογίζεται ότι, το 60% περίπου της

ηπατικής παραγωγής σε γλυκόζη, χρησιμοποιείται για τις ανάγκες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επειδή η γλυκόζη διαδραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, η πυκνότητά της στο αίμα διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα ακόμη και κατά την διάρκεια έντονης μυϊκής άσκησης [McArdle et al., 2000].

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

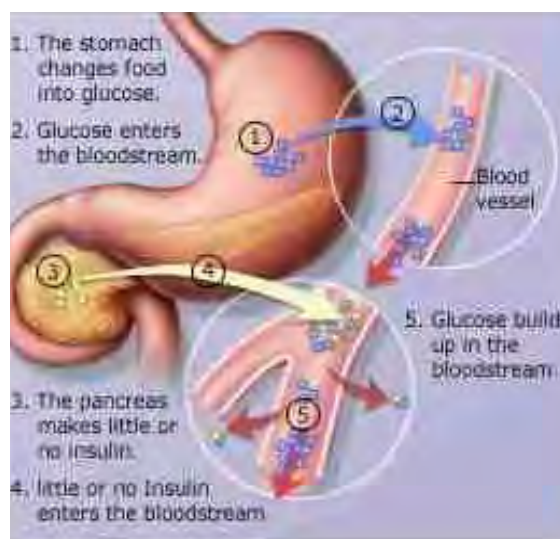
Ακόμη το ήπαρ μπορεί να εφοδιάσει το αίμα με γλυκόζη μέσω των διαδικασιών της γλυκογένεσης, κατά την οποία χρησιμοποιείται ο ανθρακικός σκελετός άλλων θρεπτικών ουσιών, και της γλυκογονόλυσης, κατά την οποία το ένζυμο GP διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη [Martin et al., 1998]. Η μετέπειτα πορεία που θα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

3.2.2. Ο ρόλος της γλυκόζης

Η γλυκόζη αποτελεί τον φυσιολογικό ρυθμιστή του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο ήπαρ, εφόσον αδρανοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου και δρα συνεργιστικά με την ινσουλίνη [Stalmans et al., 1974]. Η γλυκόζη σαν αλλοστερικός μεταβολίτης σταθεροποιεί την T διαμόρφωση της φωσφορυλάσης α (λιγότερο δραστική), γεγονός που εκθέτει την φωσφορική ομάδα της σερίνης (Ser) 14 στην υδρολυτική δράση της φωσφατάσης (PP-1G), η οποία μετατρέπει την GPα (φωσφορυλιωμένη GP) σε GPβ (μη φωσφορυλιωμένη) [Madsen et al.,

1978, Sprang et al., 1982]. Η μετατροπή της GPα σε GPβ συνοδεύεται από την απελευθέρωση της PP-1G, η οποία έχει πλέον την δυνατότητα να ενεργοποιήσει την συνθάση του γλυκογόνου (GS) [Bolen et al., 1992]. Επομένως, η ισορροπία μεταξύ της αποικοδόμησης και της σύνθεσης του γλυκογόνου ρυθμίζεται από αντιδράσεις φωσφορύλιωσης-αποφωσφορύλιωσης με κύριο ρυθμιστή την γλυκόζη.

Η γλυκόζη ως αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου συναγωνιστικά με το υπόστρωμα, σταθεροποιώντας παράλληλα την T διαμόρφωση η οποία είναι λιγότερο ενεργή, δίνοντας εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις με το βρόγχο της αλυσίδας 282-287 (280s), που παρεμποδίζει την πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο [Oikonomakos et al., 1987]

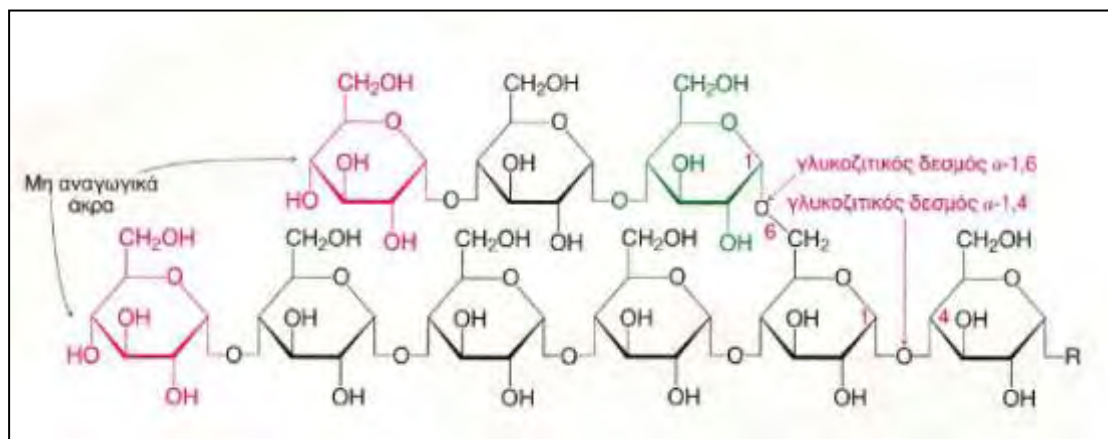


1. Το στομάχι μετατρέπει το φαγητό σε γλυκόζη
2. Η γλυκόζη εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος
3. Το πάγκρεας παράγει ελάχιστη ή καθόλου ινσουλίνη
4. Ελάχιστη ή καθόλου ινσουλίνη εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος
5. Η γλυκόζη συσσωρεύεται στο αίμα[8].

3.3. Γλυκογόνο

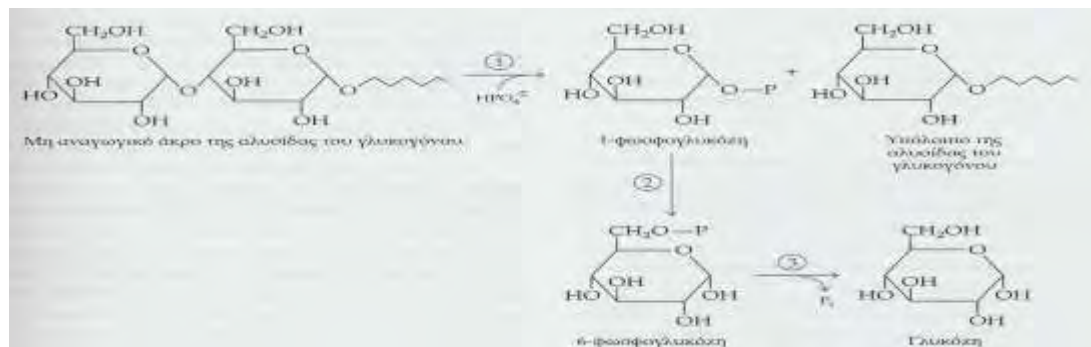
3.3.1. Ο ρόλος του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο, όπως προαναφέρθηκε, είναι η κύρια μορφή αποθήκευσης των υδατανθράκων στα κύτταρα των θηλαστικών, έχοντας τον ίδιο ρόλο με το άμυλο στα φυτά. Είναι μια από τις σημαντικότερες πηγές ενέργειας των ζωντανών οργανισμών, ένα καύσιμο που κινητοποιείται ταχύτατα και αποτελείται από ένα διακλαδισμένο πολυμερές μονάδων γλυκόζης. Οι περισσότερες μονάδες γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται με γλυκοζιτικούς δεσμούς α -1,4. Ανά 10 περίπου μονάδες δημιουργείται μία διακλάδωση με έναν γλυκοζιτικό δεσμό α -1,6. Οι διακλαδώσεις συμβάλουν στη διαλυτότητα του γλυκογόνου καθώς και στην αύξηση των μη-αναγωγικών άκρων με σκοπό την ταχύτερη αξιοποίηση του. Το γλυκογόνο απαντάται σε υψηλά ποσά στους μύς και στο ήπαρ, όπου και αποθηκεύεται στο κυτταρόπλασμα στη μορφή ένυδρων κόκκων. Οι υδατάνθρακες της διατροφής που δεν χρησιμοποιούνται για ενεργειακές ανάγκες, μετατρέπονται και αποθηκεύονται στο σώμα υπό μορφή γλυκογόνου.



Δομή του γλυκογόνου. Στη δομή αυτών των δυο εξωτερικών διακλαδώσεων ενός μορίου γλυκογόνου, τα κατάλοιπα στα μη αναγωγικά άκρα είναι κόκκινα και το κατάλοιπο με το οποίο αρχίζει μια διακλάδωση είναι πράσινο. Το υπόλοιπο του μορίου του γλυκογόνου συμβολίζεται με R.

Το μεγαλύτερο ποσοστό του μορίου του γλυκογόνου αποικοδομείται προς 1-φωσφορική γλυκόζη με τη δράση της φωσφορυλάσης. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του C-1 μίας τελικής μονάδας και του C-4 μιας γειτονικής, διασπάται από το ορθοφωσφορικό σε 1-φωσφορική γλυκόζη, η οποία μετατρέπεται αντιστρεπτά σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Η φωσφορική πυριδοξάλη, ένα παράγωγο της βιταμίνης Β6, συμμετέχει στη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου. Τα σημεία διακλάδωσης αποικοδομούνται με τη σύγχρονη δράση μίας μεταφοράς ολιγοσακχαριτών και μίας γλυκοζιτάσης. Το τελευταίο ένζυμο (γνωστό και ως ένζυμο αποδιακλάδωσης) καταλύει την υδρόλυση των δεσμών α-1,6, παράγοντας ελεύθερη γλυκόζη. Το γλυκογόνο συντίθεται με μια, διαφορετική πορεία. Η UDP-γλυκόζη, το ενεργοποιημένο ενδιάμεσο κατά τη σύνθεση του γλυκογόνου, σχηματίζεται από 1-φωσφορική γλυκόζη και UTP. Η συνθάση του γλυκογόνου καταλύει τη μεταφορά της γλυκόζης από την UDP-γλυκόζη προς το C-4 υδροξύλιο ενός τελικού καταλοίπου γλυκόζης στο αυξανόμενο μόριο γλυκογόνου. Ένα ένζυμο διακλάδωσης μετατρέπει μερικούς δεσμούς α-1,4 σε, α-1,6.



