

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας: «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΗΣ ΠΑΡΝΑΣΣΟΣ

“ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΓΛΥΚΑΙΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ PRUNUS WEBBII ΚΑΙ POTENTILLA RECTA ΜΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ”

“ASSESSMENT OF PLANT EXTRACTS FROM PRUNUS WEBBII AND POTENTILLA RECTA BY BIOCHEMICAL METHODS AS POTENTIAL INHIBITORS OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE”



ΛΑΡΙΣΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2018

“Αξιολόγηση της υπογλυκαιμικής δράσης εκχυλισμάτων των φυτών Prunus Webbii και Potentilla Recta με βιοχημικές διαδικασίες ως εν δυνάμει αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου”

“Assessment of plant extracts from Prunus Webbii and Potentilla Recta by biochemical methods as potential inhibitors of glycogen phosphorylase”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1) Δρ. Δημήτριος Δ. Λεωνίδας

Καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2) Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3) Δρ. Νικόλαος Μπαλατσός

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Λεωνίδα Δημήτρη υπό την επίβλεψη του οποίου εκπονήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία. Μου παρείχε ενθάρρυνση και καθοδήγηση για την εκπόνηση της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Στραβοδήμο Γεώργιο για την βοήθεια, την καθοδήγηση, τις συμβουλές του και την υπομονή που επέδειξε όλο αυτό το διάστημα. Χωρίς την πολύτιμη βοήθειά του, η εκπόνηση της εργασίας θα ήταν πολύ δυσκολότερη. Τέλος, ευχαριστώ τον αδερφό μου Δημήτρη που στήριζε με κάθε τρόπο τις μέχρι τώρα επιλογές μου, σε ακαδημαϊκό και επαγγελματικό επίπεδο.

*Στη μνήμη των γονιών μου Σεραφείμ και Ελένης, στους οποίους
οφείλω το ζην, αλλά και το εν ζην.*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	10

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	11
1.1. Τύποι σακχαρώδη διαβήτη	12
1.1.1. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1.....	12
1.1.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2	14
1.2. Γλυκόζη	15
1.3. Γλυκογόνο	18
1.3.1. Αποικοδόμηση και σύνθεση του γλυκογόνου	19
1.3.2. Ρύθμιση μεταβολισμού του γλυκογόνου	23
1.3.3. Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης στη φωσφο- λυτική διάσπαση του γλυκογόνου	24
2. ΦΩΣΦΟΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ	26
2.1. Γενικά	26
2.2. Κρυσταλλική δομή φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	28
2.2.1. Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14	31
2.2.2. Το καταλυτικό κέντρο	31
2.2.3. Το αλλοστερικό κέντρο	31
2.2.4. Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών	32
2.2.5. Το κέντρο αναστολής	32
2.2.6. Το νέο αλλοστερικό κέντρο	32

2.2.7. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσεΐνης	33
2.3. Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις - Κινάση της φωσφορυλάσης	33
2.4. Αναστολή δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από υπογλυκαιμικά φάρμακα	38
2.5. Φυτικά εκχυλίσματα ως αναστολείς της δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	40
2.6. Φυτικά εκχυλίσματα Rosaceae	42
2.6.1. Prunus Webbii	42
2.6.2. Potentilla Recta	42
3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ	43
3.1. Αρχές ενζυμικής κινητικής	43
3.2. Ενζυμική αναστολή	47

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΣ ΑΥΤΗΣ	51
4.1. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	51
4.1.1. Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας	51
4.1.2. Προσδιορισμός σταθεράς Km	53
4.1.3. Προσδιορισμός σταθεράς IC50 αναστολέα	54
4.1.3.1. Παρασκευή διαλύματος φωσφορυλάσης b	55
4.1.3.2. Παρασκευή δ/των υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης	55
4.1.3.3. Προσδιορισμός Φωσφορικών Pi – Φωτομέτρηση	57

4.2. Μέθοδος ασκορβικού οξέος	57
4.3. Παρασκευή τυφλών	58
4.4. Επεξεργασία δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit	58
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
5.1. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων	61
5.1.1. Αποτελέσματα κινητικής μελέτης φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου	61
5.1.2. Αποτελέσματα κινητικής μελέτης των εκχυλισμάτων Prunus Webbii & Potentilla Recta	62
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία είχε ως αντικείμενο την έρευνα γύρω από την δράση κατά του Σακχαρώδη Διαβήτη που ενδεχομένως παρουσιάζουν πολυφαινολικά εκχυλίσματα των φυτών *Prunus Webbii* και *Potentilla Recta* της οικογένειας Rosaceae.

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης είναι μια νόσος που προκαλείται από ορμονική διαταραχή του μεταβολισμού η οποία οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα και διαταραχή του σωστού μεταβολισμού της γλυκόζης. Τα αίτια είναι είτε η μειωμένη έκκριση ινσουλίνης από το πάγκρεας, είτε η μειωμένη ευαισθησία των κυττάρων του σώματος στην ινσουλίνη. Υπάρχουν διάφορα ένζυμα και υποδοχείς που σχετίζονται με τη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και αυτά αποτελούν βασικό στόχο των ερευνών για τη θεραπεία του Σακχαρώδους Διαβήτη. Ένα ένζυμο με ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα, είναι η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Αποτελεί κύριο στόχο των αντιδιαβητικών σκευασμάτων μιας και είναι το κύριο ένζυμο που συμμετέχει στον μεταβολισμό του γλυκογόνου και κατ' επέκταση στη ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα.

Στην παρούσα εργασία, απομονώθηκε το ένζυμο μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κουνελιού και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της επίδρασης των εκχυλισμάτων των ειδών *Prunus Webbii* και *Potentilla Recta* στην δραστηριότητα του ενζύμου. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχει 80% ομολογία στην αμινοξική ακολουθία με την μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου, αλλά υπάρχει 100% ομολογία μεταξύ των περιοχών του ενεργού κέντρου των δύο ενζύμων, επομένως τα αποτελέσματα της μελέτης είναι αντιπροσωπευτικά της δράσης των εκχυλισμάτων και έναντι της ηπατικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα συντελούν σε μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% (IC_{50}) με μέτριες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα *Prunus Webbii* βρέθηκε να εμφανίζει IC_{50} : $86,5 \pm 7,8$ $\mu\text{g/mL}$, ενώ το εκχύλισμα *Potentilla Recta* βρέθηκε να εμφανίζει IC_{50} : $48,6 \pm 2,3$ $\mu\text{g/mL}$. Η εργασία συνεισφέρει στην αναζήτηση νέων αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που θα

μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων και βιολειτουργικών τροφίμων.

ABSTRACT

In the present study, polyphenolic plant extracts from *Prunus Webbii* and *Potentilla Recta* of the *Rosaceae* Family were assessed for anti-hyperglycemic action.

Diabetes mellitus is hormonal metabolic disorder that causes an increase in blood glucose levels and impaired glucose metabolism. The causes are either reduced pancreas insulin secretion or decreased insulin sensitivity of body cells. There are various enzymes and receptors related to the regulation of blood glucose levels and these are research targets for diabetes mellitus treatment. An enzyme with a particularly important role in regulating blood glucose is hepatic glycogen phosphorylase. It is the primary target of anti-diabetic agents since it is the key enzyme involved in the metabolism of glycogen.

In this study, glycogen phosphorylase was isolated from rabbit skeletal muscles and then used in kinetic experiments to assess the effect of polyphenolic extracts of *Prunus Webbii* and *Potentilla Recta* species on the activity of the enzyme. Although liver glycogen phosphorylase is 80% homologous with the muscle glycogen phosphorylase, there is 100% homology between the two enzymes at the active site, so the results of this study are representative of the effect of the extracts on the activity of liver glycogen phosphorylase as well.

The results showed that the extracts displayed moderate IC₅₀ values. *Prunus Webbii* extract displayed IC₅₀: 86.5 ± 7.8 µg/mL, whereas *Potentilla Recta* extract displayed IC₅₀: 48.6 ± 2.3 µg/mL. This study contributes to further research on glycogen phosphorylase inhibitors that could be used to produce new antihyperglycemic drugs and biofunctional foods.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα υγείας και είναι μία από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας ανά την υφήλιο, μετά τις καρδιαγγειακές νόσους και τον καρκίνο. Περιλαμβάνει μία ομάδα μεταβολικών διαταραχών κατά τις οποίες υπάρχουν αυξημένα επίπεδα σακχάρου στο αίμα, για μακρά περίοδο. Πρόκειται για μεταβολική πάθηση πολύπλοκης αιτιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από διαταραχή στο μεταβολισμό της γλυκόζης, των λιπών, των πρωτεϊνών, καθώς και άλλων υδατανθράκων στον οργανισμό, με συνέπεια τη χρόνια αυξημένη τιμή γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία). Η ομοιοστάση της γλυκόζης μέσω της ινσουλίνης ρυθμίζει τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα. Όταν υπάρχει διαταραχή της ομαλής λειτουργίας της ινσουλίνης, τότε τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα δεν είναι τα επιθυμητά. Στο σακχαρώδη διαβήτη τα επίπεδα σακχάρου είναι υψηλότερα του κανονικού, είτε λόγω ανεπάρκειας ινσουλίνης είτε λόγω αδυναμίας των κυττάρων να ανταποκριθούν στην ινσουλίνη. [3, 17]

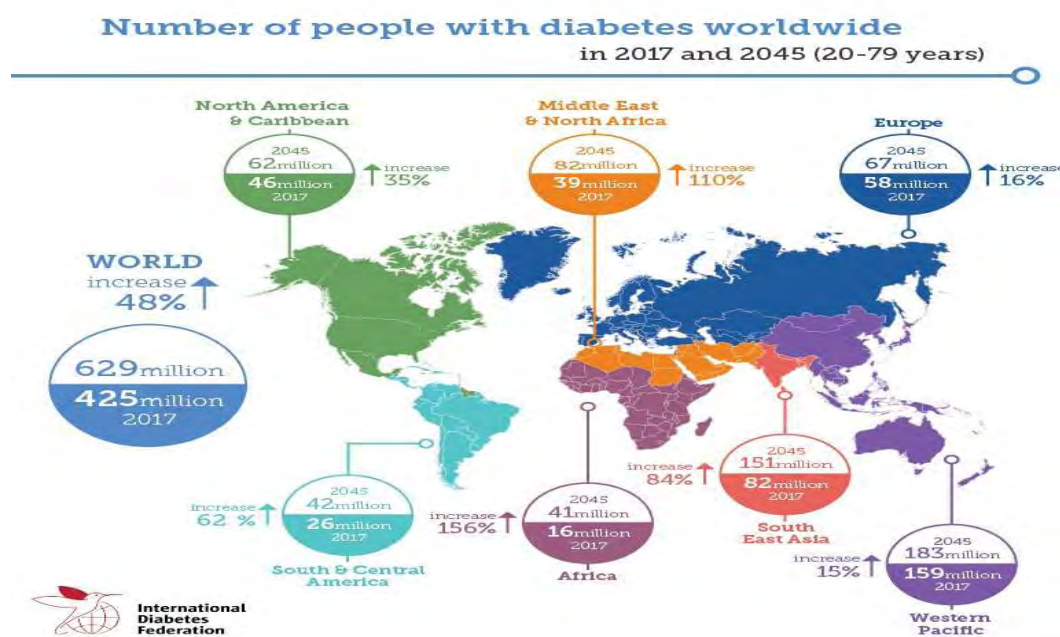
Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν συχνή διούρηση, δίψα, πείνα, απώλεια βάρους, κόπωση και θαμπή όραση. Αν παραμείνει αθεράπευτος ο διαβήτης μπορεί να προκαλέσει πολλές επιπλοκές όπως καρδιοπάθειες, εγκεφαλικά, οφθαλμικές βλάβες και έλκη ποδιών. Σε ακραίες περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί και θάνατος [17].

Η διάγνωση του διαβήτη γίνεται με μέτρηση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα. Η τιμή της γλυκόζης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 200 mg/dL οποιαδήποτε στιγμή, ή τα 130 mg/dL μετά από οκτάωρη νηστεία. Επίσης διάγνωση γίνεται και όταν υπάρχει συνύπαρξη γλυκοζουρίας και άλλων συμπτωμάτων του διαβήτη. [3, 17]

Ο επιπολασμός της νόσου αυξάνεται συνεχώς και σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Διαβήτη (IDF), μέχρι το 2045 περισσότεροι από 600 εκατομμύρια άνθρωποι θα πάσχουν από αυτή. Η νόσος έχει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στο Δυτικό Κόσμο και αυτό αποτελεί μια ένδειξη για τη συσχέτιση της νόσου με το σύγχρονο τρόπο ζωής, τις διατροφικές συνήθειες και την έλλειψη σωματικής άσκησης. Στην Ελλάδα, τα

ενήλικα άτομα που έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη το 2017 ήταν σύμφωνα με τον IDF 578.300, δηλαδή το 7,2% του ενήλικου πληθυσμού. [65]

Εικόνα 1: Ο επιπολασμός του Σακχαρώδους Διαβήτη σε παγκόσμιο επίπεδο. [65]



1.1. Τύποι σακχαρώδη διαβήτη

Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι διαβήτη: ο διαβήτης τύπου 1 (ή ινσουλινοεξαρτώμενος ή νεανικός διαβήτης), ο διαβήτης τύπου 2 (ή μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης ή διαβήτης των ενηλίκων) και ο διαβήτης κύησης. [3]

1.1.1. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1

Ο διαβήτης τύπου 1 παρουσιάζεται όταν το πάγκρεας δεν παράγει καθόλου ινσουλίνη λόγω καταστροφής των β-κυττάρων του παγκρέατος, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της. Είναι ο δεύτερος

συχνότερος τύπος διαβήτη και αφορά περίπου το 10% των διαβητικών. Συνήθως εμφανίζεται σε νεαρές ηλικίες (<20 ετών) και η εκδήλωσή του είναι απότομη και γρήγορη και εκδηλώνεται απότομα με έντονα κλινικά συμπτώματα, όπως πολυουρία, πολυδιψία, πολυφαγία και μεγάλη απώλεια βάρους σε σύντομο χρονικό διάστημα, που μπορούν να οδηγήσουν, τα νεαρά κυρίως άτομα, σε διαβητικό κώμα. Συχνά δεν εμφανίζονται συμπτώματα. [1, 3, 17]

Ο διαβήτης τύπου 1 είναι αυτοάνοση νόσος και οφείλεται στην καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν την ινσουλίνη από το ανοσοποιητικό σύστημα του ίδιου του ασθενούς. Έχει βρεθεί ότι σε ποσοστό 95% ευθύνεται το ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο, από γενετικό λάθος, στρέφεται εναντίων των β-κυττάρων και τα καταστρέφει. Στο υπόλοιπο 5% τα αίτια δεν είναι γνωστά και χαρακτηρίζεται ως ιδιοπαθής. Πιθανοί παράγοντες ενεργοποίησης της αυτοάνοσης διαδικασίας θεωρούνται η κληρονομικότητα, διάφοροι ιοί, το στρες. Ωστόσο, πολλοί διαβητικοί τύπου 1 δεν είχαν ποτέ κανέναν συγγενή με διαβήτη. Συνήθως υπάρχει αιφνίδια εισβολή της νόσου, με την αυτοάνοση διαδικασία να προϋπάρχει για πολύ περισσότερο χρόνο. Η επίθεση που δέχονται τα β-κύτταρα του παγκρέατος έγκειται συνήθως στην ύπαρξη κάποιων αυτο-αντισωμάτων. Συνήθως ανιχνεύονται αντισώματα έναντι της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος (GAD), αντισώματα έναντι των κυττάρων των νησιδίων του Langerhans του παγκρέατος (ICA), και αντισώματα κατά της ενδογενούς ινσουλίνης (IAA). Συχνά ο διαβήτης τύπου 1 συνδέεται με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα όπως ανεπάρκεια επινεφριδίων, λεύκη, κακή λειτουργία θυρεοειδούς κ.α. [25]

Οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 1 χρήζουν εξωγενούς χορήγησης ινσουλίνης έτσι ώστε τα επίπεδα γλυκόζης και γλυκαγόνης να είναι σε φυσιολογικά επίπεδα. Διαφορετικά αναστέλλεται η γλυκόλυση και λόγω υπερβολικής γλυκονεογένεσης και κετογένεσης, υπάρχει συσσώρευση κετονών στον οργανισμό με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση κετο-οξωτικού κώματος. Παράλληλα με τη χορήγηση ινσουλίνης ο ασθενής πρέπει να ακολουθεί κατάλληλο πρόγραμμα διατροφής ώστε αυτό να συμβαδίζει με την ποσότητα χορηγούμενης ινσουλίνης, καθώς κάποιες φορές μπορεί να χορηγηθεί ακατάλληλη δόση που δε συμβαδίζει απόλυτα με τις ανάγκες του ασθενούς τη δεδομένη στιγμή. [1, 3, 17]

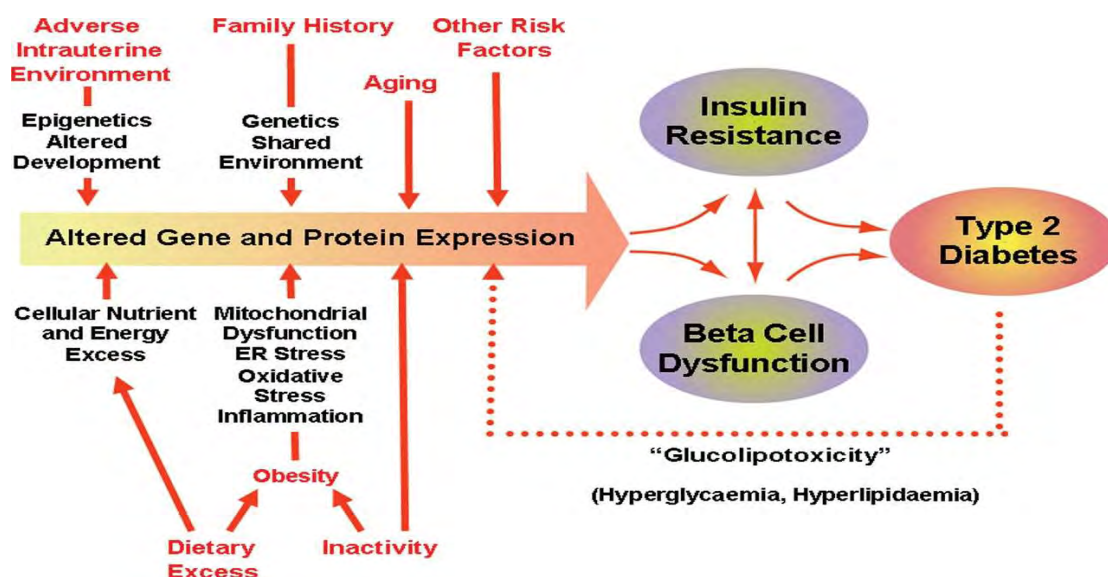
1.1.2. Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Ο διαβήτης τύπου 2 είναι η συνηθέστερη μορφή διαβήτη (περίπου 90% των περιπτώσεων) και εμφανίζεται ως αποτέλεσμα παραγωγής από το πάγκρεας λιγότερης ινσουλίνης από αυτή που χρειάζεται ο οργανισμός με αποτέλεσμα την αυξημένη τιμή του σακχάρου στο αίμα. Η αιτία παραγωγής μειωμένης ινσουλίνης είναι η έλλειψη ευαισθησίας των κυττάρων σε αυτή. Αρχικά παράγεται υπερβολική ινσουλίνη λόγω μη αποτελεσματικής αξιοποίησής της από τα κύτταρα και μακροπρόθεσμα η παραγωγή ινσουλίνης μειώνεται με αποτέλεσμα την εκδήλωση της νόσου. Στην αρχή της νόσου συνήθως δεν υπάρχουν συμπτώματα. Τα συμπτώματα που εκδηλώνονται αργότερα περιλαμβάνουν έντονη δίψα, πολυουρία, πολυφαγία, αίσθημα κόπωσης, κνησμό, δυσκολία επούλωσης πληγών, φλεγμονές και λοιμώξεις. Σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου 1, τα συμπτώματα εμφανίζονται σταδιακά. Λόγω της καθυστερημένης εμφάνισης συμπτωμάτων στα αρχικά στάδια της νόσου, συχνά έχουν εμφανιστεί ήδη επιπλοκές τη στιγμή της διάγνωσης. [1, 3, 17]

Για την αποφυγή ανάπτυξης μακροπρόθεσμων χρόνιων ή οξέων επιπλοκών λόγω του διαβήτη πρέπει να ρυθμιστούν έγκαιρα οι τιμές του σακχάρου στο αίμα. Επίσης, λόγω του ότι ορισμένοι παράγοντες όπως η υπέρταση, το κάπνισμα, η καθιστική ζωή κ.α. αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισης επιπλοκών και τη βαρύτητά τους, είναι σημαντικό να περιοριστούν. Οι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις περιλαμβάνουν νευροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια, νεφροπάθεια, στεφανιαία νόσο, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια και περιφερική αγγειοπάθεια. [16]

Πέρα των γενετικών παραγόντων, σε μεγάλο βαθμό η εμφάνιση του διαβήτη τύπου 2 οφείλεται στον τρόπο ζωής και τη διατροφή. Η παχυσαρκία συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με τη νόσο. Η έλλειψη άσκησης επίσης φαίνεται ότι συντελεί αρνητικά στην ευαισθησία των κυττάρων στην παρουσία ινσουλίνης. [1, 3, 17]

Εικόνα 2: Σχηματική παράσταση παθογένεσης διαβήτη τύπου II. [26]



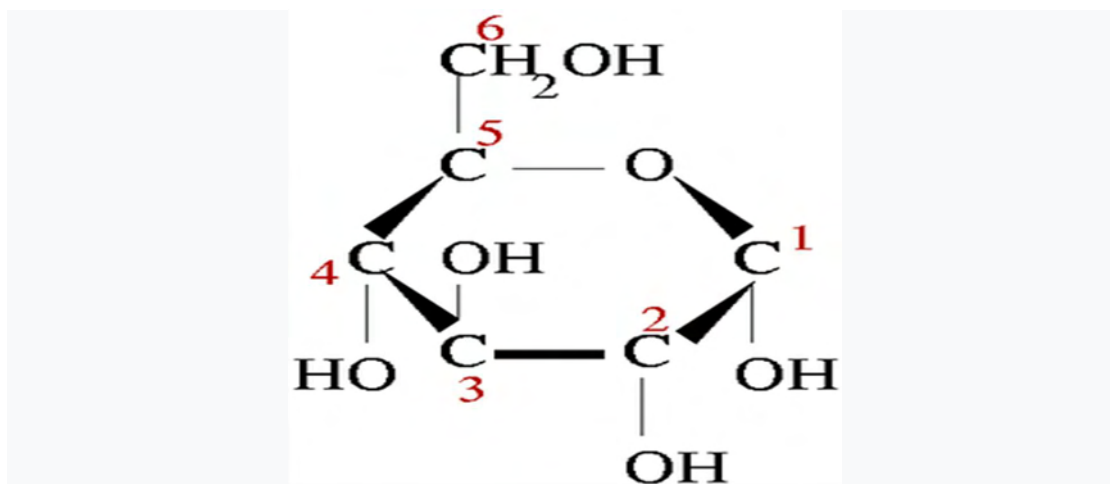
1.2. Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης με μοριακό τύπο $C_6H_{12}O_6$. Είναι το σπουδαιότερο σάκχαρο του μεταβολισμού καθώς τα κύτταρα την χρησιμοποιούν ως πρωταρχική πηγή ενέργειας και ως μέσο μεταβολισμού. Η γλυκόζη απαντάται στη φύση συνήθως στη δεξιόμορφη μορφή της και ονομάζεται D-γλυκόζη και γι' αυτό το λόγο πολλές φορές ονομάζεται δεξτρόζη. Η δομή της κυκλοποιείται και προκύπτει ένας εξαμελής δακτύλιος που μοιάζει με το πυράνιο και γι' αυτό ονομάζεται πυρανόζη. Η σπανιότερη αντίδραση μεταξύ του C-1 και του C-4 δημιουργεί ένα μόριο με πενταμελή δακτύλιο τη φουρανόζη. Συνεπώς το ανοιχτό ισομερές D-γλυκόζης οδηγεί σε 4 διακριτά ισομερή: α-D-γλυκοπυρανόζη, β-D-γλυκοπυρανόζη, α-D-γλυκοφουρανόζης, και β-D-γλυκοφουρανόζη. [4]

Αν και η γλυκόζη υπάρχει σε πολλές διαφορετικές μοριακές δομές, αυτές μπορούν να χωριστούν σε δύο οικογένειες στερεοϊσομερών: 1) D-γλυκόζη (ή δεξτρόζη, δηλαδή δεξιόστροφη γλυκόζη) και 2) L-γλυκόζη. Η

D-γλυκόζη έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα στη φύση, ενώ η L-γλυκόζη συναντάται σπανιότατα. [7, 17]

Εικόνα 3: Η δομή του μορίου της γλυκόζης. [17]



Η γλυκόζη χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας από τους περισσότερους οργανισμούς, από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο. Μπορεί να προσληφθεί είτε με αερόβια αναπνοή, αναερόβια αναπνοή ή ζύμωση. Στο ανθρώπινο σώμα, μέσω της αερόβιας αναπνοής, προσφέρει περίπου 16 θερμίδες ανά γραμμάριο. Μέσω της γλυκόλυσης και αργότερα στις αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCAC), η γλυκόζη οξειδώνεται για να σχηματίσει τελικά διοξείδιο του άνθρακα και νερό, αποδίδοντας ενέργεια, κυρίως με τη μορφή ATP (Τριφωσφορική αδενοσίνη). [18]

Η χρήση της γλυκόζης ως πηγή ενέργειας στα κύτταρα γίνεται μέσω αερόβιας ή αναερόβιας αναπνοής και ξεκινά με τα πρώτα στάδια της μεταβολικής οδού γλυκολύσεως. Αρχικά γίνεται η φωσφορυλίωση της γλυκόζης από την εξοκινάση. Κατά την φωσφορυλίωση προστίθεται μία φορτισμένη φωσφορική ομάδα με αποτέλεσμα η 6-φωσφορική γλυκόζη να μένει εντός του κυττάρου καθώς δεν μπορεί πλέον να διασχίσει την κυτταρική μεμβράνη. [19]

Κατά την αναερόβια αναπνοή, παράγονται ως καθαρό κέρδος δύο μόρια ATP από ένα μόριο γλυκόζης (παράγονται τέσσερα μόρια ATP, αλλά μόνο δύο απαιτούνται από τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται κατά

τη διάρκεια της διαδικασίας). Κατά την αερόβια αναπνοή ένα μόριο της γλυκόζης είναι πολύ πιο επικερδές επειδή το καθαρό κέρδος είναι 32 μόρια ATP που παράγονται κατά την διάρκεια της γλυκόλυσης, (34 μικτά, καθώς δύο απαιτούνται από τα ένζυμα στη διαδικασία). [7]

Πέρα από την άμεση χρήση της γλυκόζης ως πηγής ενέργειας, οι οργανισμοί την χρησιμοποιούν ως πρόδρομη ένωση για το σχηματισμό άλλων σημαντικών ενώσεων (όπως το άμυλο, την κυτταρίνη, το γλυκογόνο, τη βιταμίνη C, κ.α.), που χρησιμεύουν είτε για αποθήκευση ενέργειας είτε έχουν δομικό ρόλο. Αν και τα φυτά και ορισμένα μικρόβια μπορούν να δημιουργήσουν όλες τις ενώσεις που χρειάζονται από χορηγούμενη γλυκόζη, τα απαραίτητα ανόργανα άλατα, όλα τα ζώα και πολλά μικρόβια δεν μπορούν να συνθέσουν μερικά ή άλλα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Για παράδειγμα, οι άνθρωποι δεν μπορούν να συνθέσουν βιταμίνη C και ορισμένα απαραίτητα αμινοξέα και τα προσλαμβάνουν μέσω της διατροφής τους.

Η γλυκόζη προστίθεται επίσης σε ορισμένες πρωτεΐνες και λιπίδια σε μια διαδικασία που ονομάζεται γλυκοζυλίωση. Αυτή είναι συχνά κρίσιμη για τη λειτουργία τους. Τα ένζυμα που προσθέτουν γλυκόζη σε άλλα μόρια χρησιμοποιούν συνήθως φωσφορυλιωμένη γλυκόζη για να τροφοδοτηθεί ο σχηματισμός του νέου δεσμού με το σπάσιμο του φωσφορικού δεσμού της γλυκόζης. Η γλυκόζη μπορεί επίσης να αναλυθεί και να μετατραπεί σε λιπίδια και αμινοξέα.

Η γλυκόζη που υπάρχει στον οργανισμό έχει δημιουργηθεί από την πέψη των υδατανθράκων και άλλων ουσιών και από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Ο ρόλος της είναι πέρα από την παραγωγή ενέργειας, η μετατροπή της σε γλυκογόνο που θα χρησιμεύσει σαν αποθήκη γλυκόζης και η μετατροπή της σε άλλες ουσίες όπως το λίπος.

Η γλυκόζη πρέπει να διατηρείται σε κάποια σταθερά επίπεδα, να υπάρχει η λεγόμενη ομοιοστασία της γλυκόζης και αυτή εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ και κατανάλωσης γλυκόζης από άλλους ιστούς και όργανα όπως ο μυϊκός και ο λιπώδης ιστός, ο εγκέφαλος και τα νεφρά. Για την ομοιοστασία απαιτείται η παραγωγή ινσουλίνης από το πάγκρεας και η σωστή ανταπόκριση του οργανισμού σε αυτή. [17]

1.3. Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένας από τους πολυσακχαρίτες, αποτελούμενο από μόρια γλυκόζης που σχηματίζουν διακλαδισμένες αλυσίδες. Η κύρια αλυσίδα συνδέεται με $\alpha(1\rightarrow4)$ γλυκοζιτικούς δεσμούς και έχει πολυάριθμους $\alpha(1\rightarrow6)$ γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι συνδέουν πολλές διακλαδώσεις κατά μήκος της αλυσίδας. [4]

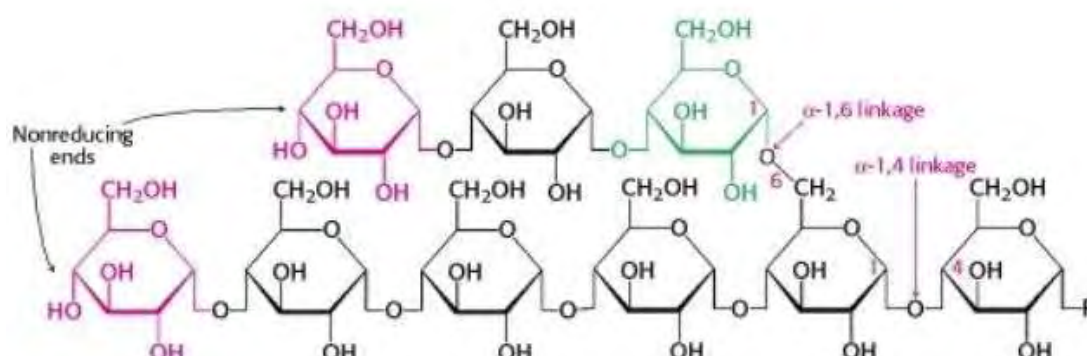
Το γλυκογόνο είναι σημαντικό απόθεμα καύσιμων μορίων των ζώων και των μυκήτων. Στα σπονδυλωτά αποθηκεύεται κυρίως στο ήπαρ και στους μύες. Διασπώμενο, αποδίδει μόρια γλυκόζης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας. Είναι μία μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης που μπορεί να ενεργοποιηθεί άμεσα αποδίδοντας ενέργεια. Συγκεκριμένα, είναι ένα μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης. [4]

Η διάσπαση του γλυκογόνου (γλυκογονόλυση) ελέγχεται από δύο ορμόνες, τη *γλυκαγόνη* και την *αδρεναλίνη*. Και οι δύο ορμόνες επηρεάζουν τη δραστηριότητα δύο ενζύμων, της *φωσφορυλάσης του γλυκογόνου*, το οποίο συμμετέχει στη αποικοδόμηση του γλυκογόνου και ενεργοποιείται, και της *συνθάσης του γλυκογόνου*, που συμμετέχει στη σύνθεση του γλυκογόνου και απενεργοποιείται. Αντίθετα, η σύνθεση του γλυκογόνου (γλυκογονογένεση) διεγείρεται από την ινσουλίνη. [4, 7]