Γλυκογονόλυση: Έλεγχος από γλυκαγόνη (ήπαρ), επινεφρίνη (μυελός επινεφριδίων). Καταλύουν το βήμα 1 (ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου που υπόκειται σε ομοιοπολικό και αλλοστερικό έλεγχο). Η φωσφορυλάση υδrolύει τους α 1-4 γλυκοζιτικούς δεσμούς και όχι τους α 1-6. Έτσι η διαδικασία σταματά έως να δράσει στους α 1-6 ένα αποδιακλαδωτικό ένζυμο. Το βήμα 3 το υδrolύει 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.

Η δημιουργία του γλυκογόνου πραγματοποιείται μέσω μιας πρωτεΐνης, της γλυκογενίνης, η οποία αναλαμβάνει τη "σύνδεση" των πρώτων μορίων γλυκόζης και στη συνέχεια αναλαμβάνουν άλλα ένζυμα τη μεγέθυνση του μορίου. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στο κέντρο των σφαιριδίων γλυκογόνου.

Το γλυκογόνο χαρακτηρίζεται από περίπλοκη δομή με γλυκοζιτικούς δέσμους 1,4' και διακλαδώσεις 1,6' ανάλογες με εκείνες του αμύλου, αλλά εμφανιζόμενες με μεγαλύτερη συχνότητα (ανά 8 έως 10 μονάδες γλυκόζης). Τα μόρια του γλυκογόνου περιέχουν μέχρι και 100.000 μονάδες γλυκόζης [9].

Γιατί τα ζώα αποθηκεύουμε ενέργεια ως γλυκογόνο; Για να μην μετατραπεί όλο το πλεονάζον καύσιμο σε λιπαρά οξέα. Το γλυκογόνο είναι ένα σημαντικό απόθεμα καυσίμων για διάφορους λόγους. Η ελεγχόμενη κατανομή του και η απελευθέρωση της γλυκόζης, αυξάνει την ποσότητα γλυκόζης που διατίθεται μεταξύ των γευμάτων. Ως εκ τούτου, το γλυκογόνο χρησιμεύει ως ενδιάμεσο για τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, επειδή η γλυκόζη είναι σχεδόν το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιείται από τον εγκέφαλο, εκτός κατά τη διάρκεια παρατεταμένης αστικής. Επιπλέον, η γλυκόζη από το γλυκογόνο μπορεί εύκολα να κινητοποιηθεί, θα είναι επομένως μια καλή πηγή ενέργειας για την ξαφνική, έντονη δραστηριότητα. Σε αντίθεση με τα λιπαρά οξέα, η γλυκόζη μπορεί να επιτρέψει την παροχή ενέργειας στην απουσία οξυγόνου και έτσι μπορεί να παρέχει ενέργεια για αναερόβια δραστηριότητα.

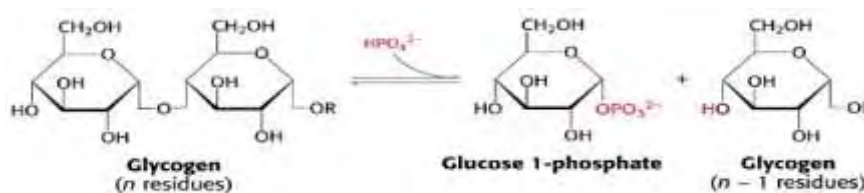
Οι δυο μεγάλες περιοχές της αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ απ' ότι στους μύς (10% έναντι 2% κατά βάρος) αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύς συνολικά λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας του. Το γλυκογόνο είναι παρόν στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή κόκκων που κυμαίνονται σε διάμετρο 10 έως 40 nm. Στο ήπαρ, η σύνθεση του γλυκογόνου και η αποικοδόμηση ρυθμίζονται για τη διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, όπως απαιτείται για να καλύψει τις ανάγκες του οργανισμού στο σύνολο του. Αντίθετα, στους μύες, προμηθεύει τον ιστό με γλυκόζη που μέσω της

γλυκόλυσης, θα δώσει το ATP που απαιτείται για την μυϊκή δραστηριότητα, οι διαδικασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του ίδιου του μυός.

3.3.2. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο αποικοδομείται, ως ένα ορισμένο βαθμό, από τη φωσφορυλάση και μόνο, αν και οι γλυκοζιτικοί δεσμοί α-1,6 στα σημεία διακλάδωσης δε διασπώνται από τη φωσφορυλάση, η οποία σταματά τη διάσπαση των δεσμών α-1,4 όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο της διακλάδωσης.

Γλυκογόνο (n κατάλοιπα) + Pi → 1-φωσφορική-γλυκόζη + γλυκογόνο (n - 1 κατάλοιπα)



Διάσπαση του γλυκογόνου σε 1-P γλυκόζη από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου, ένζυμο που καταλύει την αντίδραση του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη με την προσθήκη ανόργανου φωσφορικού.

Για την αποικοδόμηση απαιτείται η φωσφορυλάση του γλυκογόνου η οποία καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης καθώς και ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, η γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς και μια μεταφοράση. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται.

Η ρύθμιση της δραστηριότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου γίνεται ομοιοπολικά (με φωσφορυλίωση- αποφωσφορυλίωση) και αλλοστερικά (πρόσδεση αλλοστερικών ενεργοποιητών και αναστολέων).

Η αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την 1-φωσφορική γλυκόζη είναι 3.6.

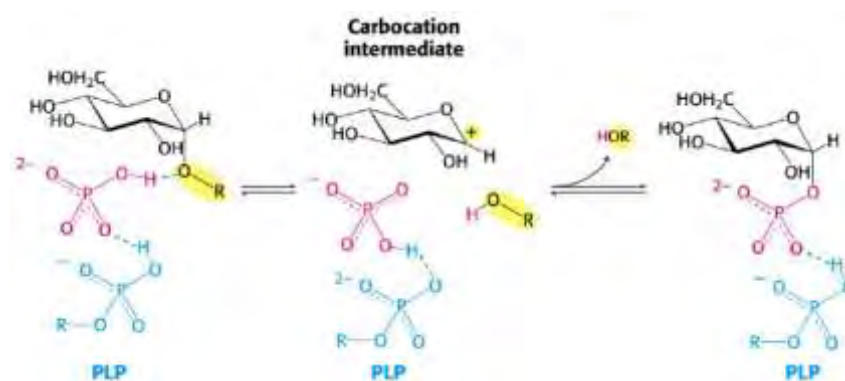
Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη.

3.4. Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου

Από τις 6 βιταμίνες Β6 η πιο σημαντική ποσοτικά και βιολογικά είναι η φωσφορική πυριδοξάλη. Η φωσφορική πυριδοξάλη αποτελεί συμπράγοντα πολλών ενζύμων στα οποία περιλαμβάνονται οι τρανσαμινάσες, οι αποκαρβοξυλάσες των α-αμινοξέων και η γλυκογονική φωσφορυλάση.

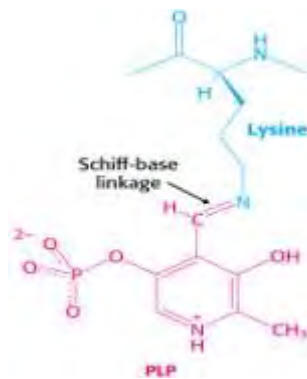
Η φωσφορυλάση διασπά, με απουσία νερού από το ενεργό κέντρο, το γλυκογόνο φωσφορολυτικά με εξοικονόμηση ATP το οποίο απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης.

Το υπόστρωμα του γλυκογόνου και η 1-φωσφορική γλυκόζη έχουν διαμόρφωση α στον C-1, πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το προϊόν, 1-φωσφορική γλυκόζη, έχει διαμόρφωση β αντί για α επειδή απαιτείται άρτιος αριθμός βημάτων, ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη.



Γενικός μηχανισμός οξεοβασικής κατάλυσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου: δημιουργία καρβοκατιόντος. Η ένδειξη PLP αφορά τη φωσφορική πυριδοξάλη συνδεδεμένη με μία βάση του Schiff στην ε-NH₂ της λυσίνης 680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α-D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο.

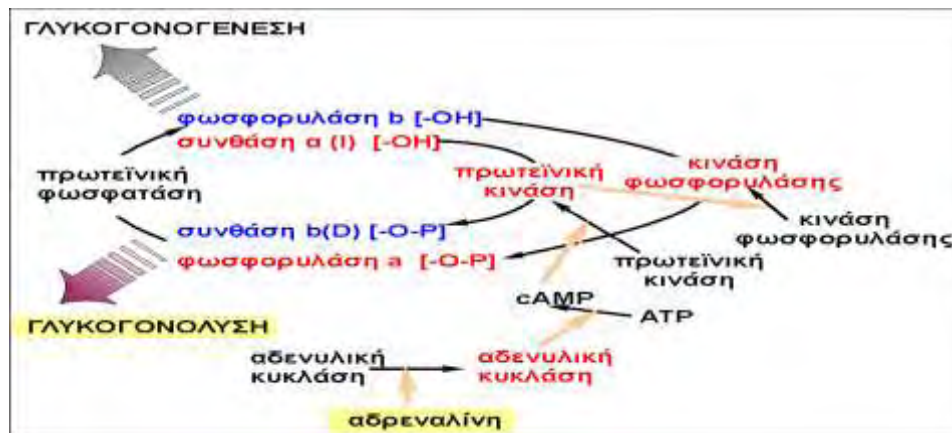
Για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, απαιτείται η ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B₆). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου.



Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης

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 ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης (δότης και δέκτης πρωτονίων). Το ορθοφωσφορικό δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου ενώ 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.