Το γλυκογόνο ρυθμίζει στην ουσία τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, καθώς ο ελεγχόμενος καταβολισμός του αυξάνει τα επίπεδα γλυκόζης μεταξύ των γευμάτων. Αυτό είναι πολύ σημαντικό καθώς αφενός ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί σχεδόν μόνο γλυκόζη για την ενέργεια που χρειάζεται και αφετέρου η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα σε περίπτωση που χρειαστεί λόγω έντονης και απότομης δραστηριότητας. [4]

Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου στο ήπαρ ρυθμίζονται με σκοπό τη διατήρηση στο αίμα σταθερών επιπέδων γλυκόζης αναγκαίων για την κάλυψη του οργανισμού ως συνόλου, ενώ το αντίθετο ισχύει με την αποικοδόμηση και σύνθεση του γλυκογόνου στους μύες, όπου η ρύθμιση αφορά μόνο την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών. [4]

Εικόνα 4: Δομή γλυκογόνου [4]



1.3.1. Αποικοδόμηση και σύνθεση του γλυκογόνου

Αποικοδόμηση

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου αποτελείται από τρία βήματα:

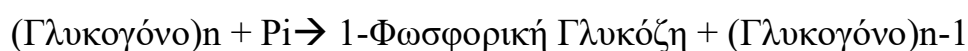
1) την απελευθέρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο παρουσία του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP). Η GP, διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση [4]

2) την αναδιαμόρφωση του υποστρώματος γλυκογόνου για την περαιτέρω αποικοδόμηση. Η GP καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ C-1 του τελικού καταλοίπου και C-4 του γειτονικού διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του ατόμου άνθρακα C-1 και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α στον C-1 διατηρείται [4]

3) τη μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης παρουσία του ενζύμου φωσφογλυκομουτάση σε 6-φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό. Η 6-φωσφορική γλυκόζη που προέρχεται από τη διάσπαση του γλυκογόνου ακολουθεί τρεις κατευθύνσεις: α) Είναι το αρχικό

υπόστρωμα για τη γλυκόλυση, β) μπορεί να υποβληθεί σε επεξεργασία με την οδό φωσφορικής πεντόζης για να δώσει παράγωγα NADPH και ριβόζης και γ) μπορεί να μετατραπεί σε ελεύθερη γλυκόζη για απελευθέρωση στην κυκλοφορία του αίματος. Η μετατροπή αυτή λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στα έντερα και τα νεφρά. Γίνεται παρουσία του ενζύμου φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. [4]

Η 6-φωσφορική γλυκόζη που προέρχεται από το γλυκογόνο μπορεί (1) να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο για αναερόβιο ή αερόβιο μεταβολισμό, όπως για παράδειγμα στο μυ και (2) να μετατραπεί σε ελεύθερη γλυκόζη στο ήπαρ και στη συνέχεια να απελευθερωθεί στο αίμα. [4]



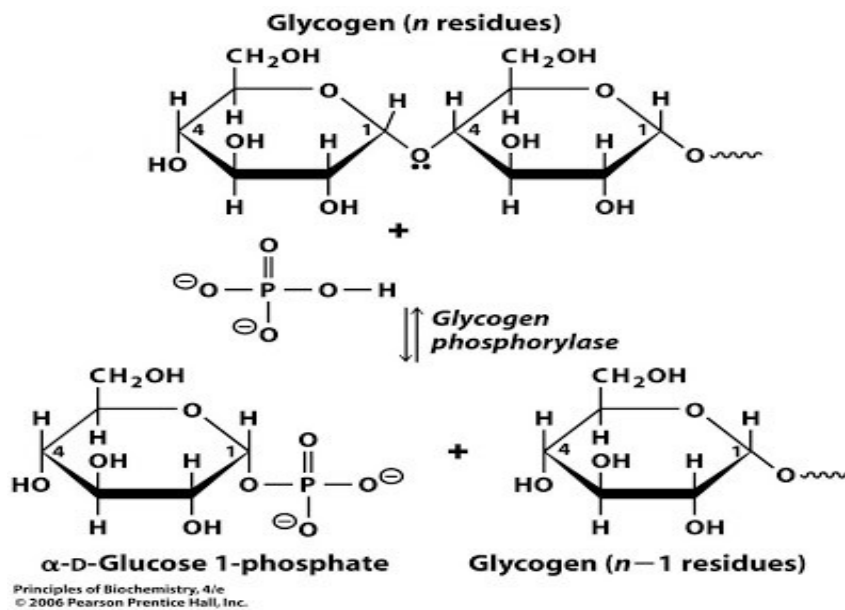
Η αντίδραση που καταλύεται από τη GP είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας των ορθοφωσφορικών ιόντων προς την Glc-1-P είναι 3.6. [4]

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο, το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου. [4]

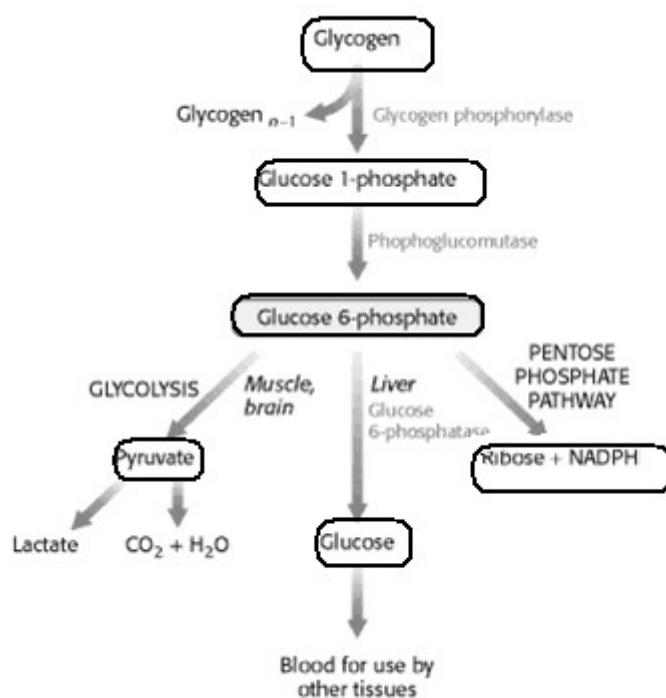
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου σταματά τη διάσπαση των δεσμών α-1,4, όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων γλυκόζης από το σημείο της διακλάδωσης, καθώς οι γλυκοζιτικοί δεσμοί α-1,6 δεν διασπώνται από τη GP. Ένα στα δέκα κατάλοιπα γλυκόζης βρίσκονται σε διακλάδωση, επομένως η αποικοδόμηση του γλυκογόνου από την GP θα σταματήσει μετά την απελευθέρωση έξι μορίων γλυκόζης ανά διακλάδωση. Για να συνεχιστεί ο καταβολισμός του γλυκογόνου, δύο επιπλέον ένζυμα, ανακατασκευάζουν το γλυκογόνο. Τα ένζυμα αυτά είναι μια μεταφοράση και μια γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6. Η μεταφοράση

μετακινεί μια ομάδα τριών καταλοίπων γλυκόζης από μια εξωτερική διακλάδωση σε μια άλλη. Η μεταφορά αυτή αφήνει εκτεθειμένο ένα κατάλοιπο γλυκόζης που συνδέεται με γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6. Η γλυκοζιτάση δεσμού α-1,6 (ένζυμο αποδιακλάδωσης), υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6 με αποτέλεσμα την απομάκρυνση ενός μορίου ελεύθερης γλυκόζης. Το ελεύθερο μόριο γλυκόζης στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται με το γλυκολυτικό ένζυμο εξοκινάση. Έτσι η διακλαδισμένη μορφή του γλυκογόνου μετατρέπεται σε γραμμική επιτρέποντας έτσι στην GP περαιτέρω διάσπαση. [4]

Εικόνα 5: Σχηματική παράσταση αποικοδόμησης του γλυκογόνου. [43]



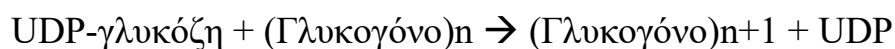
Εικόνα 6: Σχηματική παράσταση αποικοδόμησης γλυκογόνου προς παραγωγή και απελευθέρωση γλυκόζης στο αίμα. [17]



Σύνθεση

Η σύνθεση του γλυκογόνου, σε αντίθεση με την αποικοδόμησή του, απαιτεί την εισροή ενέργειας. Αυτή η ενέργεια προέρχεται από την τριφωσφορική ουριδίνη (UTP), η οποία αντιδρά με 1-φωσφορική γλυκόζη, σχηματίζοντας ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDP-γλυκόζη).⁽⁴⁴⁾ Για να ξεκινήσει η σύνθεση του γλυκογόνου είναι απαραίτητο ένα εναρκτήριο μόριο, πάνω στο οποίο προσθέτει αλυσίδες ολιγοσακχαριτών η συνθετάση του γλυκογόνου. Η συνθετάση του γλυκογόνου είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει έναν ολιγοσακχαρίτη αποτελούμενο από κατάλοιπα α-1,4 γλυκόζης, το οποίο είναι συνδεδεμένο με ένα φαινολικό άτομο οξυγόνου ενός μορίου τυροσίνης. [4]

Η UDP-γλυκόζη προστίθεται στο μη αναγωγικό άκρο των μορίων γλυκογόνου. Η αντίδραση της σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την συνθετάση του γλυκογόνου είναι η εξής:



Η συνθετάση του γλυκογόνου μεταφέρει μόρια γλυκόζης από την UDP-γλυκόζη σε μία αλυσίδα α-1,4 πολυγλυκόζης δημιουργώντας α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς με ελάχιστο αριθμό μορίων ίσο με τέσσερα. Στη συνέχεια, το ένζυμο γλυκανο-1,6-τρανσφεράση (ένζυμο διακλάδωσης) δημιουργεί τους α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το ένζυμο διακλάδωσης μεταφέρει μια αλυσίδα 6-7 καταλοίπων γλυκόζης από τον α-1,4 δεσμό και τη συνδέει στο υδροξύλιο μιας γλυκοζυλικής ομάδας στο εσωτερικό του μορίου. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μια διακλάδωση, ούτως ώστε η συνθετάση του γλυκογόνου να συνεχίσει να επιμηκύνει την αλυσίδα. [4]

1.3.2. Ρύθμιση μεταβολισμού γλυκογόνου

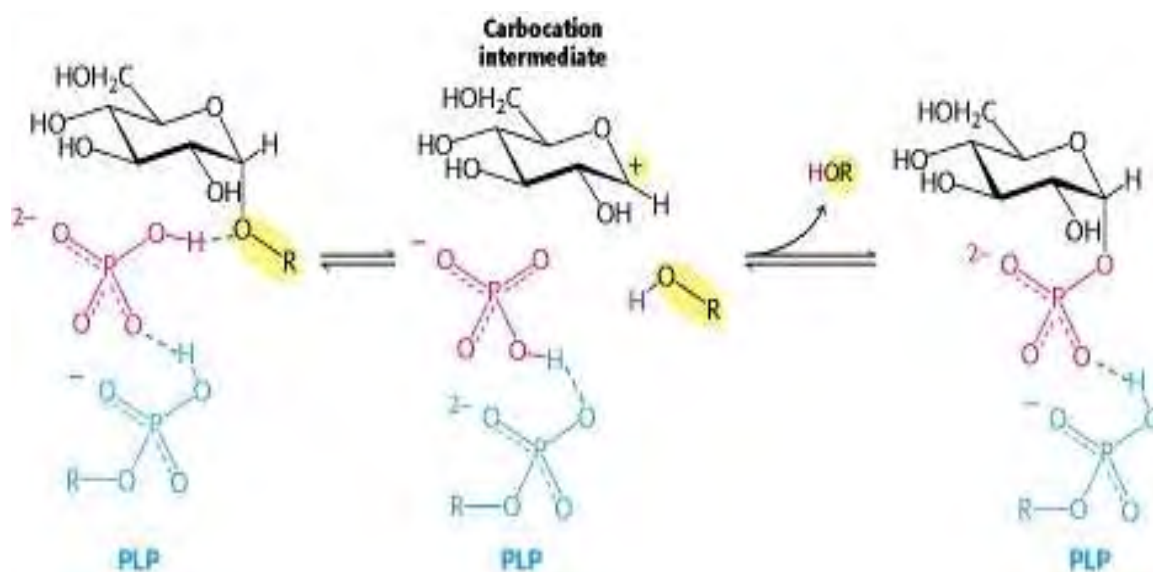
Στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου συμμετέχουν διάφορα ένζυμα που αποκρίνονται αλλοστερικά σε μεταβολίτες που σηματοδοτούν τις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Αυτές οι αλλοστερικές αποκρίσεις επιτρέπουν τη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηκότητας ώστε να ικανοποιεί τις ανάγκες του κυττάρου στο οποίο τα ένζυμα εκφράζονται. Εκτός των αλλοστερικών αποκρίσεων, ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται επίσης από ορμονικά διεγειρόμενους καταρράκτες, οι οποίοι οδηγούν σε αντιστρεπτή φωσφορυλίωση των ενζύμων που αλλάζει τις κινητικές τους ιδιότητες. Η ρύθμιση από ορμόνες επιτρέπει στον μεταβολισμό του γλυκογόνου να προσαρμόζεται στις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού. Με τους δύο αυτούς μηχανισμούς, ο καταβολισμός του γλυκογόνου ενοποιείται με τη σύνθεση του. [4]

1.3.3.Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης στη φωσφορυλιτική διάσπαση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) στοχεύει στη διάσπαση του γλυκογόνου μάλλον φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση του ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Για να συμβεί αυτό απαιτείται να γίνει αποκλεισμός του νερού από το ενεργό κέντρο. Διάφορες ενδείξεις παρέχουν πληροφορίες γύρω από τον μηχανισμό με τον οποίο η GP επιτυγχάνει τον αποκλεισμό του νερού. Τόσο το υπόστρωμα γλυκογόνου όσο και η παραγόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Μια άμεση προσβολή της φωσφορικής ομάδας στον C-1 ενός σακχάρου θα ανέστρεφε τη διαμόρφωση στον άνθρακα αυτό, διότι η αντίδραση θα προχωρούσε μέσω μιας μεταβατικής κατάστασης. Επειδή η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί β, απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων. Η πιο πιθανή εξήγηση για τα αποτελέσματα αυτά είναι ότι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν. [4]

Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Μια προσδεμένη ομάδα HPO_4^{-2} (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται με τη μεταφορά ενός πρωτονίου από την πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης φωσφορικής

πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος και του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης [4]



Μια άλλη εξήγηση είναι ότι η GP χρειάζεται φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), ένα παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6). Η αλδεϋδική ομάδα του συνενζύμου αυτού σχηματίζει μια βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα μια συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου. Τα αποτελέσματα δομικών μελετών υποδηλώνουν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μια θέση μεταξύ της 5'-P της PLP και του υποστρώματος γλυκογόνου. Η 5'-P ομάδα της PLP δρα μαζί με το ορθοφωσφορικό λειτουργώντας ως δότης πρωτονίων και στη συνέχεια ως δέκτης (οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό με τη μορφή HPO_4^{2-} , δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο, που είναι συνδεδεμένο στον C-4 της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου και ταυτόχρονα προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό προς σχηματισμό φωσφορικής γλυκόζης δεσμού α-1, και ακολούθως επιστρέφεται ένα άτομο υδρογόνου στην PLP. Ο ρόλος της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορικής διάσπασης δικαιολογείται από την απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο. [4]

Εικόνα 8: Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP (ροζ) σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (μπλε) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης [4]

Pyridoxal Phosphate (PLP)

PLP is needed by phosphorylase for catalytic activity.

The phosphate is the site of conjugate acid/conjugate base activity.



2. ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

2.1. Γενικά

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα ρυθμιστικό ένζυμο που καταλύει το πρώτο στάδιο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου για να δώσει 1-P γλυκόζη. Ανήκει στην τάξη των τρανσφερασών και πιο συγκεκριμένα στην τάξη των γλυκοζυλοτρανσφερασών (ονομάζεται και 1,4- α-D-γλυκο:φωσφορικό α-D γλυκοτρανσφεράση. [45])

Υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου στον οργανισμό: του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών. Στο ήπαρ, η 1-P-γλυκόζη κυρίως μετατρέπεται από φωσφογλυκομουτάση και φωσφατάση σε ελεύθερη γλυκόζη, η οποία απελευθερώνεται προς όφελος άλλων ιστών και ιδίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα όπου η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή

καυσίμου. Στους μύες, η 1-P-γλυκόζη χρησιμοποιείται για την παραγωγή μεταβολικής ενέργειας μέσω γλυκόλυσης. [45]

Η ισομορφή του εγκεφάλου παρέχει γλυκόζη κατά περιόδους υποξείας ή έντονης υπογλυκαιμίας. Οι δύο ισομορφές, η μυϊκή και αυτή του εγκεφάλου, παρέχουν γλυκόζη για ενεργειακή αποκατάσταση των ίδιων των ιστών. Γι' αυτό στους ιστούς αυτούς απουσιάζει το υδρολυτικό ένζυμο, η φωσφατάση της 6- φωσφορικής γλυκόζης, το οποίο διασπά τη φωσφορική ομάδα της φωσφορυλιωμένης γλυκόζης που παράγεται από την αποικοδόμηση του γλυκογόνου προς σχηματισμό ελεύθερης γλυκόζης και ορθοφωσφορικού. Αντίθετα, η ηπατική φωσφορυλάση έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο. [4]

Η GP είναι ένζυμο ομοδιμερές και εξαρτά τη δραστηριότητα του από τη φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου Ser14 από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης (PhK) ή από την πρόσδεση του αλλοστερικού ενεργοποιητή μονοφωσφορική Αδενοσίνη (AMP). Ωστόσο, εάν η φωσφορυλίωση του ενζύμου πραγματοποιηθεί απουσία γλυκογόνου, σχηματίζεται ανενεργό ομοτετραμερές στο οποίο παρεμποδίζεται στερεοχημικά η πρόσβαση γλυκογόνου στην καταλυτική περιοχή, εφόσον τα δυο ομοδιμερή διευθετούν τις καταλυτικές τους περιοχές απέναντι.⁽⁴⁵⁾ Η GP ήταν το πρώτο αλλοστερικό ένζυμο που ανακαλύφθηκε. Το επίτευγμα αυτό ήταν ένα από τα πολλά επιτεύγματα ορόσημο και πραγματοποιήθηκε από τους Carl και Gerty Cori. Το 1943, με τη βοήθεια του Arda Green, οι δύο επιστήμονες ανακάλυψαν ότι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, υπήρχε είτε στην a ή στη b μορφή ανάλογα με την κατάσταση φωσφορυλίωσης του, καθώς και στις καταστάσεις R και T με βάση την παρουσία του AMP. [46]

Η GP υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές, την GPb (χαμηλή δραστηριότητα, χαμηλή συγγένεια υποστρώματος, κυρίως σε T διαμόρφωση) και την GPa (υψηλή δραστηριότητα, υψηλή συγγένεια υποστρώματος, κυρίως σε R διαμόρφωση). Η GP ρυθμίζεται από αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις και αντίστροφη φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλάση b (GPb), η μορφή του ενζύμου που βρέθηκε σε χαλαρούς μύς, απαιτεί AMP για την δραστηριότητά της και αναστέλλεται από 6-P-γλυκόζη και ATP. Το ένζυμο εμφανίζει ομοτροπικά αποτελέσματα

(αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών για ταυτόσημες συνδέσεις) τόσο για υπόστρωμα όσο και AMP και αμοιβαία ετεροτροπικά αποτελέσματα (αλληλεπιδράσεις μεταξύ θέσεων για διαφορετικές συνδέσεις). Η φωσφορυλάση a (GP_a) είναι ενεργός απουσία του AMP αν και το δεσμευμένο υπόστρωμα παραμένει να έχει συνεργιστική δράση. Η δραστηριότητα μπορεί να αυξηθεί κατά 10-20% από την AMP. [4]

Η GP αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες MB 97.5 kDa και από το συνένζυμο PLP, που είναι ένα παράγωγο της πυριδοξίνης ή βιταμίνης B₆ και βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη 609 σε κάθε υπομονάδα. Κάθε υπομονάδα είναι αναδιπλωμένη σε μία αμινο-τελική δομική περιοχή με 480 κατάλοιπα όπου περιέχει μία θέση πρόσδεσης γλυκογόνου και μία καρβοξυ-τελική δομική περιοχή με 360 κατάλοιπα. Σε μία σχισμή που σχηματίζουν αυτά τα δύο κέντρα βρίσκεται το καταλυτικό κέντρο. Η φωσφορική πυριδοξάλη PLP είναι συμπαραγοντας πολλών ενζύμων (αποκαρβοξυλάσες α-αμινοξέων, τρανσαμινάσες). [4, 7]

Ο μηχανισμός της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου χρειάζεται την PLP για να λειτουργήσει. Η αλδευδική ομάδα της PLP σχηματίζει μία βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα μία συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου. Η ορθοφωσφορική ομάδα που αντιδράει βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων. Το σχηματιζόμενο καρβοκατιόν προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν και σχηματίζει την 1-φωσφορική γλυκόζη. [7]

2.2. Κρυσταλλική δομή φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Οι δομές των δύο μορφών της GP έχουν προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά το 1989. Βρέθηκε ποσοστό ύδατος περίπου 48% μέσα σε τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Τα κανάλια αυτά επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους.[47] Έχουν βρεθεί επτά κέντρα σύνδεσης της GP:

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- Αλλοστερικό κέντρο (N)

- Καταλυτικό κέντρο (C)
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων)
- Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Εικόνα 9: Αναπαράσταση του μονομερούς της GP. Οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που αντιστοιχούν στην έλικα α1, στην περιοχή επικαλύμματος, στην αρχή της έλικας α2 και στην έλικα της περιοχής πύργου, ο βρόχος 280s και η αρχή της έλικας α8 μαζί με τον βρόχο που συνδέει τις διαμορφώσεις β7 και β8 είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Το απαραίτητο συνένζυμο PLP βρίσκεται στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένο με τη Lys680 της έλικας α21. Το καταλυτικό κέντρο, που φαίνεται στο σχήμα μαζί με την GIP, βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο περιβάλλον διαλύτης έχει πρόσβαση σ' αυτό μέσω ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å. Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με το AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, μεταξύ της έλικας α2 και της α8. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, συνδέεται με την έλικα α12 και είναι στην επιφάνεια του ενζύμου μακριά από το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο

του νουκλεοζιτικού αναστολέα βρίσκεται στην είσοδο του καναλιού του καταλυτικού κέντρου. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτίδια που συνδέονται σε αυτό το κέντρο δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της έλικας $\alpha 19$. Η κατάληψη αυτού του κέντρου σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου. [48]



Η GP είναι μια πρωτεΐνη α/β και αποτελείται από α -έλικες (52%), β -ελάσματα (20%), δυο έλικες 310 μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα, και μια έλικα π μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων (153-247) που αποτελείται μόνο από β -ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο από α -έλικες. Τα αμινοξέα αναδιπλώνονται έτσι ώστε να υπάρχει μία συμπαγής δομή ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές προεξέχουσες περιοχές και κανάλια που επιτρέπουν τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (cap) και πύργος (tower) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόχος 280s (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18). [49]

2.2.1. Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14

Το κέντρο αυτό είναι υπεύθυνο για την μετατροπή της GP από την β στη α μορφή και βρίσκεται στην επιφάνεια μεταξύ των δύο υπομονάδων της. Αφού η Ser 14 φωσφορυλιωθεί, αλλάζει τη στερεοδιάταξη των 19 αμινοξέων στο τελικό άκρο C του ενζύμου. [4, 7]

2.2.2. Το αλλοστερικό κέντρο

Το κέντρο αυτό βρίσκεται στην επιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων, περίπου 12 Å από τη Ser 14. Δεσμεύει τον αλλοστερικό ενεργοποιητή AMP και βρίσκεται στην διεπιφάνεια των υπομονάδων 30 Å από το καταλυτικό κέντρο. Αποτελείται από τρία υποκέντρα τα οποία είναι α) το υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας β) το υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων ριβόζης και γ) το υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων πουρίνης. Οι ενώσεις που συνδέονται στο κέντρο αυτό μπορούν ανάλογα με τη δομή τους να ενεργοποιούν ή να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. [20, 21]

2.2.3. Το καταλυτικό κέντρο

Αποτελεί μία βαθιά σχισμή στο κέντρο του μορίου 15 Å από την επιφάνεια. Είναι αρκετά κοντά στο συνένζυμο PLP, στο κέντρο του μονομερούς όπου οι επικράτειες 1 και 2 (χωρίζονται ανάλογα με τον αριθμό καταλοίπων, 1-484 η 1 και 485-842 η 2) ενώνονται. Έχει βρεθεί ότι ορισμένοι αναστολείς αναλόγων γλυκόζης συνδέονται σε αυτό το κέντρο και προωθούν την κατάσταση T σταθεροποιώντας το βρόχο 280s. Κατά τη μετάπτωση από T σε R, ο βρόχος αυτός εκτοπίζεται επιτρέποντας τη διόδο 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. [21]

2.2.4. Το αποθηκευτικό κέντρο ή κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Βρίσκεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε μια σχισμή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας. Σε αυτή την περιοχή η φωσφορυλάση του γλυκογόνου συνδέεται με σωματίδια γλυκογόνου. Η πρόσδεση ολιγοσακχαριτών στο κέντρο αυτό οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης. [21]

2.2.5. Το κέντρο αναστολής

Είναι ένα υδρόφοβο κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και απόσταση 12 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο. Στο κέντρο της μυϊκής GP συνδέονται πουρίνες (αδενίνη κ.α.), νουκλεοσίδια (αδενοσίνη, ινοσίνη κ.α.), φωσφονουκλεοτίδια (AMP, ATP, IMP, NADH κ.α.) και κάποιες ετεροκυκλικές ενώσεις. Αυτό δεν συμβαίνει στην ηπατική GP. Η σύνδεση στο κέντρο αυτό, έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου και συγχρόνως την φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου και αυτός είναι ο λόγος αναστολής της δράσης της GP. Η σύνδεση των αναστολέων με το ένζυμο οφείλεται κύρια στην ενέργεια που προκύπτει από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων. [8]

2.2.6. Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Βρίσκεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPb. Σε αυτό συνδέεται η ένωση CP320626 (Pfizer) και ινδολο-2-καρβοξαμίδια καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GPb. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GPa. [6]

2.2.7.Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης

Πρόσφατα, σε μελέτη του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας βρέθηκε το κέντρο όπου προσδένεται η κερσετίνη. Παρατηρήθηκε ότι η κερσετίνη συνδέεται σε αυτό το κέντρο σε αντίθεση με τη χρυσίνη και τη φλαβοπυριδόλη, που έχουν παρόμοια χημική δομή με την κερσετίνη, που δεσμεύονται αποκλειστικά στο αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης απέχει 15 Å από το ενεργό κέντρο, 43 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 32 Å από το κέντρο αναστολής. Το κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης συγκροτείται από τα κατάλοιπα Lys544, Arg551, Lys665 και Tyr548 της C-περιοχής και από τα κατάλοιπα Glu120 και Glu123 της N-περιοχής. Συγκριτική δομική ανάλυση των T και R διαμορφώσεων, μεταξύ του συμπλέγματος rmGPb – κερσετίνης και της ελεύθερης rmGPb, έδειξαν ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην R-κατάσταση, ενώ στην T-κατάσταση (ανενεργός) οι διαφορές είναι μικρές. [69]

2.3. Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις – Κινάση της Φωσφορυλάσης

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο που υπάρχει σε δύο αλληλομετατρεπόμενες μορφές: την GPb που είναι χαμηλής δραστηριότητας και χαμηλής συγγένειας προς το υπόστρωμα και είναι κυρίως στην τεταμένη (Tense) T κατάσταση και την GPa που είναι υψηλής δραστηριότητας και υψηλής συγγένειας προς το υπόστρωμα και είναι κυρίως στην χαλαρή (Relaxed) R κατάσταση. Συνήθως η φωσφορυλάση βρίσκεται κυρίως στη μορφή b ενώ στην μορφή a βρίσκεται περίπου το 10 % του συνολικού ενζύμου. Αλλοστερικοί ενεργοποιητές όπως η AMP, ή αλλοστερικοί αναστολείς όπως η ATP, η γλυκόζη και η καφεΐνη μπορούν να μεταβάλλουν την ισορροπία μεταξύ της λιγότερο ενεργής κατάστασης T και της ενεργής κατάστασης R και αντίστροφα.[66] Η μετάπτωση στη διαμόρφωση R γίνεται κυρίως μέσω της μετατροπής της φωσφορυλάσης b σε φωσφορυλάση a με φωσφορυλίωση της Ser14 από την κινάση της φωσφορυλάσης. Αντίθετα,

η μετάπτωση στη διαμόρφωση T γίνεται κυρίως μέσω της μετατροπής της φωσφορυλάσης από a σε b με την αποφωσφορυλίωση της Ser14 από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1).[67] Η φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης b και η μετατροπή της σε a έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP, αν και η δραστηριότητά του μπορεί να αυξηθεί επιπλέον με την παρουσία AMP.[50] Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ρυθμίζεται με διάφορους αλλοστερικούς τελεστές που σηματοδοτούν την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου. Επίσης, ρυθμίζεται μέσω της αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης, ως απόκριση σε ορμονικά σήματα όπως της ινσουλίνης, της επινεφρίνης και της γλυκαγόνης. Κάθε μια από αυτές τις ισομορφές βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T, όμως η ισορροπία για τη φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T. Η φωσφορυλάση a και η φωσφορυλάση b διαφέρουν κατά μία φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η μετάβαση από την κατάσταση T στην κατάσταση R συνεπάγεται μια στροφή 10 μοιρών γύρω από τον άξονα συμμετρίας δευτέρας τάξεως του διμερούς. Περισσότερο σημαντικό είναι ότι η μετάβαση αυτή συνδέεται με δομικές αλλαγές στις α-έλικες οι οποίες μετακινούν ένα βρόχο έξω από το ενεργό κέντρο της κάθε υπομονάδας. Έτσι, η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργός διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό ανιόν είναι καλά οργανωμένη. Η διαμόρφωση T εμφανίζει μικρή συγγένεια για τα υποστρώματα και τους αλλοστερικούς ενεργοποιητές και υψηλή συγγένεια για τους αναστολείς, ενώ, η διαμόρφωση R εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τα υποστρώματα και τους ενεργοποιητές και μικρή συγγένεια για τους αναστολείς. Το κυριότερο χαρακτηριστικό του προτύπου είναι ότι ισχύει πάντα η συνθήκη συμμετρίας, δηλαδή αφ' ενός μεν υπάρχει ένας άξονας συμμετρίας μεταξύ των υπομονάδων στο μόριο, αφ' ετέρου δε η αλλαγή της διαμόρφωσης της μιας υπομονάδας προκαλεί συμμετρική αλλαγή στη διαμόρφωση και των άλλων υπομονάδων. [4,7,8]

Η πρωτεϊνική κινάση A ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης που ενεργοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου GP. Η επινεφρίνη και η γλυκαγόνη είναι οι κύριες ορμόνες που συμμετέχουν

στο μηχανισμό αποικοδόμησης του γλυκογόνου. Η επινεφρίνη απελευθερώνεται όταν υπάρχει μυϊκή δραστηριότητα ή ψυχολογική ένταση και διεγείρει την αποικοδόμηση γλυκογόνου κυρίως στους μύς και λιγότερο στο ήπαρ. Αντίθετα η γλυκαγόνη που παράγεται στα ακύτταρα του παγκρέατος όταν η συγκέντρωση σακχάρου είναι χαμηλή, διεγείρει την αποικοδόμηση γλυκογόνου κυρίως στο ήπαρ. [4,7]