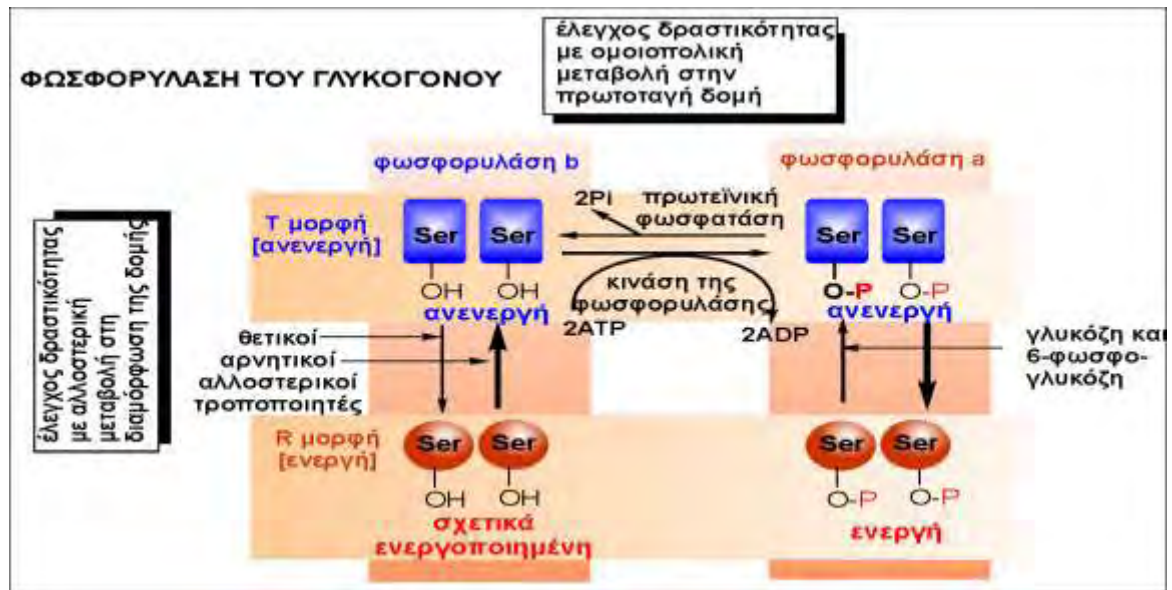
3.5. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου



Η GP είναι μια ομοδιμερή πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ό,τι 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. Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές αλλά και το κέντρο σύνδεσης του γλυκογόνου.

Η φωσφορυλάση (GP), ένα διμερές ένζυμο, ρυθμίζεται από αλλοστερικούς τροποποιητές και αντιστρεπτές ομοιοπολικές, τροποποιήσεις. Η μη φωσφορυλιωμένη μορφή της φωσφορυλάσης, φωσφορυλάση b, η οποία συνήθως είναι αδρανής, μετατρέπεται σε ενεργό (πολύ δραστική) φωσφορυλάση a με τη φωσφορυλίωση μίας σερίνης της πεπτιδικής της αλυσίδας κάθε υπομονάδας. Η μορφή b μπορεί να ενεργοποιηθεί επίσης και από τη δέσμευση του AMP. Η μορφή a στο ήπαρ αναστέλλεται από τη γλυκόζη, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση γλυκόζης από το γλυκογόνο κατά τη μυϊκή συστολή. Οι φωσφορικές ομάδες των ενζύμων αυτών απομακρύνονται από την ίδια φωσφατάση. Οι θέσεις δέσμευσης του AMP και της φωσφορυλίωσης εντοπίζονται στην επιφάνεια επαφής μεταξύ των

υπομονάδων. Οι αλλαγές στη στερεοδιάταξη που προκαλούνται από τη δέσμευση του AMP και τη φωσφορυλίωση, μεταφέρονται σε αποστάσεις μεγαλύτερες από 30 Å, στα καταλυτικά κέντρα και σε άλλες θέσεις δέσμευσης. Η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται από έναν ενισχυτικό καταρράκτη αντιδράσεων. Η συνθάση του γλυκογόνου είναι ανενεργός όταν η φωσφορυλάση είναι ενεργός, και αντίστροφα. Η επινεφρίνη και η γλυκαγόνη διεγείρουν την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και αναστέλλουν τη σύνθεσή του, με την αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του κυκλικού AMP, το οποίο ενεργοποιεί μία πρωτεϊνική κινάση. Η συνθάση του γλυκογόνου απενεργοποιείται τότε με μία φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλάση, η οποία επίσης είναι υπόστρωμα αυτής της κινάσης, γίνεται πιο ενεργός με τη φωσφορυλίωσή της. Άρα, το κυκλικό AMP οδηγεί στην κινητοποίηση της γλυκόζης από το γλυκογόνο. Η κινάση που ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση διεγείρεται ακόμη από τη συγκέντρωση του Ca^{2+} με αποτέλεσμα την κινητοποίηση γλυκόζης από το γλυκογόνο κατά τη μυϊκή συστολή. Οι φωσφορικές ομάδες των ενζύμων αυτών απομακρύνονται από την ίδια φωσφατάση. Η συνθάση του γλυκογόνου και η φωσφορυλάση ρυθμίζονται επίσης από μη ομοιοπολικές αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις. Πράγματι, η φωσφορυλάση είναι ένα απαραίτητο στοιχείο του αισθητηρίου συστήματος της γλυκόζης των ηπατικών κυττάρων. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου δίνει ένα παράδειγμα του βασικού ρόλου των αντιστρεπτών φωσφορυλιώσεων στη ρύθμιση βιολογικών διεργασιών.



Το ένζυμο που προσθέτει την φωσφορική ομάδα στη φωσφορυλάση είναι κινάση της φωσφορυλάσης. Η απομάκρυνση της φωσφορική ομάδα γίνεται από την πρωτεϊνική φωσφατάση.

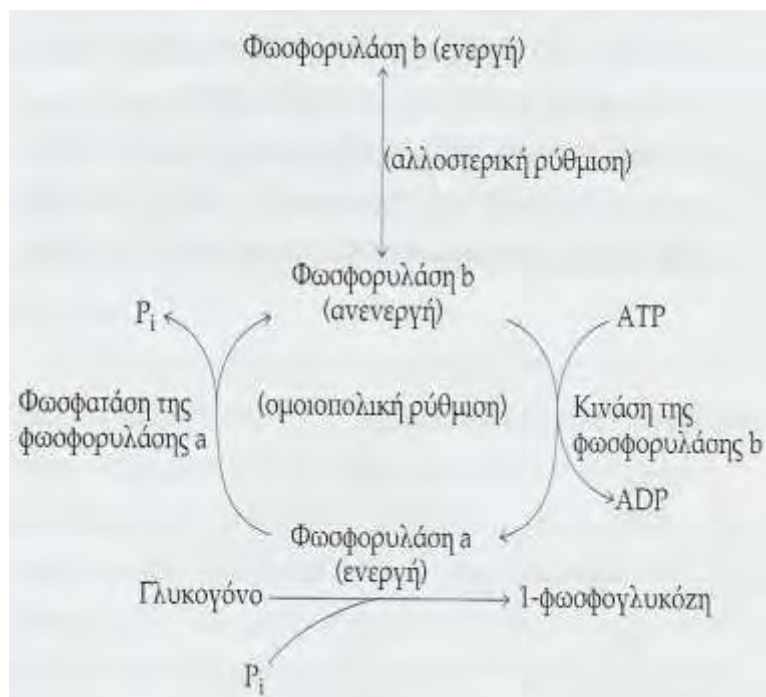
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ενεργοποιείται σε καταστάσεις έλλειψης γλυκόζης ως απόκριση στην ορμόνη γλυκαγόνη. Το σήμα της έλλειψης γλυκόζης στο αίμα μεταβιβάζεται μέσα στα κύτταρα μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει μια σειρά από φωσφορυλιώσεις πρωτεϊνών με τελευταίο το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Έτσι το κύτταρο χρησιμοποιεί τα αποθέματα γλυκόζης για να εξασφαλίσει την απαραίτητη ενέργεια.

Για την σύνθεση του γλυκογόνου απαιτείται η συνθάση του γλυκογόνου και ένα ένζυμο διακλάδωσης. Για την σύνθεση του γλυκογόνου είναι επίσης απαραίτητη η "ενεργοποίηση" της γλυκόζης σε UDP- γλυκόζη.

3.5.1. Ομοιοπολική και αλλοστερική ρύθμιση φωσφορυλάσης.

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

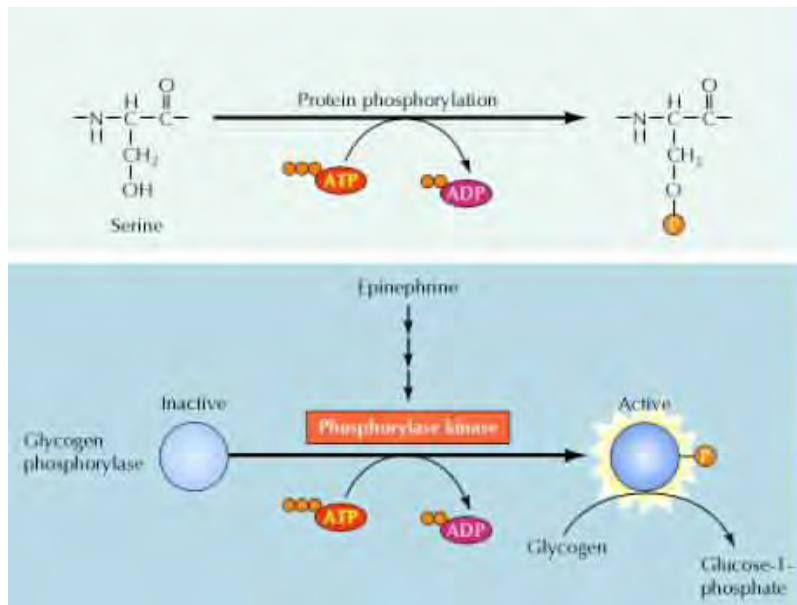
μια συνήθως ανενεργή φωσφορυλάση b. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η κινάση της φωσφορυλάσης καταλύει την ομοιοπολική τροποποίηση ρυθμίζοντας φυσιολογικά τη δραστηριότητά της GP. Η κινάση μετά από ένα ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G, (PP-G1) υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό και η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP).



Ομοιοπολική ρύθμιση: Επηρεάζεται από τη επινεφρίνη (γλυκογονόλυση στους μύες) και γλυκαγόνη (ήπαρ). Δρουν μέσω της ενεργοποίησης 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.



Αλλοστερική ρύθμιση: Εμπλέκει τον θετικό τροποποιητή AMP, ο οποίος προκαλεί μία μορφολογική τροποποίηση της ανενεργής β μορφής σε ενεργή α μορφή. Το ATP ανταγωνίζεται το AMP για την αλλοστερική θέση του ενζύμου. Τα υψηλά επίπεδα ATP εμποδίζουν την μετατροπή του ενζύμου από την ανενεργή στην ενεργή μορφή. Στις αλλοστερικές τροποποιήσεις δεν πραγματοποιούνται ομοιοπολικές τροποποιήσεις μέσω φωσφορυλίωσης.