Τα στάδια με τα οποία γίνεται η έναρξη της αποικοδόμησης του γλυκογόνου είναι τα εξής: 1) Η επινεφρίνη και η γλυκαγόνη προσδένονται σε υποδοχείς β των μυών και υποδοχείς γλυκαγόνης αντίστοιχα, ενεργοποιώντας την υπομονάδα α της ετερομερούς πρωτεΐνης Gs. 2) Η υπομονάδα α της Gs δεσμεύει και ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, ένα ένζυμο που βοηθά στο σχηματισμό κυκλικής AMP από ATP. 3) Η AMP είναι αγγελιοφόρο νουκλεοτίδιο που όταν είναι σε υψηλά επίπεδα, ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A. 4) Η πρωτεϊνική κινάση A φωσφορυλιώνει την υπομονάδα β της κινάσης της φωσφορυλάσης που με τη σειρά της ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και προσθέτει μία φωσφορική ομάδα στη συνθάση του γλυκογόνου, μειώνοντας έτσι τη δράση της, ευνοώντας την αποικοδόμηση του γλυκογόνου. [4, 7]

Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργός μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R (Εικόνα 10). Η ATP δρα ως ένας αρνητικός αλλοστερικός τελεστής, ανταγωνιζόμενος την AMP, ευνοώντας έτσι την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην κατάσταση R και αντιστρόφως, ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του μυϊκού κυττάρου. Σε φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργός λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργός, ανεξάρτητα από τα επίπεδα της AMP, της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Στους μύες που βρίσκονται σε ηρεμία, σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή b . 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. [4]

Εικόνα 11: Αλλοστερική ρύθμιση της ηπατικής φωσφορυλάσης. Η πρόσδεση της γλυκόζης στη φωσφορυλάση *a* μετατοπίζει την ισορροπία προς την κατάσταση *T* και απενεργοποιεί το ένζυμο. [4]

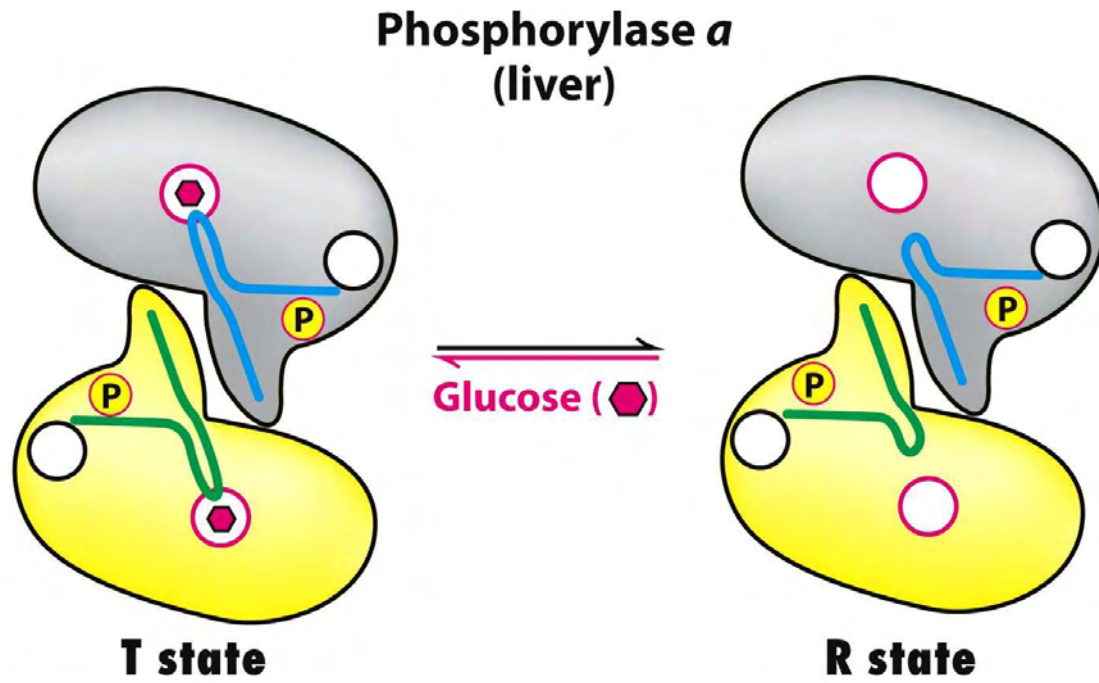


Figure 21.13
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Εικόνα 12: Αριστερά φαίνεται η δομή της φωσφορυλάσης *a* και δεξιά η δομή της φωσφορυλάσης *b*. Η φωσφορυλάση *a* φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 14 κάθε υπομονάδας. Η τροποποίηση αυτή ευνοεί τη δομή της πλέον ενεργού κατάστασης *R*. Η υπομονάδα Οι έλικες και οι βρόχοι απεικονίζονται με το κόκκινο και μπλε χρώμα και η υπομονάδα με το

λευκό ενώ η άλλη με κίτρινο. Τέλος με πορτοκαλί και πράσινο απεικονίζονται οι ρυθμιστικές δομές. Η φωσφορυλάση *b* δεν φωσφορυλιώνεται και υπάρχει κυρίως στην κατάσταση *T*. [51]

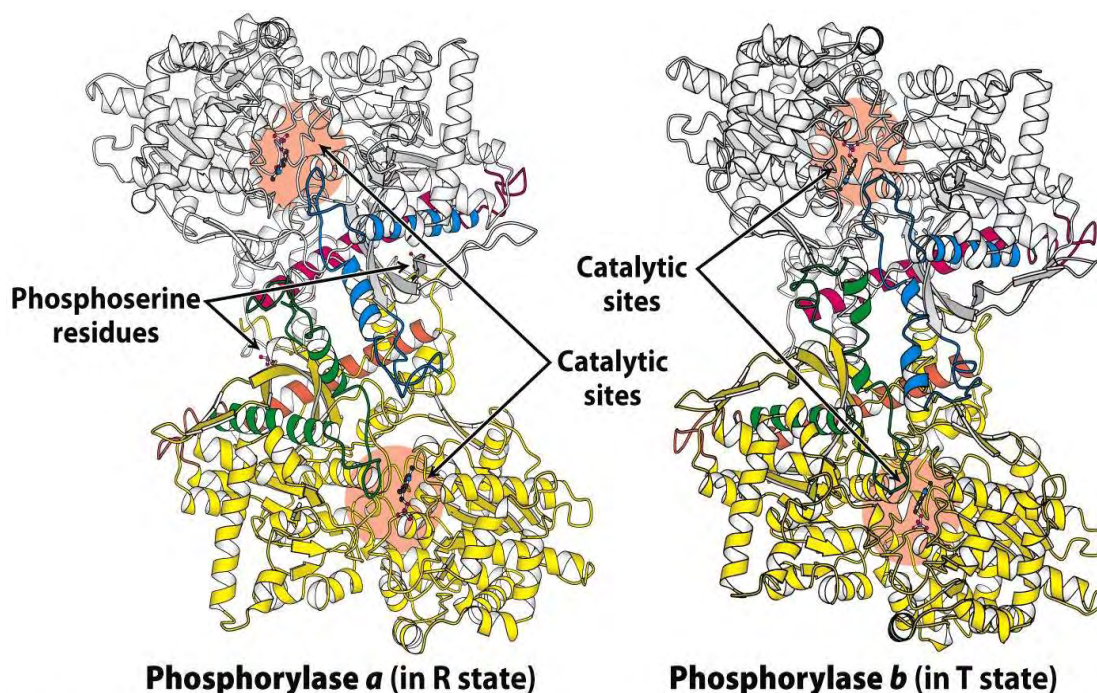


Figure 21.10
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

2.4. Αναστολή δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από υπογλυκαιμικούς παράγοντες

Υπάρχουν πολλά διαφορετικά μόρια που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της ηπατικής παραγωγής γλυκόζης και τα οποία ερευνώνται ως προς την δυνατότητα αναστολής τους και κατ' επέκταση την μείωση των υψηλών επιπέδων γλυκόζης. (Ανταγωνιστές του υποδοχέα γλυκαγόνης, φωσφορυλάσης γλυκογόνου, 11- βητα-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης-1 και 1,6-δισφωφατάσης φρουκτόζης κ.α.). Υπό μελέτη είναι και οι ανταγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και αναστολέων της παλμιτοϋλοτρανσφεράσης καρνιτίνης, ενώ έχει αποδειχτεί η συμβολή ορισμένων ενώσεων στην αναστολή άλλων μορίων-στόχων όπως η τρανσλοκάση, η φωσφατάση της 6-P γλυκόζης, η κινάση της συνθάσης

γλυκογόνου-3, ο υποδοχέας των ανταγωνιστών της 2B αδενοσίνης, η κινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού και η κινάση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης. [10]

Μεγάλο μέρος της έρευνας που σχετίζεται με την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2 αφορά ενώσεις που ενδεχομένως προκαλούν αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, καθώς η διάσπαση του ηπατικού γλυκογόνου και τα αποθεματά του συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην παραγωγή και πρόσληψη γλυκόζης από το ήπαρ. Η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζεται από το ένζυμο συνθάση του γλυκογόνου (GS) ενώ η αποικοδόμηση από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP). Η GS ενεργοποιείται όταν η GP φωσφορυλιώνεται, καθώς η φωσφορυλιωμένη μορφή GP_a είναι ένας ισχυρός αλλοστερικός αναστολέας της φωσφατάσης της GS, η οποία καταλύει την αποφωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση του GS.

Η φωσφορυλιωμένη ή μη φωσφορυλιωμένη μορφή του GP δηλαδή, ρυθμίζει το ρυθμό γλυκογονόλυσης και το ρυθμό σύνθεσης γλυκογόνου, ελέγχοντας τη μετάβαση μεταξύ της αποικοδόμησης και της σύνθεσης του γλυκογόνου. Επομένως η αναστολή της GP μπορεί να επιφέρει μείωση της γλυκόζης που προκύπτει από τη γλυκογονόλυση και τη γλυκονεογένεση.

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές ενώσεις που έχει αποδειχτεί ότι αναστέλλουν τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Ορισμένα παράγωγα γλυκόζης έχουν ερευνηθεί εκτενώς ως προς την ανασταλτική τους δράση, η οποία οφείλεται στη σύνδεσή τους στο καταλυτικό κέντρο της GP, με κυριότερα και αποτελεσματικότερα εξ' αυτών ορισμένους μικρογραμμαμοριακούς αναστολείς GP_b του μυ κουνελιού. [5, 9, 11, 14]

Οι N-ακυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνες ήταν μεταξύ των πρώτων αναστολέων και πολλά ανάλογα-παράγωγα έχουν ερευνηθεί. Σε αυτή τη σειρά, η N-(2-ναφθοϋλ)-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνη ήταν ο καλύτερος αναστολέας, και χρησίμευσε επίσης ως επικεφαλής δομή για βιοϊσοστερικές αντικαταστάσεις. Η ενζυματική καθώς και η κρυσταλλογραφική μελέτη αποκάλυψε υψηλή ομοιότητα του αμιδίου και αναστολείς τύπου 1,2,3-τριαζόλης τόσο σε δεσμευτική ισχύ όσο και σε δομικά χαρακτηρι-

στικά του ενζύμου-συμπλόκου αναστολέα. Κινητικές μελέτες των βιοϊσοστερικών οξαδιαζολών 3-5 απέδειξαν ότι η σύσταση του ετεροκύκλου είχε μια ισχυρή επίπτωση στην αναστολή: ο πιο αποτελεσματικός αναστολέας σε αυτές τις σειρές ήταν 5-(β-D-γλυκοκυρανοσυλο) -3-(2-ναφθυλ)-1,2,4-οξαδιαζόλη. Άλλες έρευνες ετεροκυκλικών ενώσεων C-γλυκοκυρανοσυλίου με συμπυκνωμένους δακτυλίους έδειξαν ότι η βενζοθειαζόλη ήταν πολύ λιγότερο αποτελεσματική από βενζιμιδαζόλη. Επί του παρόντος, η θεραπεία για το διαβήτη τύπου 2 βασίζεται κυρίως σε μια ποικιλία προσεγγίσεων, όπως ανάλογα γουανιδίνης, φάρμακα που κάνουν ευπαθή την ινσουλίνη, αναστολείς μεταφορέα γλυκόζης (SGLT-2), γλυκαγόνη που μιμείται τη δράση πεπτιδάσης-1 (GLP-1) αναστολείς των αναλόγων της διπεπτιδυλικής πεπτιδάσης-4 (DPP-IV), τα οποία όλα προορίζονται να μειώσουν την υπεργλυκαιμία. Ωστόσο, αυτές οι θεραπείες έχουν σημαντικές παρενέργειες, όπως αύξηση του σωματικού βάρους και αθηροσκληρωτική καρδιαγγειακή ασθένεια, καθώς και περιορισμένη αποτελεσματικότητα και ανεκτικότητα. [10, 11, 14]

2.5. Φυτικά εκχυλίσματα ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Εδώ και χιλιετίες είναι γνωστές διάφορες θετικές επιδράσεις ορισμένων φυτών στον ανθρώπινο οργανισμό και η συμβολή τους στη διατήρηση καλής υγείας. Στις μέρες μας, η χρήση φαρμακευτικών φυτών καταλαμβάνει ακόμη την πρώτη θέση έναντι της χρήσης βιομηχανικών φαρμάκων σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες. Τα φαρμακευτικά φυτά χρησιμοποιούνται για πολλές διαφορετικές μεταξύ τους ασθένειες, (όπως κρυολογήματα, δερματοπάθειες, στομαχικά έλκη κ.α.) ή και χρόνιες σοβαρότερες νόσους όπως ο διαβήτης τύπου 2. Μόνο κατά τις τελευταίες όμως δεκαετίες έχει γίνει επιστημονική έρευνα σχετικά με τις αντιδιαβητικές ιδιότητες διαφόρων φυτών και πολλά από αυτά έχει αποδειχτεί ότι πράγματι παρουσιάζουν αντιδιαβητική δράση. Αν και υπάρχουν χιλιάδες φυτά που θεωρείται ότι έχουν αντιδιαβητικές ιδιότητες, μόνο 400 έχουν μελετηθεί επιστημονικά. Πέραν της

θεραπευτικής τους χρήσης, γενικά τα φυτικά φάρμακα πλεονεκτούν στο ότι συνήθως εμφανίζουν λιγότερες ή καθόλου παρενέργειες και χαμηλότερη τοξικότητα συγκριτικά με τα συνθετικά. Τα συνηθέστερα συνθετικά αντιδιαβητικά φάρμακα είναι διγουανίδια, σουλφονουλουρίες και θειαζολιδενοδιόνες. Λόγω της ύπαρξης παρενεργειών και λόγω του περιορισμού στην απορρόφηση, το μεταβολισμό και την απομάκρυνση των ουσιών των φαρμάκων, η χρήση τους έχει μειονεκτήματα και περιορισμούς. Για το λόγο αυτό γίνεται αναζήτηση νέων φυσικών ενώσεων που βρίσκονται σε φαρμακευτικά φυτά και που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων για θεραπεία πρώτης γραμμής για το διαβήτη τύπου II, είτε συμπληρωματικά, ως βοηθητικοί διατροφικοί παράγοντες. Η δράση των φυτικών ενώσεων έγκειται στη ρύθμιση των οδών που ελέγχουν την αντίσταση στην ινσουλίνη, τη λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος ή την απορρόφηση της γλυκόζης από τον οργανισμό. Κάθε φαρμακευτικό φυτό έχει διαφορετικό μηχανισμό δράσης στη διαδικασία ρύθμισης της γλυκόζης. Κάποια επιδρούν σε μία μόνο οδό ελέγχου, ενώ άλλα σε παραπάνω. [22, 23]

Τα τελευταία χρόνια η φωσφορυλάση του γλυκογόνου αποτελεί βασικό στόχο για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών φαρμακευτικών ή διατροφικών παρασκευασμάτων με λιγότερες παρενέργειες και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο έλεγχος της γλυκόζης στο αίμα μπορεί να γίνει σε ικανοποιητικό βαθμό και μέσω της αναστολή της GP. Η καταλυτική θέση του ενζύμου έχει χαρτογραφηθεί με τη σύνδεση της γλυκόζης και αναλόγων γλυκόζης που έχουν σχεδιαστεί με βάση τις πληροφορίες που προέρχονται από την κρυσταλλική δομή της T-διαμόρφωσης του συμπλόκου GPb- α -D-γλυκόζης. Αναστολείς όπως η γλυκόζη, που σταθεροποιούν την διαμόρφωση T, μπλοκάρουν την είσοδο στην ενεργό θέση με την σταθεροποίηση μίας κλειστής θέσης βρόχου μήκους έξι καταλοίπων (βρόχος 280s). Έτσι, οι περισσότεροι αναστολείς έχουν σχεδιαστεί για να μιμούνται τις επαφές της γλυκόζης που εντοπίζονται στη κλειστή θέση του βρόχου 280s. [5, 9, 13]

Πρόσφατα, η έρευνα γύρω από νέους αναστολείς της GP εστιάζεται σε φλαβονοειδή, τερπενοειδή, παράγωγα βενζοϊκού οξέος, πολυσακχαρίτες, ανάλογα ινσουλίνης, αλκαλοειδή, στερόλες και

ακόρεστα λιπαρά οξέα προερχόμενα από φυτά μίας και έχει αποδειχθεί ότι είναι σημαντικοί αναστολείς της GP. [15]

2.6. Φυτικά εκχυλίσματα *Rosaceae*

Η οικογένεια *Rosaceae* (οικογένεια Ροδοειδών), είναι μια μεσαίου μεγέθους οικογένεια ανθοφόρων φυτών, που συμπεριλαμβάνει 4.828 γνωστά είδη σε 91 γένη.^(52, 53) Το όνομα προέρχεται από το γένος *Rosa*. Μεταξύ των πλουσιότερων γενών είναι η *Alchemilla* (270), *Sorbus* (260), *Crataegus* (260), *Cotoneaster* (260), *Rubus* (250) και *Prunus* (δαμασκηλιά, κερασιά, ροδακινιά, βερικοκιά και αμυγδαλιά) με περίπου 200 είδη.⁽⁵⁴⁾ Η οικογένεια *Rosaceae* περιλαμβάνει βότανα, θάμνους και δέντρα. Τα περισσότερα είδη είναι φυλλοβόλα, αλλά ορισμένα είναι αιθαλή. Έχουν μια παγκόσμια εμβέλεια, αλλά παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαφοροποίηση και ποικιλία στο Βόρειο Ημισφαίριο. Από την οικογένεια *Rosaceae* προέρχονται πολλά προϊόντα μεγάλης οικονομικής σημασίας, συμπεριλαμβανομένων πολλών βρώσιμων φρούτων (όπως μήλα, αχλάδια, κυδώνια, βερικόκα, δαμάσκηνα, κεράσια, ροδάκινα, σμέουρα, λοβούς και φράουλες), αμύγδαλα και διακοσμητικά δένδρα και θάμνους. [55]

2.6.1. *Prunus webbi*

Είναι δέντρο της οικογένειας *Rosaceae*, συγγενές της αμυγδαλιάς καθώς και της ροδακινιάς, νεκταρινιάς και κερασιάς. Είναι είδος γηγενές στη Μικρά Ασία και τη Νοτιοανατολική και Νοτιοδυτική Ευρώπη. [56]

2.6.2. *Potentilla recta* (Πεντάφυλλο/Ποτεντίλλη)

Το λουλούδι *Potentilla recta* ή sulphur cinquefoil, ανήκει στα είδη *Cinquefoil* της οικογένειας *Rosaceae*. Είναι εγγενές στην Ευρασία, αλλά είναι παρόν στη Βόρεια Αμερική ως εισαγόμενο είδος, που κυμαίνεται

σχεδόν σε ολόκληρη την ήπειρο εκτός από το βορειότερο τμήμα του Καναδά και της Αλάσκας. [57]

Το φυτό κατά πάσα πιθανότητα προήλθε από τη λεκάνη της Μεσογείου και συλλέχθηκε για πρώτη φορά τον 19^ο αιώνα στο Οντάριο και το 1914 στη Βρετανική Κολομβία. Είναι γνωστό ως δευτερεύον βλαπτικό ζιζάνιο σε ορισμένες περιοχές. Παρουσιάζεται σε πολλούς τύπους οικοτόπων, συμπεριλαμβανομένων των διαταραγμένων, βλαστικών τόπων. [58]

Είναι ένα πολυετές βότανο με φουντωτή βλάστηση που αναπτύσσεται ορθόκλαδα με φυλλώδη στελέχη που φτάνουν σε ύψος τα 80 εκατοστά. Το άνω μέρος του στελέχους είναι διακλαδισμένο και πυκνά τριχωτό, και φέρει επίσης μερικές αδενικές τρίχες. Τα χαμηλότερα φύλλα έχουν μακριούς μίσχους και τα φύλλα των στελεχών είναι διατεταγμένα εναλλάξ και έχουν μικρούς μίσχους. [59]

3. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ - ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ

3.1. Αρχές ενζυμικής κινητικής

Τα ένζυμα είναι μακρομοριακοί βιολογικοί καταλύτες που επιταχύνουν τις χημικές αντιδράσεις. Τα περισσότερα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, αν και λίγα είναι μόρια καταλυτικού RNA. Τα μόρια στα οποία μπορούν να δράσουν τα ένζυμα ονομάζονται υποστρώματα και το ένζυμο μετατρέπει τα υποστρώματα σε διαφορετικά μόρια γνωστά ως προϊόντα. Σχεδόν όλες οι μεταβολικές διεργασίες στο κύτταρο χρειάζονται κατάλυση ενζύμων για να εμφανιστούν με ρυθμούς αρκετά γρήγορους για να διατηρήσουν τη ζωή.[60] Οι μεταβολικές οδοί εξαρτώνται από τα ένζυμα για να καταλύουν μεμονωμένα στάδια. Η μελέτη των ενζύμων ονομάζεται ενζυμολογία και πρόσφατα αναπτύχθηκε ένα νέο πεδίο ανάλυσης ψευδοενζύμου, αναγνωρίζοντας ότι κατά την εξέλιξη ορισμένα ένζυμα έχουν χάσει την ικανότητα να διεξάγουν βιολογική κατάλυση, η οποία συχνά αντανάκλαται στις αλληλουχίες αμινοξέων

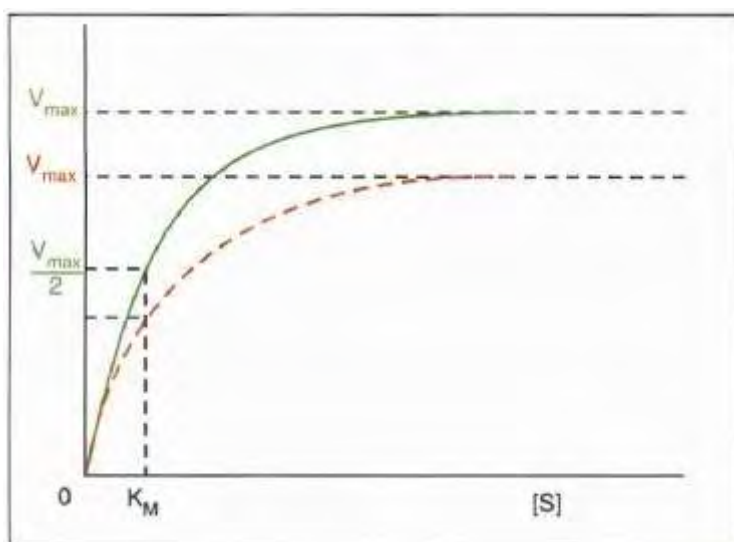
τους και στις ασυνήθιστες "ψευδοκαταλυτικές" ιδιότητες.[61] Καταλύουν περισσότερους από 5.000 τύπους βιοχημικής αντίδρασης. Η εξειδίκευση των ενζύμων προέρχεται από τις μοναδικές τρισδιάστατες δομές τους. [62]

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων, όπως το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του ενζύμου. Σε μεγάλο βαθμό όμως αυτή εξαρτάται από τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Η επιτάχυνση αυτή αρχικά είναι γραμμικώς ανάλογη με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, αυτό όμως συμβαίνει μέχρι ενός σημείου, πέραν του οποίου τείνει να υπάρξει σταθεροποίηση. [7]

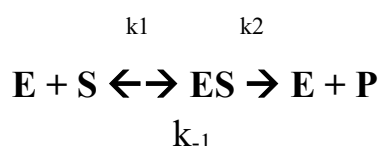
Η κινητική των ενζύμων είναι η διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο τα ένζυμα δεσμεύουν τα υποστρώματα και τα μετατρέπουν σε προϊόντα. Τα δεδομένα ρυθμού που χρησιμοποιούνται στις κινητικές αναλύσεις λαμβάνονται συνήθως από προσδιορισμούς ενζύμων. Το 1913 ο Leonor Michaelis και ο Maud Leonora Menten πρότειναν μια ποσοτική θεωρία της κινητικής του ενζύμου, η οποία αναφέρεται ως κινητική Michaelis-Menten.[63] Η κύρια συμβολή των Michaelis και Menten ήταν να σκεφτούν τις ενζυμικές αντιδράσεις σε δύο στάδια. Στο πρώτο, το υπόστρωμα δεσμεύεται αναστρέψιμα στο ένζυμο, σχηματίζοντας το σύμπλεγμα ενζύμου-υποστρώματος (καλείται και σύμπλοκο Michaelis-Menten προς τιμήν τους). Το ένζυμο κατόπιν καταλύει το χημικό στάδιο στην αντίδραση και απελευθερώνει το προϊόν. Αυτή η υπόθεση αναπτύχθηκε περαιτέρω από τους G.E. Briggs και J.B. S. Haldane, οι οποίοι ανέπτυξαν κινητικές εξισώσεις που χρησιμοποιούνται ακόμα ευρέως σήμερα. [64]

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, σύμφωνα με το μοντέλο Michaelis-Menten, μελετά την μέτρηση των δύο χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου, δηλαδή της μέγιστης ενζυμικής ταχύτητας V_{max} και της σταθεράς K_m . Επίσης μελετά τους παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση, όπως είναι η συγκέντρωση του ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν με το ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεως, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς), το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς. [4]

Εικόνα 13: Κινητική Michaelis-Menten. Απεικονίζεται η ταχύτητα V μίας ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος S . Η σταθερά K_m είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος το οποίο οδηγεί την ενζυμική αντίδραση να πραγματοποιείται με ταχύτητα ίση με το μισό της μέγιστης ταχύτητας ($V_{max}/2$). [4]



Η παρακάτω εξίσωση εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων:



Όπου E: Ένζυμο, S: Υπόστρωμα, ES: Σύμπλοκο Ενζύμου-Υποστρώματος, P: Προϊόν, $K_1/K_{-1}/K_2$: οι κινητικές σταθερές της ταχύτητας των επιμέρους αντιδράσεων.

Η εξίσωση δείχνει το πως ένα ένζυμο E αντιδρά με το υπόστρωμα S για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο ES με μια κινητική σταθερά k_1 . Το σύμπλοκο ES μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους: Είτε 1) να διασπαστεί σε E και S με μια κινητική σταθερά k_{-1} , είτε 2) να σχηματίσει προϊόν P με μια κινητική σταθερά k_2 . Από το παραπάνω μοντέλο προκύπτει η σταθερά Michaelis- Menten (K_m) που ορίζεται ως:

$$K_m = [K_2 + K_{-1}] / K_1$$

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμα. Ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος S που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης V_{max} . Αν η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης είναι V_o και η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος είναι $[S]$, η εξίσωση Michaelis-Menten είναι:

$$V_o = V_{max} [S/(S + K_m)]$$

Η αρχική ταχύτητα μιας αντίδρασης εξαρτάται από την συγκέντρωση του υποστρώματος. Για πολλές ενζυμικές αντιδράσεις, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται σε ένα προϊόν, το διάγραμμα μεταβολής της αρχικής ταχύτητας αντίδρασης (V_o), με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$, είναι μια ορθογώνια υπερβολή. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, ενώ αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας V_{max} . [4]

Όσο μικρότερη είναι η τιμή της K_m , τόσο μεγαλύτερη η συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος. Η V_{max} μας δείχνει πόσα μόρια υποστρώματος μετατρέπονται κάθε λεπτό από ένα μόριο ενζύμου.

Αν και το μοντέλο Michaelis-Menten περιγράφει τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων, υπάρχουν και αρκετά άλλα που δεν ακολουθούν το μοντέλο αυτό. Μία κατηγορία τέτοιων ενζύμων είναι τα αλλοστερικά ένζυμα, για τα οποία λόγω των πολλαπλών ενεργών κέντρων και υπομονάδων που έχουν, η σχέση της ταχύτητας με το υπόστρωμα είναι πολύ διαφορετική από αυτή των ενζύμων που ακολουθούν το μοντέλο Michaelis-Menten. Η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο συχνά επηρεάζει τις ιδιότητες άλλων ενεργών κέντρων. [7]

3.2. Ενζυμική αναστολή

Η ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να μειωθεί από διάφορους τύπους αναστολέων. Οι αναστολείς είναι ενώσεις που ενώνονται με το ένζυμο με τρόπο τέτοιο που ελαττώνουν την ικανότητά του να ενώνεται με το υπόστρωμα και να επιδρά σε αυτό. [68]

Αυτό ισχύει για τα περισσότερα ένζυμα και είναι ο κύριος μηχανισμός ελέγχου της δραστηριότητας των ενζύμων. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Η διαφορά βρίσκεται στην ταχύτητα διαχωρισμού του αναστολέα από το ένζυμο. Στην αντιστρεπτή αναστολή ο διαχωρισμός γίνεται γρήγορα, ενώ αντίθετα στην μη αντιστρεπτή αναστολή γίνεται αργά λόγω ισχυρής σύνδεσης του αναστολέα με το ένζυμο. [4, 7]

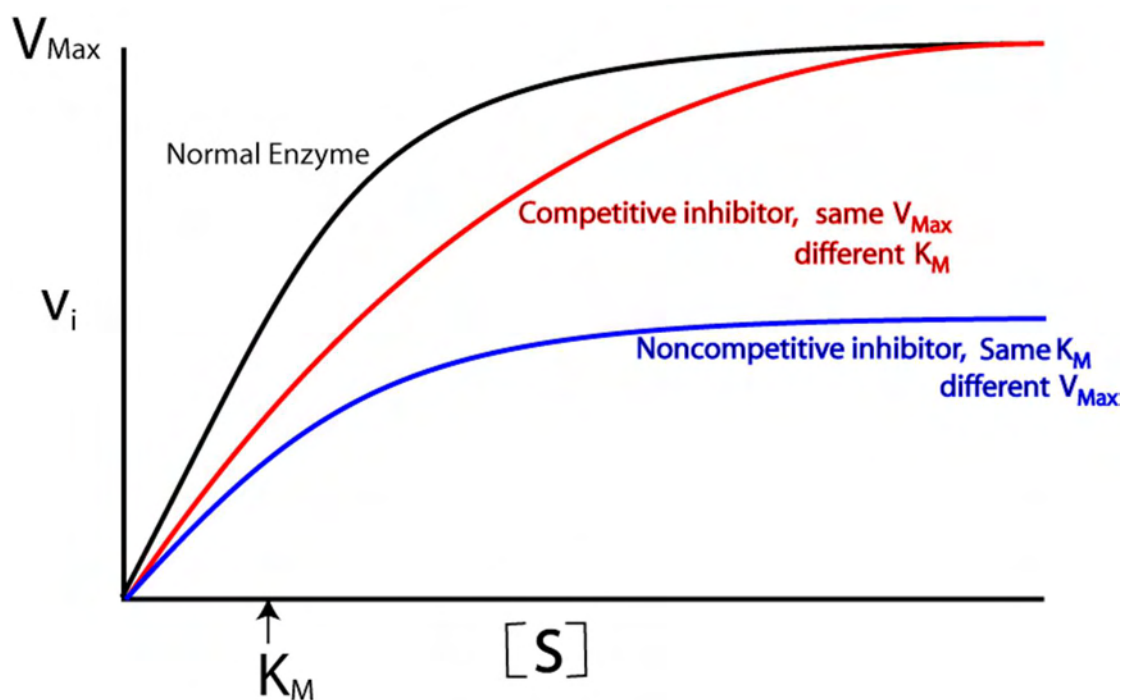
Στην ενζυμική κινητική υπάρχουν διάφορα είδη αντιστρεπτής αναστολής:

1) Η συναγωνιστική αναστολή, όπου το ένζυμο (E) μπορεί να προσδέσει το υπόστρωμα (ES) ή τον αναστολέα (EI), αλλά όχι και τα δύο μαζί (ESI). Εδώ η αναστολή γίνεται με ελάττωση της αναλογίας μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα, καθώς ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. [7]

2) Η μη συναγωνιστική αναστολή, όπου ένα μόριο ενζύμου μπορεί να προσδεθεί ταυτόχρονα στον αναστολέα και το υπόστρωμα σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης. Εδώ η αναστολή γίνεται με μείωση του αριθμού μετατροπής του ενζύμου, και όχι με τη μείωση της αναλογίας των μορίων ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Έτσι, η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. [7]