3.5.2. Κέντρα σύνδεσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση αποτελεί ένα πολυμελετημένο ένζυμο και συγχρόνως πολύπλοκο. Σαν αλλοστερικό ένζυμο υπάρχει σε δύο μορφές, την αδρανή (**T** μορφή) και τη δραστική (**R** μορφή). Έχει βρεθεί ότι οι δύο αυτές μορφές συνυπάρχουν και για τις δύο φωσφορυλάσες (**a** και **b**), δηλαδή η **T** μορφή με φωσφορυλίωση ή με την πρόσδεση κάποιων τροποποιητών μεταπίπτει στην **R** μορφή, ενώ η **R** μορφή με απόσπαση της φωσφορικής ομάδας ή με την πρόσδεση κάποιων άλλων τροποποιητών μεταπίπτει στην **T** μορφή.

Η δραστικότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ελέγχεται και από αναστολείς και αλλοστερικούς τροποποιητές που συνδέονται σε ειδικά κέντρα σύνδεσης, στο καταλυτικό κέντρο, το κέντρο αναστολής και το αλλοστερικό κέντρο. Στο καταλυτικό κέντρο συνδέεται η γλυκόζη, φυσιολογικός αναστολέας, που προκαλεί αναστολή εμποδίζοντας τη σύνδεση του υποστρώματος και προκαλώντας μετατόπιση της ισορροπίας προς την λιγότερο δραστική **T** διαμόρφωση. Στο κέντρο αναστολής (κέντρο πουρινών) συνδέονται νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια (το τμήμα των βάσεων) προκαλώντας μπλοκάρισμα του καταλυτικού κέντρου μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την **T** διαμόρφωση. Τέλος στο αλλοστερικό κέντρο συνδέεται η 6-φωσφορική γλυκόζη προκαλώντας μετατόπιση προς την **T** κατάσταση, το AMP προκαλεί ενεργοποίηση μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την **R** κατάσταση και το ATP που απλά ανταγωνίζεται το AMP .

Κάθε υπομονάδα της φωσφορυλάσης περιλαμβάνει τα ακόλουθα κέντρα σύνδεσης:

- Το ενεργό κέντρο που συνδέεται το υπόστρωμα. Στο κέντρο αυτό το υπόστρωμα φθάνει μέσα από ένα κανάλι, το οποίο στην **T** μορφή καλύπτεται από ένα πεπτιδικό βρόγχο.

- Ένα κέντρο που συνδέεται μέρος της γλυκοζιτικής αλυσίδας του γλυκογόνου και έχει δράση ανάλογη με εκείνη της αλλοστερικής ρύθμισης.
- Ένα αλλοστερικό κέντρο επαφής με την άλλη υπομονάδα.
- Ένα αλλοστερικό κέντρο που δέχεται αλλοστερικούς τροποποιητές
 - θετικούς (AMP, IMP, Pi, SO₄²⁻, 1-φωσφο-γλυκόζη κ.λπ.) που ευνοούν την R μορφή της μη φωσφορυλιωμένης φωσφορυλάσης b ή
 - αρνητικούς (ATP, ADP, UDP-γλυκόζη, 6-φωσφογλυκόζη, γλυκόζη κ.λπ.) που ευνοούν την T μορφή της μη φωσφορυλιωμένης φωσφορυλάσης b .

Κατ’ αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται ανενεργές ή σχετικά ενεργοποιημένες μορφές του μη φωσφορυλιωμένου ενζύμου.

- Ένα άλλο κέντρο αναστολής, κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, που 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.

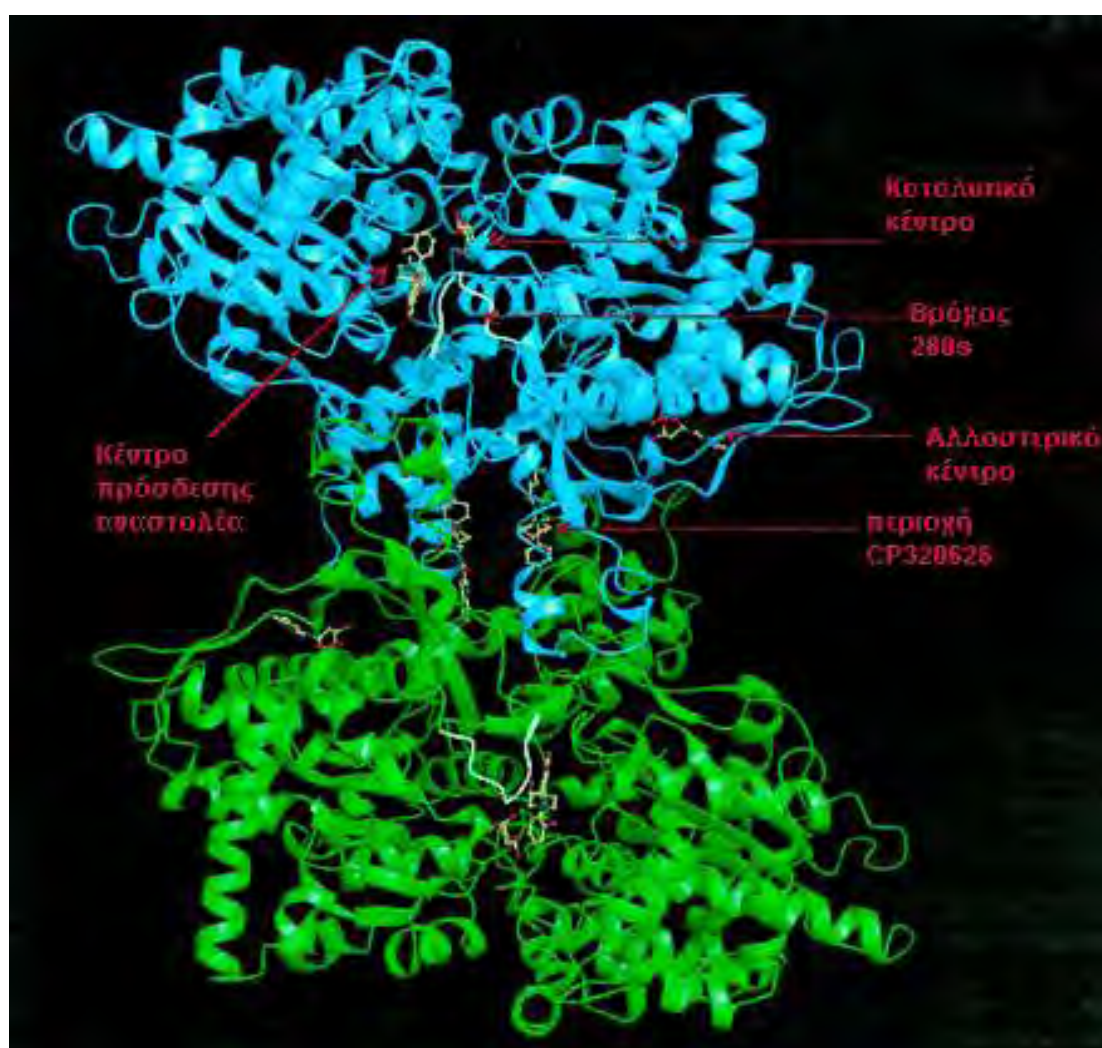
Όταν συνδεθεί στη φωσφορυλιωμένη μορφή του ενζύμου (τη φωσφορυλάση a) μια γλυκόζη ή μια 6-φωσφογλυκόζη, η R φωσφορυλιωμένη μορφή μεταπίπτει στην T φωσφορυλιωμένη μορφή, που είναι ανενεργή. Όταν συνδεθεί μια 6-φωσφογλυκόζη, τότε επιπλέον, προσδένεται η φωσφορυλάση a στην πρωτεϊνική φωσφατάση και υδρολύεται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

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, 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. Συμφωνά με το μοντέλο αυτής της αναστολής, ο αναστολέας δεσμεύεται στο καταλυτικό κέντρο και εμποδίζει το σχηματισμό του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.



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

3.6. Ενζυμική αντίδραση και δραστικότητα

3.6.1. Χημικοί Παράγοντες που επηρεάζουν

Είναι αποδεκτό ότι μόνο μία μικρή περιοχή (*ενεργός περιοχή*) του συνολικού ενζυμικού μορίου εμπλέκεται άμεσα στην καταλυτική διεργασία, ένας δε κύριος ρόλος του υπόλοιπου μορίου είναι να διατηρεί την ενεργό περιοχή σε στερεοδιατάξεις καταλυτικά δραστικές, ώστε να δεσμεύει και δρα στα υποστρώματα. Συνέπεια αυτού είναι τα ένζυμα, στην πράξη, να εμφανίζουν δύο άριστες (βέλτιστες) συνθήκες. Μία που αφορά στη δομική σταθερότητα του μορίου γενικά και μια που αφορά άμεσα στην καταλυτική ικανότητα (δραστικότητα) και αντικατοπτρίζει την κατάσταση στην ενεργό περιοχή. Οι δύο άριστες συνθήκες συνήθως δεν συμπίπτουν, μάλιστα δε, οι άριστες σταθερότητας παρουσιάζουν πλατύτερο εύρος τιμών συγκριτικά με τις άριστες δραστικότητας.

Η σταθερότητα ενός ενζύμου έχει μεγάλη σημασία για τη βιομηχανική ενζυμολογία. Εκτός από τη δυνατότητα ακινητοποιήσεως (καθελώσεως) του ενζύμου σε στερεά φάση, σταθεροποίηση είναι δυνατόν να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας το ένζυμο σε περιβάλλον με αυξημένη συγκέντρωση υποστρώματος. Αυτό, συχνά, παρέχει τη δυνατότητα βιομηχανικής εφαρμογής του ενζύμου σε διεργασίες αυξημένης θερμοκρασίας, εάν παράλληλα χρησιμοποιηθεί υψηλή $[S]$. Επίσης, ορισμένα μεταλλοϊόντα είναι δυνατόν να δράσουν, εκτός από ενεργοποιητές (activators) (ουσίες απαραίτητες για ενεργοποίηση του ενζύμου, ώστε να δρα καταλυτικά), και ως σταθεροποιητές (stabilizers). Λόγου χάριν, η α-αμυλάση από διαφορετικά βακτήρια εμφανίζει αυξανόμενη σταθερότητα για αυξανόμενη $[Ca^{2+}]$ συναρτήσει του χρόνου επώασεως.

Ως αναστολείς (παρεμποδιστές, inhibitors) θεωρούνται ουσίες οι οποίες, σε χαμηλή συγκέντρωση, ελαττώνουν της ταχύτητα της ενζυμικής αντιδράσεως, 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. Οι αναστολείς διακρίνονται σε αντιστρεπτούς (reversible) και μη αντιστρεπτούς (irreversible). Οι αντιστρεπτοί

αναστολείς δεσμεύονται κατά τρόπο αντιστρέψιμο με το ένζυμο, οπότε το τελευταίο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστηριότητά 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. Αντίθετα, οι μη αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται κατά τρόπο μόνιμο (π.χ. σχηματισμός ομοιοπολικού δεσμού), οπότε το ένζυμο αδρανοποιείται, συνήθως, οριστικά.

Στην κλασική ενζυμική κινητική διακρίνονται διάφορα είδη αντιστρεπτής αναστολής, π.χ. συναγωνιστική, ανταγωνιστική, μικτή, μη συναγωνιστική, μερική, υποστρώματος, προϊόντος και αλλοστερική. Όλες διακρίνονται μεταξύ τους μέσω κινητικής μελέτης που βασίζεται στην αρχική αντίδραση. Αντίθετα, στην εφαρμοσμένη ενζυμολογία το ενδιαφέρον εστιάζεται κυρίως στην ολική αντίδραση και την επίδραση του αναστολέα σε αυτή, πολύ λιγότερο δε στο μηχανισμό αναστολής. Τα πλέον ενδιαφέροντα είδη αντιστρεπτής αναστολής για την εφαρμοσμένη ενζυμολογία είναι αυτά που εξετάζονται στη συνέχεια. Σημειώνεται ότι στις περισσότερες ενζυμικές τεχνολογικές εφαρμογές, οι ουσίες που προκαλούν αναστολή είναι δυνατόν να ελεγχθούν και να απομακρυνθούν από το ενζυμικό περιβάλλον ή τουλάχιστον να μειωθεί δραστικά η παρεμπόδιση που προξενούν στην αντίδραση.

3.6.1.1. Υπόστρωμα και προϊόν ως αναστολείς του ενζύμου

Δύο περιπτώσεις αναστολής του ενζύμου είναι αυτές που οφείλονται στην υψηλή συγκέντρωση είτε υποστρώματος, S , είτε προϊόντος, P .

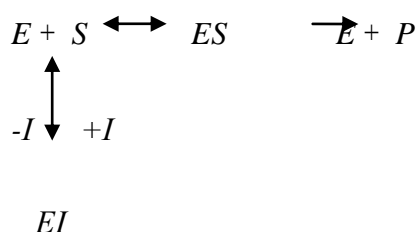
Αναστολή του ενζύμου από υπόστρωμα. Η περίπτωση της ενζυμικής αναστολής από υπόστρωμα (substrate inhibition) είναι αντίστοιχη της ονομαζόμενης ανταγωνιστικής αναστολής (uncompetitive inhibition) ως προς το ότι υψηλή $[S]$ οδηγεί σε δέσμευση και δεύτερου μορίου υποστρώματος στο ενζυμικό μόριο.

Αναστολή του ενζύμου από προϊόν. Η περίπτωση της ενζυμικής αναστολής από προϊόν (product inhibition) δεν αποτελεί πρόβλημα σε περιπτώσεις κατά τις οποίες σε κινητικές μελέτες λαμβάνεται η αρχική ταχύτητα.

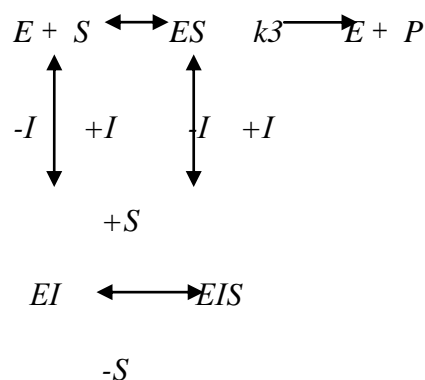
3.6.1.2. Συναγωνιστική και μη συναγωνιστική αναστολή του ενζύμου

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 αντίδρασης δίδεται από τις σχέσεις που παρουσιάζονται στη συνέχεια, ανάλογα με τον τύπο της αναστολής.

Συναγωνιστική αναστολή. Ο αναστολέας έχει δομή παρόμοια με εκείνη του υποστρώματος και δεσμεύεται στο ένζυμο στη θέση του υποστρώματος, δηλαδή αναστολέας και υπόστρωμα συναγωνίζονται για την ίδια θέση του ενζύμου. Ένα ενδιαφέρον παράδειγμα αποτελεί η βιομηχανική βιομετατροπή του σιροπιού γλυκόζης σε εκείνο φρουκτόζης από το ένζυμο *ισομεράση γλυκόζης*. Το αρχικό υπόστρωμα γλυκόζη περιέχει και λίγη σορβιτόλη (προέρχεται ως πρόσμιξη του ενζύμου *γλυκοαμυλάσης* που χρησιμοποιείται για την παραγωγή γλυκόζης από άμυλο) η οποία συμπεριφέρεται ως συναγωνιστικός αναστολέας της ισομεράσης γλυκόζης έναντι της γλυκόζης με την οποία έχει παρόμοια δομή. Εάν χρησιμοποιηθεί υψηλή συγκέντρωση γλυκοαμυλάσης, προκειμένου να ολοκληρωθεί η παραγωγή γλυκόζης σύντομα (< 12 ώρες), η συγκέντρωση σορβιτόλης στο σιρόπι γλυκόζης θα είναι αρκούτσως υψηλή ώστε να παρεμποδίζεται η αντίδραση της ισομεράσης γλυκόζης.



Μη συναγωνιστική αναστολή. Ο αναστολέας δεσμεύεται στο ένζυμο σε θέση διαφορετική από τη θέση του υποστρώματος και σχηματίζει μη καταλυτικό (αδρανές) σύμπλοκο, χωρίς παράλληλα να απαγορεύει τη δέσμευση υποστρώματος στο σύμπλοκο. Αυτό συνεπάγεται ότι 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.* Επειδή 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, ωστόσο, εφικτό εάν εφαρμοσθεί κινητική μελέτη χρησιμοποιώντας αρχική ταχύτητα αντιδράσεως. Σημειώνεται ότι είναι σχετικά σπάνιες οι περιπτώσεις ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις ενός υποστρώματος και επιδεικνύουν μη συναγωνιστική αναστολή. Αν και η δέσμευση μεταλλοκατιόντων σε ορισμένα ένζυμα εμφανίζεται να ακολουθεί τέτοιο είδος αναστολή, ενδεχομένως σε κάποιες περιπτώσεις να πρόκειται περί *μη αντιστρεπτής αναστολής* αφού αυτά τα δύο είδη αναστολής συχνά συμπίπτουν στα κινητικά τους δεδομένα.



K_i είναι οι *σταθερές αναστολής* ή οι *σταθερές διαστάσεως* των συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, EI , και ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος, EIS , και ισούνται προς $[E][I]/[EI]$ και $[ES][I]/[EIS]$, αντίστοιχα, είναι δε μεταξύ

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

3.6.1.3. Μη αντιστρεπτή αναστολή (αδρανοποίηση) του ενζύμου

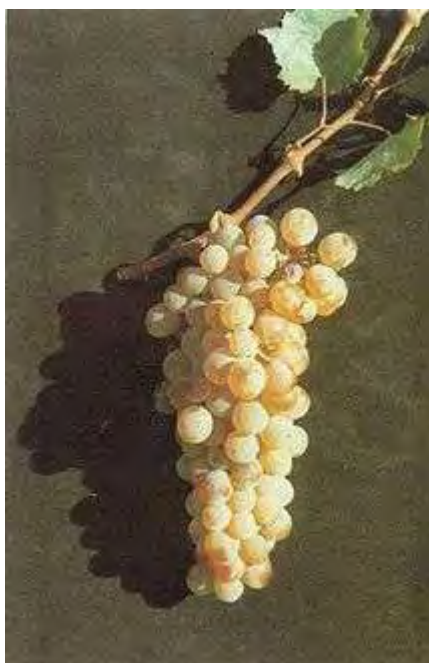
Στην περίπτωση αυτή, ο αναστολέας-αδρανοποιητής δεσμεύεται στο ένζυμο με ομοιοπολικό (χημικό) δεσμό κατά τρόπο πρακτικά μη αντιστρέψιμο. Στην περίπτωση αυτή, ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του δραστικού ενζύμου. Η ποιοτική διαφορά μεταξύ *μη αντιστρεπτής* και *μη συναγωνιστικής* αναστολής είναι 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 $[Et]\{1 - ([I]/[Et])\}$, ενώ η K_m παραμένει αμετάβλητη.

3.7. Αναστολέας «Ασσύρτικο»

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η δράση πολυφαινολικού εκχυλίσματος των βοστρύχων της ποικιλίας αμπέλου Ασσύρτικο.

Καμία άλλη ποικιλία δεν έχει συνδεθεί με έναν τόπο όσο το Ασσύρτικο και η Σαντορίνη. Τα περιέργα κλαδεμένα σε σχήμα καλαθιού και απλωμένα

στα άνυδρα χωράφια, αμπέλια παράγουν μερικά από τα πιο ονομαστά κρασιά της Ελλάδας.



Η αμπελοκαλλιέργεια στην περιοχή έχει ξεκινήσει την Εποχή του Χαλκού, τουλάχιστον πριν από το 1700 π.Χ., ενώ δεν διεκόπη σχεδόν καθόλου μέχρι και τις μέρες μας. Το σαντορινιό κρασί όλους αυτούς τους αιώνες εξαγόταν στις πλέον ονομαστές αγορές του κόσμου χτίζοντας αξιοζήλευτη φήμη, η οποία ταξίδεψε μέχρι τις μέρες μας, ενώ αποτέλεσε πηγή εσόδων για τους ντόπιους, οι οποίοι δεν είχαν και πολλές επιλογές. Το ταξίδι δεν ήταν εύκολο αφού περνούσε από μεγάλες φυσικές καταστροφές, με πιο πρόσφατη την έκρηξη του ηφαιστείου το 1956, τη μετανάστευση, τις αντίξοες καιρικές συνθήκες ενώ δεν πρέπει να ξεχνάμε την απόσταση που χωρίζει τη Σαντορίνη από την ηπειρωτική Ελλάδα.