Εικόνα 14: Η κόκκινη γραμμή δείχνει την κινητική ενός Συναγωνιστικού αναστολέα και η μπλε γραμμή δείχνει την κινητική ενός Μη συναγωνιστικού αναστολέα. Στην πρώτη περίπτωση, με την αύξηση της συγκέντρωσης του αναστολέα πρέπει να αυξηθεί και η

συγκέντρωση του υποστρώματος για να επιτευχθεί μία μέγιστη ενζυμική ταχύτητα. Στη δεύτερη περίπτωση αντίθετα, ο μη συναγωνιστικός αναστολέας προσδένεται και στο ελεύθερο ένζυμο και στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και η ταχύτητα δεν μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή V_{max} , άσχετα με την αύξηση του υποστρώματος. [4]



Η πορεία της αντίδρασης στην περίπτωση ενός συναγωνιστικού αναστολέα υποδηλώνει πόσο υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να υπερνικηθεί η συναγωνιστική αναστολή. Η έκταση της συναγωνιστικής αναστολής εξαρτάται από:

- τη συγκέντρωση του υποστρώματος
- τη συγκέντρωση του αναστολέα
- τη συγγένεια του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ως προς τον αναστολέα. [4, 7]

Αντίθετα, στη μη συναγωνιστική αναστολή, το υπόστρωμα μπορεί να προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα. Όμως, το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Η τιμή της V_{max} ελαττώνεται σε μια νέα τιμή που ονομάζεται V_{app} ενώ δεν αλλάζει η τιμή της K_m . 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. Η έκταση της μη-συναγωνιστικής αναστολής εξαρτάται από:

- τη συγκέντρωση του αναστολέα
- τη συγγένεια του ενζύμου ως προς τον αναστολέα. [4, 7]

Συνολικά, τα είδη αναστολής είναι:

1. Συναγωνιστική αναστολή (non-competitive inhibition) στην οποία αντί ο αναστολέας να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ενζύμου, δηλαδή το ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή. [4, 7]
2. Μικτή αναστολή (mixed inhibition) σε αυτούς τους αναστολείς οι σταθερές διαστάσεως του S από το ES διαφέρουν με εκείνη του S από το EIS. [4, 7]
3. Ανταγωνιστική αναστολή (competitive inhibition) σε αυτή την περίπτωση αναστολής η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος. [4, 7]

Στη συναγωνιστική αναστολή, υπάρχει συναγωνισμός αναστολέα και υποστρώματος για το ενεργό κέντρο. Η σταθερά διάστασης για τον αναστολέα δίνεται από τη σχέση: $K_i = [E] \cdot [I] / [EI]$. Η αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί όταν υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση υποστρώματος. Έτσι, η φαινομενική τιμή της K_M μεταβάλλεται. Αυτή η τιμή της K_M δίνεται από τη σχέση: $K_{app} = K_m (1 + [I] / K_i)$

-[I] είναι η συγκέντρωση του αναστολέα

- K_i είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος .
Όταν αυξάνεται η τιμή $[I]$, αυξάνεται και η τιμή K_{app} . Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια V_{max} όταν υπάρχει ή δεν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΣ ΑΥΤΗΣ

Στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετηθεί η ανασταλτική επίδραση διάφορων εκχυλισμάτων φυτικής προέλευσης στη λειτουργία του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε φωσφορυλάση β του γλυκογόνου από μύες κουνελιού. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, το υπόστρωμα ήταν η 1-φωσφορική γλυκόζη (G1P). Αρχικά προετοιμάστηκε το ενζυμικό μίγμα που αποτελούνταν από φωσφορυλάση β του γλυκογόνου, γλυκογόνο, AMP και νερό.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου **Glycogen_(n)**, προς **Glycogen_(n-1)** και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης **glucose-1-P**.



4.1. Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

4.1.1. Προσδιορισμός 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 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την παραπάνω αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου.

Παρουσία φωσφορικών ιόντων δηλαδή, το γλυκογόνο αποδομείται και παράγεται γλυκογόνο με λιγότερα κατάλοιπα ενώ παράλληλα απελευθερώνεται 1-φωσφορική γλυκόζη. Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η αντίδραση προς την αντίθετη κατεύθυνση, δηλαδή

αυτή της σύνθεσης του γλυκογόνου. Μόρια G-1-P προστίθενται στο γλυκογόνο και γίνεται απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων (P_i) τα οποία προσδιορίζονται ποσοτικά με φασματοφωτομετρία.

Λαμβάνουμε το ένζυμο από τη γλυκερόλη όπου είναι αποθηκευμένο και το αραιώνουμε λαμβάνοντας ένα εναιώρημα του ενζύμου το οποίο περιέχει 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μείγμα που περιέχει: 15 μg ενζύμου/ mL , γλυκογόνο 10 % (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσεως ένζυμου 5% (v/v). [Το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελείται από: 50 mM β -φωσφορική γλυκερόλη που είναι ρυθμιστής του pH, 50 mM EDTA που αποτελεί χηλικό παράγοντα και είναι δεσμευτής ιόντων Mg και 1 mM β -Μερκαπτεθανόλη που βοηθάει στη σωστή διαμόρφωση του ενζύμου].

Επίσης, σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α -D-Glc-1-P 2.0 mM με προσθήκη 200 μL υποστρώματος α -D-Glc-1-P 9.0 mM, 18 μL AMP 50 mM και 502 μL H_2O .

Το ενζυμικό μείγμα τοποθετείται για επώαση σε θερμοκρασία 30 $^\circ\text{C}$ επί 15 λεπτά και τα υποστρώματα επί περίπου 3 λεπτά. Στη συνέχεια, για την εκκίνηση της αντίδρασης σε όλους τους σωλήνες των υποστρωμάτων σταδιακά προστίθενται 180 μL ενζυμικού μίγματος.

Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, έχουμε: 3.0 μg ένζυμο/ mL , AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 10 % (w/v), υπόστρωμα α -D-Glc-1-P 2.0 mM. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30 $^\circ\text{C}$ και το pH 6.8. Κάθε ένα λεπτό λαμβάνονται 200 μL από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1.0% (w/v) (απορρυπαντικό που αποδιατάσσει το ένζυμο φωσφορύνοντας το γλυκογόνο σταματώντας τη δράση του).

Τέλος, γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός του φωσφόρου στα δείγματα. Εκτός από τα παραπάνω 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.

4.1.2. Προσδιορισμός σταθεράς K_m (Michaelis-Menten)

Η σταθερά Michaelis-Menten (K_m , mol) αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα. Είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης (V_{max}). Το ένζυμο μελετάται παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (α -D- Glc-1-P) ώστε να γίνει ο προσδιορισμός της σταθεράς K_m . 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 απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων (Pi).

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25 μ g ενζύμου/mL, γλυκογόνο 10 % (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου. Σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων παρασκευάζονται επίσης όλα τα διαλύματα υποστρωμάτων α -D-Glc-1-P 2.0, 4.0, 6.0, 10 και 20 mM, με προσθήκη 200 μ L από το αντίστοιχο υπόστρωμα G1P (9.0-18-27-45-90 mM), 18 μ L AMP 50 mM, 18 μ L DMSO (100%), 484 μ L H₂O. Το ενζυμικό μείγμα τοποθετείται για επώαση στους 30 °C επί 15 λεπτά και τα υποστρώματα για περίπου 3 λεπτά. Στη συνέχεια, για την εκκίνηση της αντίδρασης σε όλους τους σωλήνες των υποστρωμάτων σταδιακά προστίθενται 180 μ L ενζυμικού μίγματος. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση, έχουμε: 5.0 μ g ένζυμο/mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 2 % (w/v), υποστρώματα α -D- Glc-1-P από 2.0 έως 20 mM. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30 °C και το pH 6.8. Κάθε ένα λεπτό (σε χρόνους 1',2',3',4') λαμβάνονται δείγματα των 200 μ L από το μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μ L SDS 1.0 % (w/v). Στα δείγματα γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) με την μέθοδο που περιγράφεται παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά, όπως α -D- Glc-1-P (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών ιόντων).

4.1.3. Προσδιορισμός IC 50 αναστολέα

Η σταθερά IC_{50} (half maximal inhibitory concentration (IC_{50})) ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Η ποσότητα εκφράζεται συνήθως ως μοριακή συγκέντρωση. Για τον προσδιορισμό της αρχικά γίνεται κινητική μελέτη του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση G1P.

Παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης η ταχύτητα σύνθεσης του γλυκογόνου ελαττώνεται. Το ίδιο συμβαίνει κατά συνέπεια και με την απελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων. Με τη σύνδεση τους αυτή εμποδίζουν τη σύνδεση του υποστρώματος και τη δράση του ενζύμου, αφού ο αναστολέας παίζει κατά κάποιο τρόπο το ρόλο του υποστρώματος, υποκαθιστώντας το. Γίνεται δηλαδή μία πλήρως ανταγωνιστική αναστολή που εμποδίζει το σχηματισμό συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Υλικά:

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

Όργανα:

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

4.1.3.1. Παρασκευή διαλύματος GPb

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε γλυκερόλη παίρνουμε 10 μL και το αραιώνουμε σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκεντρώσεως της GPb, με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής $b=1\text{cm}$ (ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ενζύμου είναι 1.32). Έπειτα, παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα το οποίο περιέχει 15 $\mu\text{g/mL}$ GPb, γλυκογόνο 10% w/v, και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 5% v/v, έτσι ώστε με την προσθήκη του διαλύματος με το υπόστρωμα η αντίδραση να λαμβάνει χώρα στις εξής συνθήκες: ένζυμο 5.0 $\mu\text{g/mL}$, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 2 % w/v και υπόστρωμα $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ σταθερής συγκέντρωσης και αναστολέα μεταβαλλόμενης. Στη συνέχεια το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση 15 min σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 30 °C.

4.1.3.2. Παρασκευή διαλύματος υποστρωμάτων

Για τον υπολογισμό της IC_{50} παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα σε σταθερή συγκέντρωση $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ 9 mM και AMP 50 mM ώστε μετά την προσθήκη του ενζυμικού

διαλύματος 180 μL η συγκέντρωση της $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ να είναι 2 mM και της AMP 1 mM. Για την διαλυτοποίηση των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ο οργανικός διαλύτης DMSO (Dimethyl Sulfoxide). Τα εκχυλίσματα διαλυτοποιήθηκαν σε 100% (v/v) DMSO ενώ η τελική συγκέντρωση του διαλύτη στην αντίδραση τελικά ήταν 2 % (v/v). Σε κάθε σειρά πειραμάτων παρασκευάζεται και ένα πείραμα ελέγχου (control) το οποίο δεν περιέχει αναστολέα.

Μετά την παρασκευή και επώαση του ενζυμικού διαλύματος καθώς και των διαλυμάτων του υποστρώματος με τη διαδικασία που αναφέρθηκε, μεταφέρονται 36 μL από το ενζυμικό διάλυμα σε κάθε διάλυμα υποστρώματος όγκου 144 μL με τη σειρά, έτσι ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια, ανά 1 λεπτό λαμβάνονται και μεταφέρονται 200 μL από το διάλυμα του ενζύμου-υποστρώματος στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1%. Στη συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί, προστίθενται από 2.5 mL διάλυμα ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά στους 30 °C και μετά ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των φωσφορικών ιόντων (P_i), που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου και σε τυφλά, όπως $\alpha\text{-D-Glc-1-P}$ (λόγω της φυσικής υδρόλυσης) και γλυκογόνου (λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών). Στη συνέχεια ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit, προκειμένου να προσδιοριστεί η IC_{50} .

4.1.3.3. Προσδιορισμός φωσφορικών - φωτομέτρηση

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 γλυκογό-

νου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου.

4.2. Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη φωτομέτρηση βασίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου, αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1) Αντιδραστήριο μολυβδαινίου, με ρύθμιση pH 5.0. Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με HCl 1N.

2) Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), με ρύθμιση pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται με NaOH 10N. Στη συνέχεια αναμιγνύουμε τα διαλύματα με αναλογία όγκων 4:1 (4 όγκους αντιδραστηρίου μολυβδαινικού και 1 όγκο ασκορβικού). Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φώς και χρησιμοποιείται μετά από 15 min μετά την παρασκευή του και όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα.

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 2,5 mL από το παραπάνω αντιδραστήριο χρώσης. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30° C για 15 min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Πέραν αυτών, γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών.

4.3. Παρασκευή τυφλών

Επειδή 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,

πρέπει να διορθωθούν οι απορροφήσεις που οφείλονται στην παρουσία ορθοφωσφορικών ιόντων που δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν 1 τυφλό H₂O για τον μηδενισμό του φωτομέτρου, 2 τυφλά με την συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P λόγω της φυσικής υδρόλυσης της, 2 τυφλά ενζυμικού διαλύματος λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών και 2 πρότυπα διαλύματα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του οποίου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε μmol Pi.

4.4. Επεξεργασία δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων μετά από διόρθωση (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της G1P και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό διάλυμα) μετατρέπονται σε μmol φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα. Η ειδική δραστηριότητα (specific activity) αποτελεί έκφραση της ποσότητας αλλά και της δραστηριότητας ενός ενζύμου και ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1μmol υποστρώματος ή παραγωγή 1 μmol προϊόντος ανά λεπτό κάτω από ορισμένες συνθήκες. Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit, εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα ‘simpleweighting’). Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων είναι η εξής:

$$V = \{1/t\} * \ln (\acute{\omicron}\rho\iota\omicron/\acute{\omicron}\rho\iota\omicron - \mu\text{molPi}) * \acute{\omicron}\rho\iota\omicron/\text{mg ενζύμου}$$

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 δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων (ετεροσκεδαστικότητα ‘explicit weighting’). Στην περίπτωση αυτή το πρόγραμμα υπολογίζει τις παραμέτρους V_{max} και K_m και το τυπικό τους σφάλμα. Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten με την προϋπόθεση σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος.

$$1/V = 1/ V_{max} + \{(K_m/V_{max}) * (1/S)\}$$



Όπου:

v : Η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης.

V_{max} : Η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

$[S]$: Η συγκέντρωση του υποστρώματος.

E : Το ένζυμο

S : Το υπόστρωμα

ES : Το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος

P : Το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten (K_m , mol) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten, $V=V_{max}[S]/K_m + [S]$

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} . 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:

$$\% \text{ Αναστολή} = \{(s.a.control - s.a.i)/s.a.control\} \times 100\%$$

Όπου:

s.a.control: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

s.a.i: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία *i* συγκεντρώσεως αναστολέα

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC50 θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC50 προκύπτει από το διάγραμμα % αναστολή=f([I]). Από την τιμή της IC50 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: $IC50 = \{1 + (S/K_m)\} \times K_i$

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

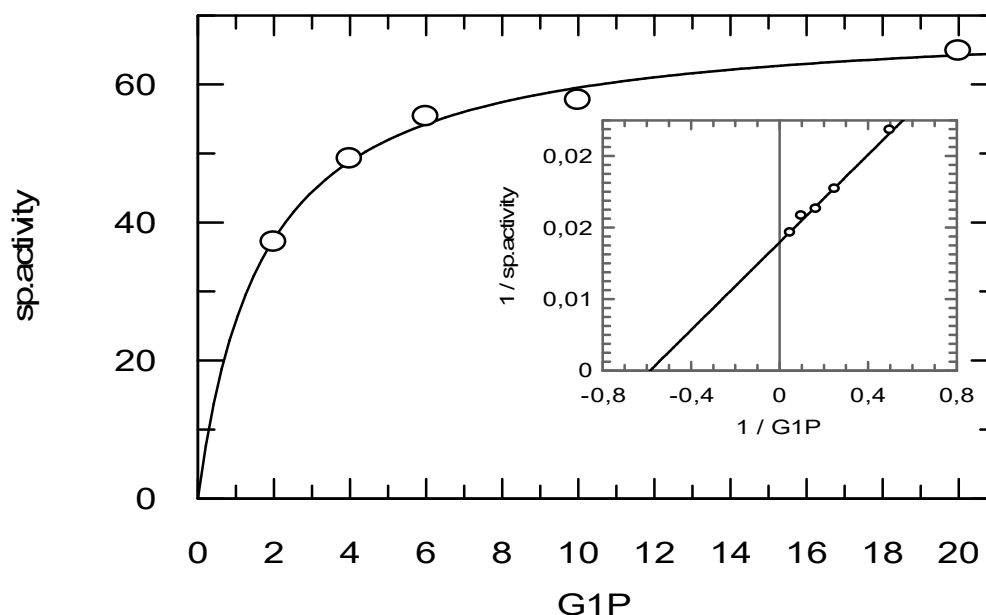
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

5.1.1. Αποτελέσματα κινητικής μελέτης φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

Η σταθερά Michaelis – Menten (K_m) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-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 2.5 mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της K_m . Οι κινητικές παράμετροι του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: **$K_m = 1,71 \pm 0,16 \text{ mM}$** , και **$V_{max} = 69,71 \pm 1,53 \text{ } \mu\text{mol/mg/min}$** . Στην εικόνα παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, μmol φωσφορικών/min/mg ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G-1-P).