Χαρακτηριστικό της ποικιλίας όταν καλλιεργείται στη Σαντορίνη είναι ο μοναδικός μεταλλικός, «ηφαιστειακός» χαρακτήρας του κρασιού και η υψηλή οξύτητα, η οποία, αντίθετα με σχεδόν όλες τις άλλες ποικιλίες, δεν αλλοιώνεται σε βάθος χρόνου.

Η έντονη μεταλλικότητα που οφείλεται στα φτωχά εδάφη του αμπελώνα τα οποία όμως είναι πλούσια σε ασβέστιο, άμμο και ιχνοστοιχεία, είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των Ασύρτικων της Σαντορίνης.

4. Γενική μεθοδολογία πειραμάτων και υλικά

4.1. Απομόνωση ενζύμου, παρασκευή φωσφορυλάσης b από σκελετικούς μυς κουνελιού

Η μέθοδος των Fischer & Krebs είναι αυτή που χρησιμοποιείται ώστε να απομονωθεί η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού, με μικρές μόνο τροποποιήσεις (χρησιμοποίηση 2-μερκαπτοαιθανόλης αντί L-κυστεΐνης ως αναγωγικού παράγοντα) .

Υλικά

- 3 κουνέλια μετρίου μεγέθους
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, /HCl : 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης : 1 mM EDTA, 0.5mM DTT-διθειοθρεϊτόλης)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου (KHCO₃)
- Διάλυμα οξικού οξέος 1N
- Διάλυμα θειικού αμμωνίου κορεσμού 90%
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (τρικς-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου)/ HCl 0.001M (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH7.0) εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα (CH₃COO)₂Mg 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μembrάνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO₃ και 10mM EDTA στους 100°C και συνεχείς

Εργαστηριακός εξοπλισμός

Φασματοφωτόμετρο

Φυγόκεντρος

Πεχάμετρο

Αναλυτικός ζυγός

Χρονόμετρο

4.1.1. Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου

Αφαιρούνται με προσοχή οι σκελετικοί μυς από τα 3 κουνέλια. Οι μυς αλέθονται με μηχανή του κιμά και ζυγίζονται. Η ποσότητα του κιμά συγκεντρώνεται σταδιακά και διατηρείται σε ψυγείο στους 4 °C. Με τα πέρας του αλέσματος, ο κιμάς εκχυλίζεται με ίση ποσότητα απιονισμένου κρύου νερού για 10 min δύο φορές και μία τρίτη με ποσότητα απιονισμένου ύδατος ίση με το ήμισυ του βάρους του κιμά. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 30 λεπτά και όταν πραγματοποιείται η ζύμωση του κιμά με το νερό το εκχύλισμα διατηρείται στους 4 °C. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

4.1.2. Όξινη καταβύθιση άλλων πρωτεϊνών

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH₃COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολερότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (5000rpm) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθείται με

αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κεκορεσμένο KHCO_3 και ογκομέτρηση του διαλύματος.

4.1.3. Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με διάλυμα θειικού αμμωνίου κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειικού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L πρωτεϊνικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 30min σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου νερού σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M με pH 7.5 για 16 ώρες.

4.1.4. Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζετε με φυγοκέντρηση στις 5500 rpm για 30 min στους 0-4 °C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M pH7.0 όγκου ίσο με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος EDTA 0.1M pH7.0 ίσο με το 5×10^{-3} του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH στα 8,8. Μετά από επώαση του μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH_3COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και το υπερκείμενο ενζυμικό διάλυμα ογκομετράται.

4.1.5. Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη 1mL AMP 0.1M (pH 7.0) και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, (το AMP και το $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστο 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 15500rpm για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραιώσης (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 17500rpm για 10min σε θερμοκρασία 20-24°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0°C για ελάχιστο χρονικό διάστημα 6h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP.

4.1.6. Συλλογή και αποθήκευση 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. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20 °C.

4.2. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

4.2.1. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb

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 αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen_(n)**:



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.

Πορεία:

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM β -γλυκερινοφωσφορικού νατρίου 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA pH 6.8 και λαμβάνεται το εναιώρημα ενζύμου. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25 μg ενζύμου ανά mL, γλυκογόνο 5 % (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ένζυμου 5% (v/v). Επίσης, σε μια σειρά δοκιμαστικών σωληνίων παρασκευάζονται όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α -D-Glc-1-P 2.0mM με προσθήκη 200 μL υποστρώματος α -D- Glc -1-P 9.0mM, 18 μL AMP 50mM και 502 μL H_2O .

Το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση σε υδατόλουτρο στους 30°C για 15 λεπτά. Μετά την επώαση, προστίθενται 180 μL από το ενζυμικό μείγμα στον σωλήνα του υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες : 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υποστρώματα α -D-Glc-1-P από 2 mM έως 20 mM , η θερμοκρασία είναι 30° C και το pH 6.8.

Ανά τακτά και καθορισμένα χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού), λαμβάνονται δείγματα των 200 μL από το διάλυμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1%. Το SDS, είναι απορρυπαντικό και προκαλεί την αποδιάταξη και την αδρανοποίηση του ενζύμου.

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

4.2.2. Παρασκευή μίγματος φωσφορυλάσης b - γλυκογόνου

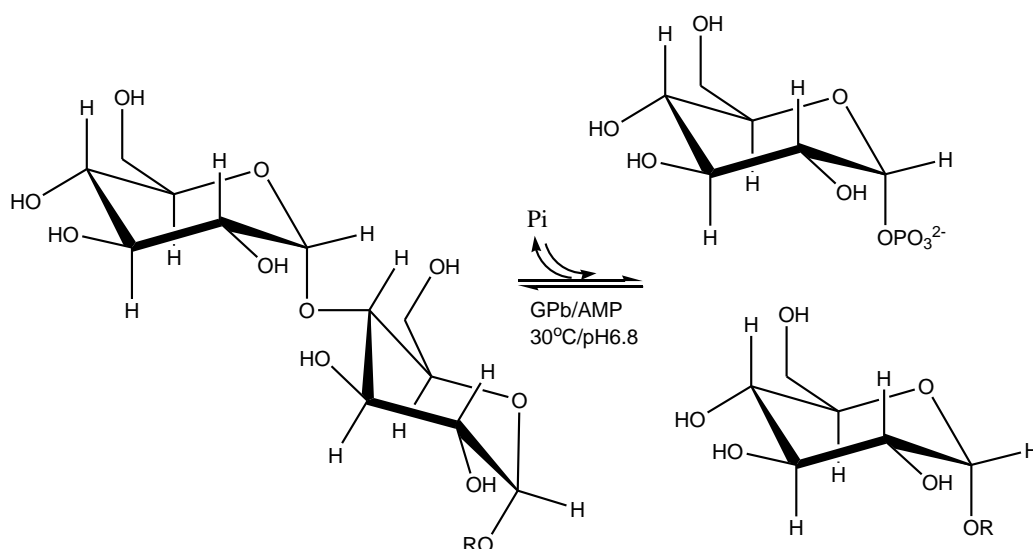
Το ένζυμο φυλάσσεται σε εναιώρημα γλυκερόλης. Από το εναιώρημα αυτό παίρνουμε 10 μL και το αραιώνουμε με 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Στη συνέχεια το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ο προσδιορισμός γίνεται με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1cm.

Στη συνέχεια παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιέχει 25 μg ενζύμου /mL, γλυκογόνο 1%(w/v), νερό καθώς και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου 5% (v/v), έτσι ώστε με την προσθήκη του διαλύματος με το υπόστρωμα, η αντίδραση να λαμβάνει χώρα σε καθορισμένες συνθήκες όπως 5.0 mg ενζύμου ανά mL, 1.0 mM AMP, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υπόστρωμα $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ σταθερής συγκέντρωσης και επίσης μεταβαλλόμενη συγκέντρωση αναστολέα. Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση με θερμοκρασία 30° C για 15 λεπτά.

4.2.3. Προσδιορισμός 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:



Σχηματική παρουσίαση της αντίδρασης στην οποία βασίζεται η κινητική μελέτη της GPb.

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

4.2.4. Υπολογισμός των αρχικών ταχυτήτων (v) και των τυπικών αποκλίσεων (σ^2)

Οι απορροφήσεις των δειγμάτων διορθώνονται με την αφαίρεση της τιμής απορρόφησης των τυφλών της Glc-1-P (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.

Οι τιμές των αρχικών ταχυτήτων (v) και το τυπικό τους σφάλμα (σ^2) υπολογίζονται εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή. 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 v της αντίδρασης

t: ο χρόνος της αντίδρασης

όριο: προκύπτει από το γινόμενο της συγκέντρωσης της Glc-1-P που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος επί τον όγκο του

δείγματος επί την μέγιστη υδρόλυση της Glc-1-P (78%) στην ισορροπία της αντίδρασης.

4.2.5. Υπολογισμός των κινητικών παραμέτρων V_{max} και K_m και των τυπικών αποκλίσεων (σ_2)

Οι αρχικές ταχύτητες που προκύπτουν από την παραπάνω εξίσωση επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων ('explicit weighting'). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους V_{max} και K_m , και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό αυτό χρησιμοποιείται η γνωστή εξίσωση Michaelis-Menten:

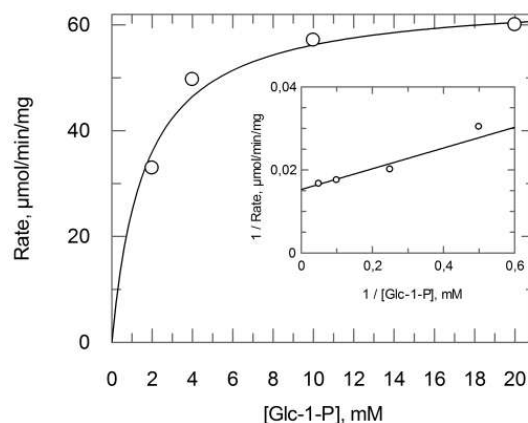
$$\text{Όπου: } \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{S}$$

v : Η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης.