Εικόνα 15: Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *b* σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος G-1-P (2, 4, 6, 10, 20 mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου.



5.1.2. Αποτελέσματα κινητικής μελέτης των εκχυλισμάτων *Prunus Webbii* & *Potentilla Recta*

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων αναστολέων και IC₅₀

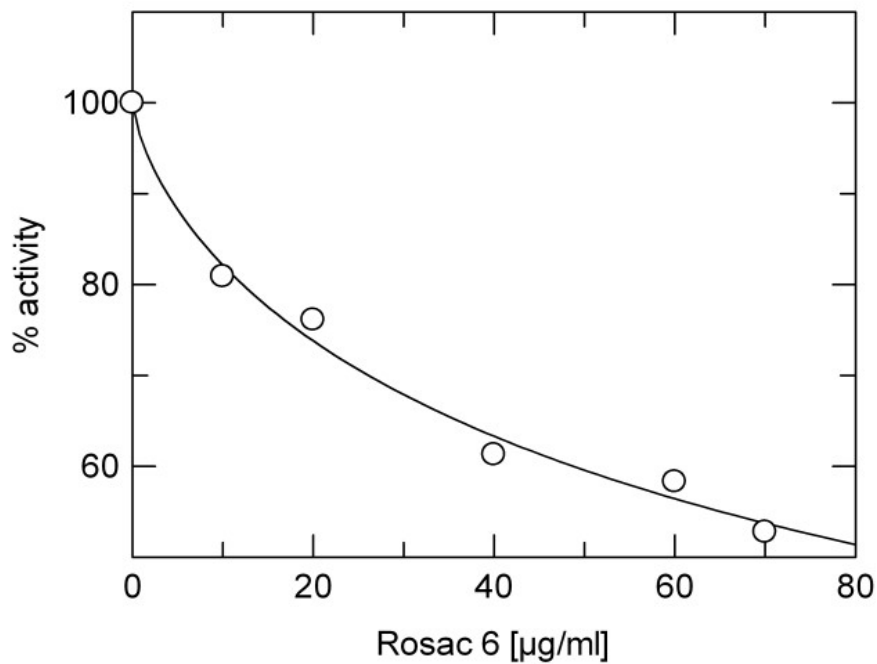
Inhibitor	Συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (μg/mL)	IC ₅₀ (μg/mL)
Prunus Webbii	10, 20, 40, 60, 70	86,5 ± 7,9
Potentilla Recta	8, 20, 35, 70	48,7 ± 2,3

Πίνακας 2: IC₅₀ Αναστολέα *Prunus Webbii* (*Rosaceae* 6).

Extract [μg/mL]	% activity
0	100
10	80,8652
20	76,0930

40	61,2750
60	58,2970
70	52,7570
$IC_{50}: 86,5 \pm 7,9 \mu\text{g/mL}$	

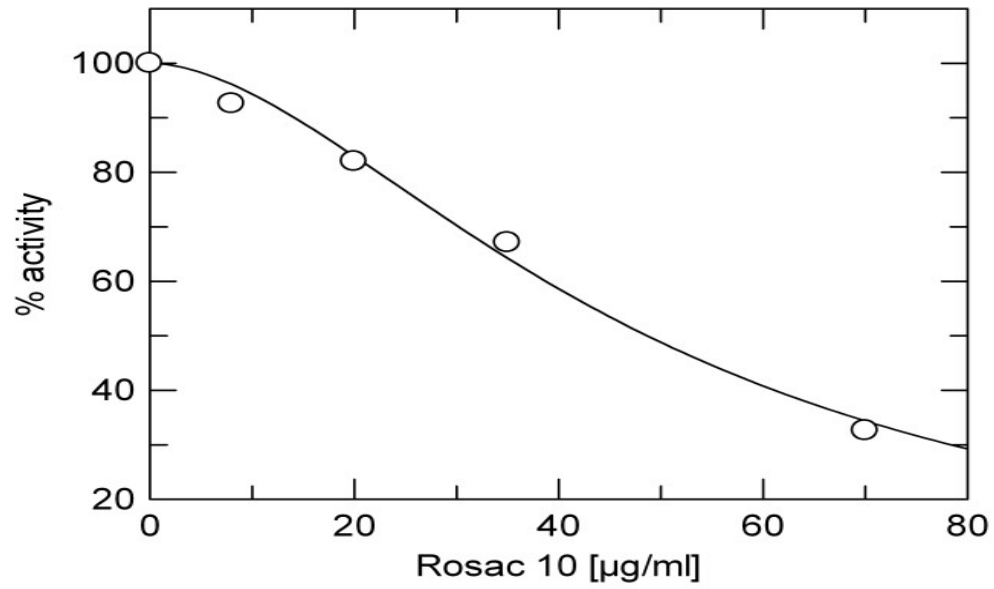
Εικόνα 16: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος *Prunus Webbii*.



Πίνακας 3: IC_{50} αναστολέα *Potentilla recta* (Rosaceae 10).

Extract [μg/mL]	% activity
0	100
8	92,5796
20	81,9658
35	67,1123
70	32,6247
$IC_{50}: 48,7 \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$	

Εικόνα 17: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος *Potentilla Recta*.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που γίνεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σχετικά με την αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων που προέρχονται από διάφορες ποικιλίες φυτών. Η αναστολή αφορά κυρίως τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η οποία είναι ένα ένζυμο που αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με υπογλυκαιμική δράση για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2, μιας και είναι το βασικό ένζυμο που συμμετέχει στη διάσπαση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης από αυτό.

Στην εργασία πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη για τον προσδιορισμό της IC_{50} των εκχυλισμάτων των φυτών *Prunus Webbii* και *Potentilla Recta* της οικογένειας Rosaceae, προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου *in vitro*. Τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης έδειξαν ότι ο αναστολέας από εκχύλισμα *Prunus Webbii* έχει μέτρια ανασταλτική επίδραση στη φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (GPb) με την IC_{50} να είναι $86,5 \pm 7,9$ $\mu\text{g/mL}$, ενώ ο αναστολέας από εκχύλισμα *Potentilla Recta* έχει καλύτερη μεν, αλλά επίσης μέτρια ανασταλτική επίδραση, με την IC_{50} να είναι $48,7 \pm 2,3$ $\mu\text{g/mL}$. Οι IC_{50} και των δύο εκχυλισμάτων είναι μεγαλύτερες του 10 $\mu\text{g/mL}$, επομένως η ανασταλτική δράση δεν θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική. [14]

Ωστόσο, η ανασταλτική ισχύς των ουσιών που προκαλούν την αναστολή θα αξιολογηθεί όταν ταυτοποιηθούν και γίνει γνωστό σε τι συγκέντρωση βρίσκονται μέσα στα εκχυλίσματα, κατόπιν κρυσταλλογραφικής μελέτης. Η κρυσταλλογραφική μελέτη θα δείξει επίσης σε ποιά από τα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου προσδέονται οι ουσίες, καθώς και το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσεται μεταξύ της πρωτεΐνης και των ουσιών έτσι ώστε να δοθεί μια δομική εξήγηση της αναστολής και να μπορέσουμε να σχεδιάσουμε ενώσεις υψηλής συγγενείας και υψηλής ρυθμιστικής ικανότητας στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Εκκρεμεί επίσης μελέτη της ανασταλτικής δράσης τους και σε κυτταρικό επίπεδο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Desvergne, B., Michalik, L. and Wahli, W., Transcriptional Regulation of Metabolism *Physiol. Rev.* 86: 465-514, 2006, 2006, 86, 465-514.
- 2) Niswender, K.D. and Schwartz, M.W., Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities, *Front Neuroendocrinol*, 2003, 24, 1-10.
- 3) American Diabetes Association, Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus
- 4) Stryer L., J.M. Berg, J.L.Tymoczko 2012, Βιοχημεία, Έκδοση 5η , Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
- 5) Laura J. Hampson and Lorraine Agius, Increased Potency and Efficacy of Combined Phosphorylase Inactivation and Glucokinase Activation in Control of Hepatocyte Glycogen Metabolism
- 6) Nikos G Oikonomakos, Vicky T Skamnaki1, Katerina E Tsitsanou, Nikos G Gavalas and Louise N Johnson, A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions 0969-2126/00
- 7) Stryer L (2007) : Βιοχημεία, Τόμος I, Έκδοση 3η, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
- 8) Christine M. Lukacs, Nikos G. Oikonomakos, Robert L. Crowther, Li-Na Hong, R. Ursula Kammlott, Wayne Levin, Shirley Li, Chao-Min Liu, Debra Lucas-McGady, Sherrie Pietranico and Linda Reik, The Crystal Structure of Human Muscle Glycogen Phosphorylase a with Bound Glucose and AMP: An Intermediate Conformation with T-State and R-State Features

- 9) Oikonomakos, N. G., 2002, Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy.
- 10) Nikos G Oikonomakos & László Somsák, Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design Current Opinion in Investigational Drugs 2008
- 11) Parmenopoulou Vanessa, Kantsadi Anastassia L., Tsirkone Vicky G., Chatzileontiadiou Demetra S.M., Manta Stella, Zographos Spyros E., Mol feta Christina, Archontis Georgios, Agius Lorraine et al (2014), Structure based inhibitor design targeting glycogen phosphorylase b. Virtual screening, synthesis, biochemical and biological assessment of novel N-acyl- β -d-glucopyranosylamines
- 12) Grover and Yadav, 2004
- 13) J. L. Martin, K. Veluraja, K. Ross, L. N. Johnson, G. W. J. Fleet, N. G. Ramsden, I. Bruce, M. G. Orchard, N. G. Oikonomakos, A. C. Papageorgiou, D.D. Leonidas and H.S. Tsitoura, Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylase: the design of potential drugs for diabetes
- 14) Anastassia L. Kantsadi, Vanessa Parmenopoulou, Dimitar N. Bakalov, Laura Snelgrove, George A. Stravodimos, Demetra S.M. Chatzileontiadiou, Stella Manta, Angeliki Panagiotopoulou, Joseph M. Hayes, Dimitri Komiotis, Demetres D. Leonidas, Glycogen Phosphorylase as a Target for Type 2 Diabetes: Synthetic, Biochemical, Structural and Computational Evaluation of Novel N-acyl-N'-(β -D-glucopyranosyl) Urea Inhibitors
- 15) Kyriakis E, Stravodimos G.A., Kantsadi A.L., Chatzileontiadiou D.S., Skamnaki V.T., Leonidas D.D., Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b.
- 16) Marshal W.,(2000) : Κλινική Βιοχημεία, Έκδοση 3η, ιατρικές εκδόσεις Λίτσας
- 17) <http://el.wikipedia.org>

- 18) Chapter 3: Calculation of the Energy Content of Foods – Energy Conversion Factors, Food energy – methods of analysis and conversion factors, FAO Food and Nutrition Paper 77, Rome: Food and Agriculture Organization, 2003
- 19) Bonadonna Riccardo C, Bonora Enzo, Del Prato Stefano, Saccomani Maria, Cobelli Claudio, Natali Andrea, Frascerra Silvia, Pecori Neda, Ferrannini Eleuterio, Bier Dennis, DeFronzo Ralph A, Gulli Giovanni (July 1996). "Roles of glucose transport and glucose phosphorylation in muscle insulin resistance of NIDDM" (PDF). *Diabetes*. 45 (7): 915–25.
- 20) Barford D, Hu SH, Johnson LN: Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP. *J Mol Biol*. 1991
- 21) Fletterick RJ, Sprang SR: Glycogen phosphorylase Structures and function. *Accounts of Chemical Research*. 1982 Nov.
- 22) Malviya N, Jain S, Malviya S., Antidiabetic potential of medicinal plants. *Acta Pol Pharm*. 2010
- 23) Jung M, Park M, Lee HC, Kang YH, Kang ES, Kim SK., Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr Med Chem*. 2006
- 24) Chang, X., Jorgensen, A.M., Bardrum, P., Led, J.J.
- 25) Endocrine.gr
- 26) Wanzhu Jin, Mary-Elizabeth Patti, clinical science, December 15, 2008
- 27) Kahn CR, Weir GC (2005). *Joslin's Diabetes Mellitus* (14th ed.)
- 28) Steiner DF, Oyer PE (February 1967). "The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 57 (2): 473–80.
- 29) Creighton TE (1993). *Proteins: Structures and Molecular Properties* (2nd ed.). W H Freeman and Company. pp. 81–83.
- 30) Najjar S (2001). "Insulin Action: Molecular Basis of Diabetes". *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons.

- 31) Handbook of Diabetes, 4th Edition.
- 32) Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA (August 2011).
- 33) Woods S.C. et al., 2006
- 34) Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009
- 35) Stryer L (1995). Biochemistry (Fourth ed.)
- 36) Koeslag JH, Saunders PT, Terblanche E (June 2003)
- 37) Sonksen P, Sonksen J (July 2000)
- 38) Guyton & Hall, 11^η έκδοση.
- 39) Voet D, Voet JG. (2011).
- 40) Reece J, Campbell N (2002).
- 41) Orsay J (2014).
- 42) Jones BJ, Tan T, Bloom SR (March 2012).
- 43) Principles of Biochemistry, 4/e, 2006, Pearson Prentice Hall, Inc.
- 44) Nelson, D. (2013)
- 45) Γεωργατσός Γ. Ιωάννης, Κυριακίδης Α. Δημήτριος, Γιουψάνης Α. Τραϊανός, Ενζυμολογία, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, Νοέμβριος 2001.
- 46) William H. Martin, Dennis J. Hoover, Sandra J. Armento, Igrid A. Stock, R.Kirk McPherson, Dennis E. Danley, Ralph W. Stevenson, Eugene J. Barretti, and Judith L. Treadway Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 95, pp. 1776–1781, February 1998.
- 47) Barford & Johnson, 1989.
- 48) Oikonomakos N.G., 2000.
- 49) Oikonomakos et al., 1992.
- 50) Leonidas et al., 1990.

- 51) Stryer, 1997.
- 52) "The Plant List: Rosaceae". Royal Botanic Gardens, Kew and Missouri Botanic Garden.
- 53) Christenhusz, M. J. M. & Byng, J. W. (2016).
- 54) Bortiri, E.; Oh, S.-H.; Jiang, J.; Baggett, S.; Granger, A.; Weeks, C.; Buckingham, M.; Potter, D.; Parfitt, D.E. (2001).
- 55) Watson, L.; Dallwitz, M.J. (1992).
- 56) USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network]. [Kell, S.P. 2011. *Prunus webbii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011.
- 57) US Forest Service Fire Ecology], ["*Potentilla recta*". Natural Resources Conservation Service PLANTS Database. USDA. Retrieved 13 October 2015.
- 58) US Forest Service Fire Ecology
- 59) Sulphur cinquefoil: "*Potentilla recta*". NatureGate
- 60) Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2002).
- 61) Murphy JM, Farhan H, Eyers PA (2017).
- 62) Schomburg I, Chang A, Placzek S, Söhngen C, Rother M, Lang M, Munaretto C, Ulas S, Stelzer M, Grote A, Scheer M, Schomburg D (January 2013).
- 63) Michaelis L, Menten M (1913). "Die Kinetik der Invertinwirkung" [The Kinetics of Invertase Action].
- 64) Briggs GE, Haldane JB (1925). "A Note on the Kinetics of Enzyme Action".
- 65) *IDF, 2017*.
- 66) Monod et al.,1965.

67) Cohen 1973, Cohen 1983.

68) Cornish-Bowden A (2004)

69) Kantsadi et. al., 2014.