V_{max} : Η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

[S] : Η συγκέντρωση του υποστρώματος.

S : Το υπόστρωμα



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.

4.2.6. Προσδιορισμός της σταθεράς IC_{50} (ανασταλτική συγκέντρωση)

Ο προσδιορισμός των τιμών IC_{50} της αναστολής πραγματοποιήθηκε για μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις του ασσύρρικού. Η τιμή IC_{50} είναι η τιμή της συγκέντρωσης του αναστολέα που προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50%. Ο προσδιορισμός προϋποθέτει την κινητική μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση α -D-Glc-1-P.

4.2.7. Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της K_m του ενζύμου βασίζεται στο προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb, γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να αφαιρεθεί τυχόν απορρόφηση φωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου.

Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά:

- Τυφλό νερού για τη ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με τη μέγιστη συγκέντρωση Glc-1-P που χρησιμοποιείται και αναγωγή της τιμής της απορρόφησης που προκύπτει λόγω της φυσικής υδρόλυσης της Glc-1-P στις άλλες συγκεντρώσεις τοπου διαλύματος φωσφορικών από όπου προσδιορίζεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε $\mu\text{mol Pi}$
- Τυφλό γλυκογόνου λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών ιόντων

Παρασκευάζονται από δύο τυφλά για κάθε περίπτωση εκτός του νερού και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους, ενώ αν η χρονική διάρκεια ενός πειράματος (όπως σε περιπτώσεις που εξετάζεται κάποιος αναστολέας) κρίνεται μεγάλη, τότε φτιάχνονται δύο σειρές τυφλών από τουλάχιστο δύο δείγματα η κάθε μία, οι οποίες μετριοούνται η μία στην αρχή του πειράματος και η άλλη στο τέλος από όπου λαμβάνεται και πάλι ο μέσος όρος των τιμών.

4.2.8. Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος

4.2.8.1. Παρασκευή διαλυμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις Glc-1-P

Από το πυκνό διάλυμα της Glc-1-P (400mM) και το ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (200 mM), KCl (400 mM), EDTA (4 mM), DTT (4 mM) αναμιγνύονται κατάλληλοι όγκοι ώστε να προκύψει διάλυμα Glc-1-P (90mM), ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) και με pH 6.8.

Εν συνεχεία, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM) και pH 6.8 με αραιώση του ρυθμιστικού διαλύματος ιμιδαζολίου (200 mM), KCl (400 mM), EDTA (4 mM), DTT (4 mM).

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της Glc-1-P προκύπτουν με αραιώσεις του διαλύματος Glc-1-P 90mM με το ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου (135 mM), KCl (270 mM), EDTA (2,7 mM), DTT (2,7 mM). Έτσι προκύπτουν συνολικά τα παρακάτω διαλύματα:

- Glc-1-P 90mM, **Ιμιδαζόλιο (135mM)**, KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8
- Glc-1-P 67.5mM, **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 40.5mM, **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.

Πορεία:

Για να προσδιοριστεί η σταθερά της αναστολής, πραγματοποιούνται 5 πειράματα το καθένα με διαφορετική συγκέντρωση α-D-Glc-1-P, έχοντας όμως σταθερή την συγκέντρωση του αναστολέα και του AMP. Αρχικά παρασκευάζουμε το ενζυμικό διάλυμα όπως έχει περιγράψει πιο πάνω και τοποθετείται στο υδατόλουτρο. Στη συνέχεια παρασκευάζουμε τα διαλύματα των υποστρώματων. Κάθε διάλυμα υποστρώματος θα πρέπει να έχει τελικό όγκο 720 μL . Να σημειωθεί ότι σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζουμε και ένα δείγμα ελέγχου χωρίς αναστολέα. Τα διαλύματα υποστρώματος, τοποθετούνται επίσης στο υδατόλουτρο, ώστε να αποκτήσουν την ίδια θερμοκρασία με τον ενζυμικό διάλυμα, πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει αναλυτικά την παρασκευή των διαλυμάτων του υποστρώματος για μία συγκεκριμένη συγκέντρωση αναστολέα.

	1	2	3	4	5
α-D-Glc-1-P	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
AMP 50mM	2 μM 18 μL	4 μM 18 μL	6 μM 18 μL	10 μM 18 μL	20 μM 18 μL
Αναστολέας	X μL	X μL	X μL	X μL	X μL
Νερό	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL	720- (218+x) μL
Όγκος Τελικός	720 μL	720 μL	720 μL	720 μL	720 μL

Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος και των διαλυμάτων του υποστρώματος, μεταφέρονται 180 μL από το ενζυμικό διάλυμα στο πρώτο διάλυμα υποστρώματος(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 200 μL από το διάλυμα της αντίδρασης σε δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιέχουν από 50 μL SDS 1% και η αντίδραση σταματά, λόγω της αδρανοποιητικής δράσης του SDS. Στη

συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις α-D-Glc-1-P.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί, προστίθενται από 2.5 mL διάλυμα ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά στους 30° C και μετά ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των φωσφορικών ιόντων (Pi), που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλες τις συγκεντρώσεις του αναστολέα, από τις οποίες θα προκύψουν και αλλά πειραματικά δεδομένα για την δημιουργία της καμπύλης για τον υπολογισμό της Ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC50). Στη συνέχεια ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit, προκειμένου να προσδιοριστεί η IC50.

4.2.9. 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.

4.2.10. Μέθοδος ασκορβικού οξέος

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

Υλικά:

- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου, με ρύθμιση pH 5.0 (Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γυάλινο δοχείο και μακριά από το φως). Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με HCl 1N.

- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), με ρύθμιση pH 5.0 (Το διάλυμα παρασκευάζεται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα). Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N.

Στη συνέχεια αναμιγνύουμε τα διαλύματα με αναλογία όγκων 4:1, δηλ 4 όγκους αντιδραστηρίου μολυβδαινικού και έναν όγκο ασκορβικού.

Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από 15 min από την παρασκευή του και όχι για μεγάλο χρονικό διάστημα (>3hrs).

Πορεία:

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

Ακολουθεί η περιγραφή των συνθηκών των κινητικών πειραμάτων που έγιναν για τον αναστολέα που περιλαμβάνεται στην παρούσα εργασία:

- G1P: 2, 4, 6, 10 20 mM
- AMP: 1 mM
- Γλυκογόνο: 0.2% w/v

Οι συγκεντρώσεις του αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν: 0,004μM, 0,006μM, 0,008μM, 0,015μM, 0,030μM, και 0,060μM.

4.3. Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων – πρόγραμμα Grafit

Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μετά από τον προσδιορισμό φωσφόρου στα δείγματα του κινητικού πειράματος, επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Grafit .

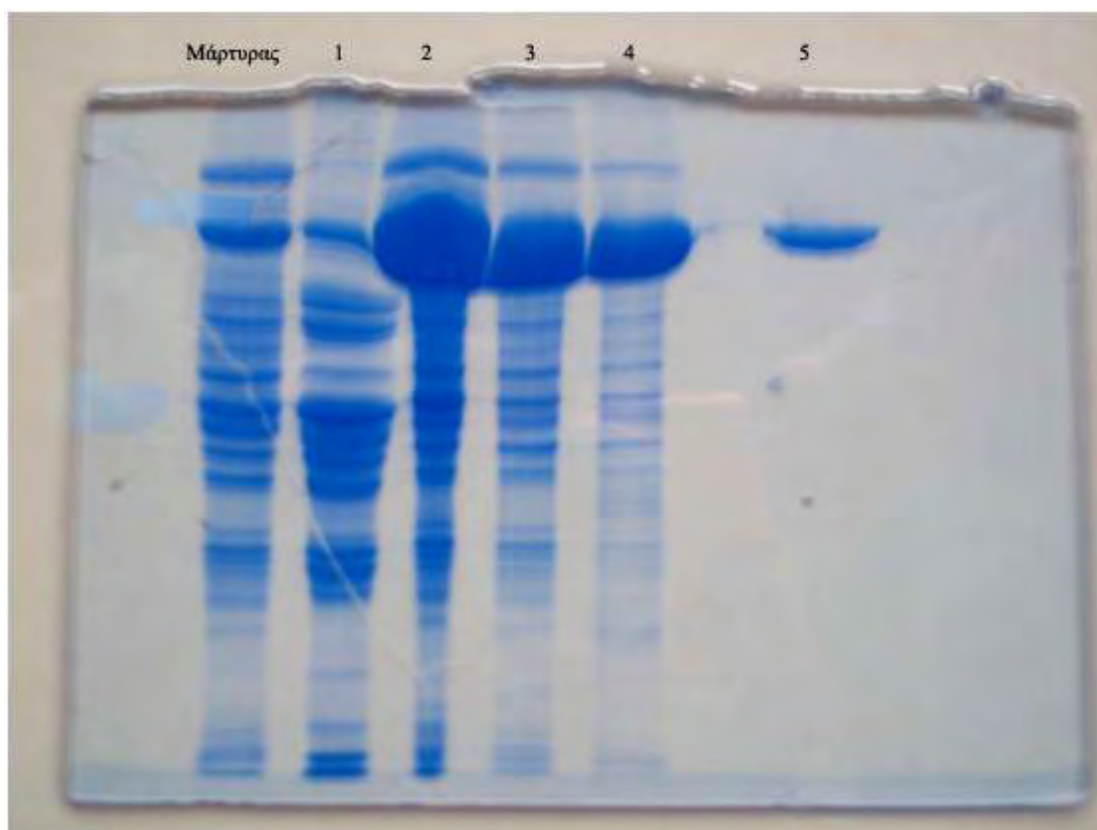
Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων υφίστανται διορθώσεις με βάση τα δείγματα αναφοράς για τα G-1-P και το γλυκογόνο. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

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

4.4. Αποτελέσματα

4.4.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

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



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

4.4.2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

4.4.2.1. Προσδιορισμός K_m και V_{max}

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

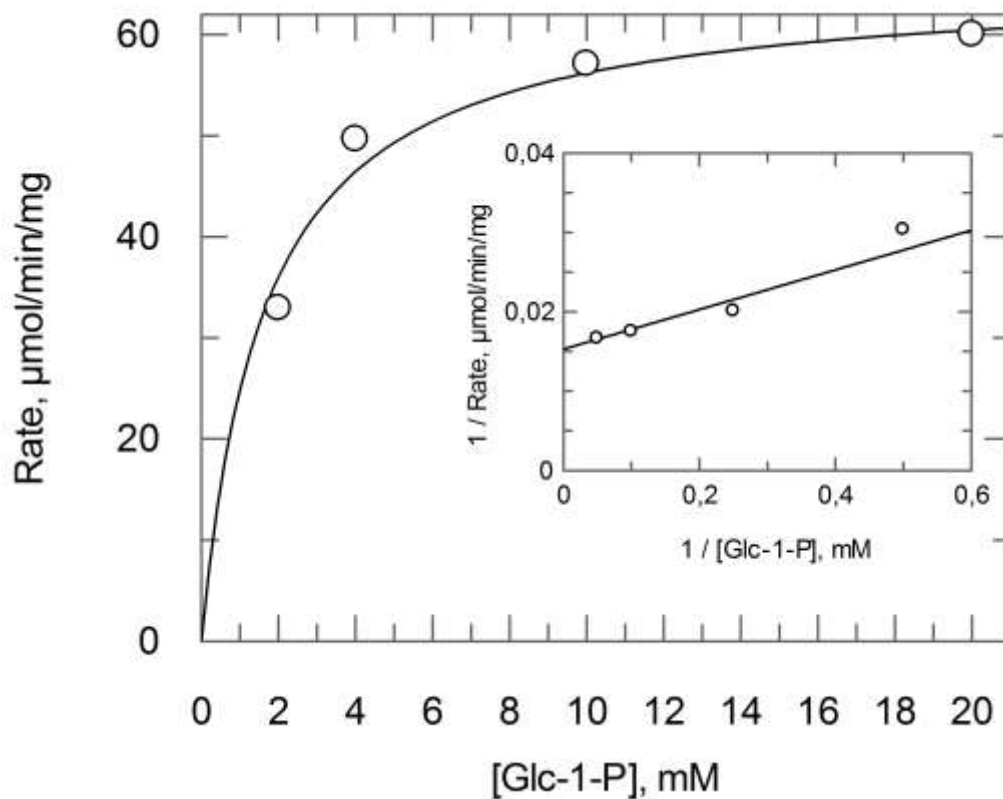
Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι:

$K_m=1.6305 \pm 0.3549$ mM, και

$V_{max}=65.3677 \pm 2.3189$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

Η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, sp. activity, μmol φωσφορικών / $\text{min}\cdot\text{mg}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (Glc-1-P) παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης (2.0, 4.0, 10.0, 20.0 mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση AMP (1.0mM) και γλυκογόνου (0.2%w/v).

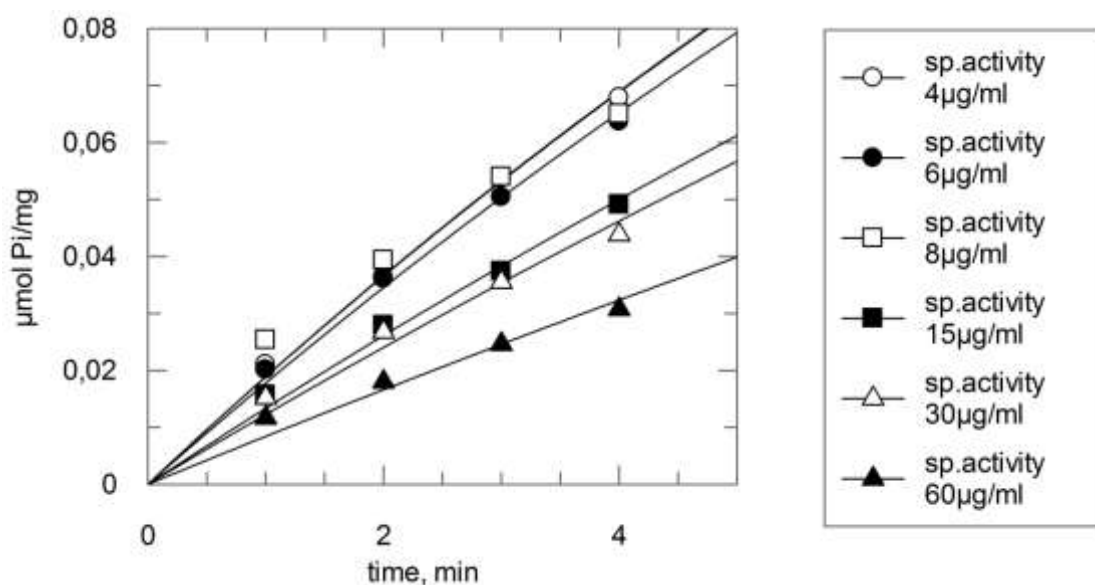
Στο εσωτερικό του διαγράμματος εμφανίζεται το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk της σχέσης του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης.



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

4.4.3. Κινητική μελέτη αναστολέων

Στο διάγραμμα που ακολουθεί απεικονίζεται η παραγωγή προϊόντος της αντίδρασης ($\mu\text{mol Pi/mg}$ ενζύμου) σε συνάρτηση με το χρόνο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος ασσύρτικου (mg/mL) και σε συγκέντρωση υποστρώματος, Glc-1-P , 2 mM , για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας (sp. act.) του ενζύμου.

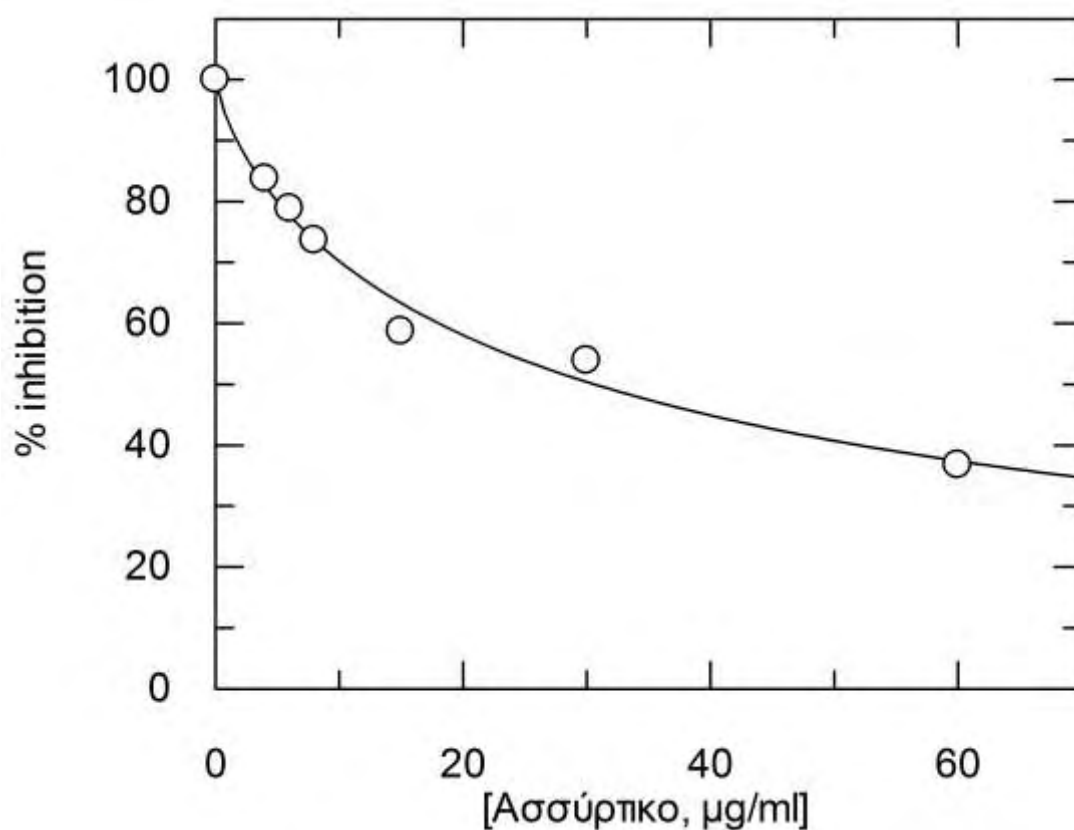


Διάγραμμα Ειδικής Δραστηριότητας

4.4.4. Προσδιορισμός του IC₅₀ της αναστολής του ενζύμου

Στο παρακάτω διάγραμμα προσδιορίζεται η τιμή IC₅₀ της αναστολής που πραγματοποιήθηκε για μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις του ασσύρπικου. Όπως έχει προαναφερθεί, η IC₅₀ είναι η συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% και για το Ασσύρπικο η τιμή ισούται με:

$$IC_{50} = 30,63 \pm 2,51 \mu\text{g/ml}$$



IC₅₀. Συγκέντρωση αναστολέα που προκαλεί 50% αναστολή.

5. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Για την παρούσα εργασία μελετήθηκε, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, η αναστολή που μπορεί να προκαλέσει πολυφαινολικό εκχύλισμα της ποικιλίας αμπέλου Ασύρτικο στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου που απομονώθηκε βρέθηκαν να είναι $K_m = 1.63 \pm 0.35$ mM, και $V_{max} = 65.37 \pm 2.32$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ενώ η συγκέντρωση του εκχυλίσματος που προκάλεσε 50% αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας (IC_{50}) βρέθηκε $30,63 \pm 2,51$ $\mu\text{g}/\text{ml}$. Η σταθερά αυτή υποδηλώνει πως η αναστολή από το συγκεκριμένο εκχύλισμα είναι αρκετά σημαντική. Εν τούτοις για την ταυτοποίηση του δραστικού συστατικού του εκχυλίσματος απαιτούνται πειράματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ ενώ θα πρέπει να διερευνηθεί και η κυταροτοξικότητα του σε πειράματα *ex vivo*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lernmark, Ake, "Type 1 Diabetes", 1999
2. WHO Media centre, "Diabetes", 2011,
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>. Web.
3. 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
4. Healthwise Inc. authors, "Type 1 Diabetes - Topic Overview", 2008,
<http://diabetes.webmd.com>. Web.
5. (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 Bull16:183-188, 1960.
6. (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".
7. (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".
8. Medicalook authors, "Diabetes", <http://www.medicalook.com/Diabetes/>
9. Ophard CE: "Starch", "Glycogen", "Cellulose" in Virtual Chembook, 2003.
Γενικές γνώσεις: Stryer L., 1997, **Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 2^η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.**