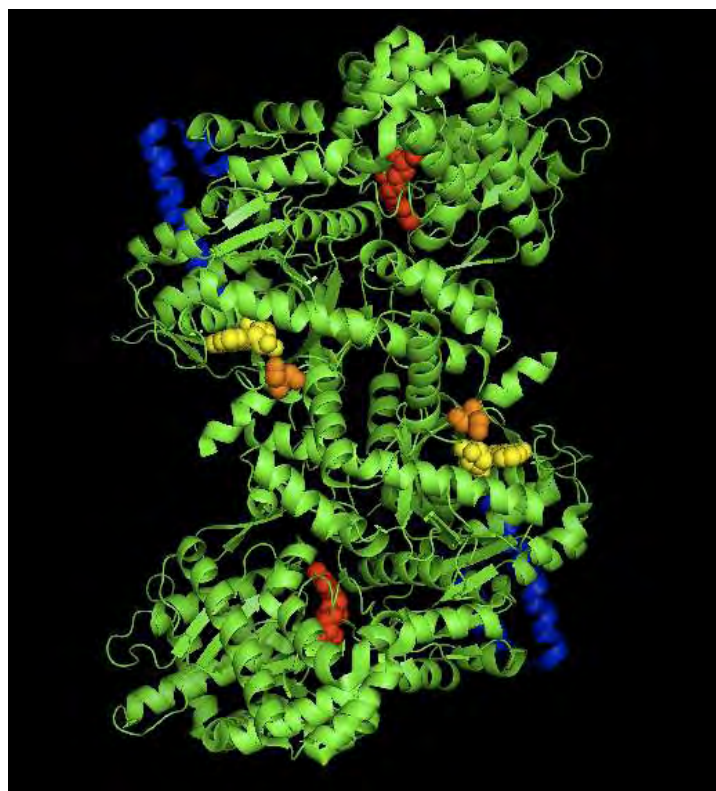




ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΡΟΔΙΟΥ *PUNICA
GRANATUM* ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**



ΓΚΑΤΖΩΝΑ ΠΑΓΩΝΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2016

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

**ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΡΟΔΙΟΥ *PUNICA GRANATUM*
ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

**ASSESSMENT OF INHIBITORY ACTIVITY FROM POLYPHAINOLIC
EXTRACTS FROM PUNICA GRATANUM AT GLYCOGEN PHOSPHORYLASE**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

- Δρ Λεωνίδας Δ. Δημήτριος (επιβλέπων)
Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Δρ Ψαρρά Άννα – Μαρία
Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική
Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περίληψη

Ο σακχαρώδης διαβήτης, μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές, εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δε διατηρούνται σταθερά. Με σκοπό την αντιμετώπιση της παθολογικής αυτής κατάστασης, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για την ανακάλυψη νέων εν δυνάμει αντι-υπεργλυκαιμικών παραγόντων. Προς αυτήν την κατεύθυνση, το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για την ανακάλυψη νέων αντί-υπεργλυκαιμικών παραγόντων.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η μελέτη της αναστολής ενός ενζύμου που σχετίζεται με την αποικοδόμηση του γλυκογόνου στον οργανισμό, της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από πολυφαινολικά εκχυλίσματα ροδιού. Αρχικά απομονώθηκε το ένζυμο από σκελετικούς μύες κουνελιού και στη συνέχεια μελετήθηκε με κινητικά πειράματα η επίδραση των εκχυλισμάτων παραπροϊόντων βιομηχανικής παραγωγής χυμών ροδιού στην ενζυμική δραστηριότητα. Η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου και έδειξε ότι τα εκχυλίσματα αυτά προκαλούν μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% σε σημαντικά χαμηλές συγκεντρώσεις.

Abstract

Diabetes mellitus, one of the most important metabolic disorders is characterized by elevated blood glucose levels. With the aim to discover new anti-hyperglycemic agents for this pathological condition, enzymes and substrates involved in glucose homeostasis are used as molecular targets. Glycogen phosphorylase is key enzyme in glycogen metabolism and a validated molecular target for the discovery of novel anti-hyperglycemic agents.

In this work we present the assessment of polyphenolic extracts from the pomegranate industrial juicing process on glycogen phosphorylase activity. The enzyme was purified from rabbit skeletal muscle and the effect of the extracts on the enzymatic activity was studied by kinetic experiments. Kinetic studies, performed in the direction of glycogen synthesis, showed that these extracts reduced the enzyme activity to 50% at significantly low concentrations.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Δρ Δημήτρη Λεωνίδα Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου. Η επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας, υπήρξε πολύτιμη. Χωρίς την παρουσία, την υποστήριξη και την ανεκτικότητα κάποιων ανθρώπων δεν θα ήταν δυνατή η υλοποίηση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας. Σε μια πράξη αναγνώρισης της συνεισφοράς του στην περάτωση της εργασίας, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Στραβοδήμο, για τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου μετέδωσε σε θεωρητικό επίπεδο αλλά και κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης του πειραματικού μέρους, καθώς και για τη στήριξή του.

Επίσης, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς και όλους όσους συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

Τέλος, Θα ήθελα να εκφράσω επίσης τις ευχαριστίες μου στον καθ. Σ. Χαρουτουιάν και το εργαστήριο του στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών για την προσφορά των εκχυλισμάτων του ροδιού, *Punica granatum*.

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract.....	4
1. Εισαγωγή	
1.1 Σακχαρώδης διαβήτης.....	8
1.2 Τύποι Σακχαρώδους διαβήτη.....	9
1.3 Αντιμετώπιση.....	10
1.4 Ομοιόσταση της γλυκόζης και ο ρόλος της ινσουλίνης	10
1.5 Το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης – ινσουλίνης.....	11
1.6 Μηχανισμός δράσης ινσουλίνης και γλυκαγόνης στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος.....	13
2. Γενικά	
2.1 Γλυκόζη.....	14
2.2 Γλυκογόνο.....	15
2.2.1. Αποικοδόμηση του γλυκογόνου	16
2.2.2.Ρόλος της PLP	17
2.3. Φωσφορυλάση του γλυκογόνου.....	19
2.3.1. Δομή	20
2.3.2. Μυϊκή φωσφορυλάση.....	21
2.3.3. Ηπατική φωσφορυλάση.....	23
2.4. Αναστολείς φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	24
2.5. Χρήση εκχυλισμάτων ροδιού ως αναστολείς.....	25
3. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων	
3.1. Αρχές ενζυμικής κινητικής.....	26
3.2. Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων.....	29
4. Σκοπός εργασίας	32
5. Υλικά και μέθοδοι	
5.1.Απομόνωση της φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού.....	33
5.2.Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου.....	35
5.2.1.Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb.....	35
5.2.2. Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis Menten (Km).....	36
5.2.3. Προσδιορισμός IC50 αναστολέα.....	37
5.2.4. Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου.....	38
5.2.5.Διαλυτοποίηση παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού σε διάλυμα DMSO.....	38
5.2.6. Παρασκευή διαλυμάτων για τον προσδιορισμό φωσφόρου.....	39

5.2.7. Πειραματική διαδικασία	39
5.2.8. Προσδιορισμός φωσφόρου	40
5.2.9. Παρασκευή τυφλών.....	40
6. Αποτελέσματα.....	42
6.1. Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου (GPb).....	42
6.2. Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων.....	42
6.2.1. Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου.....	42
6.2.2. Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων επεξεργασίας ροδιού.....	43
7. Συμπεράσματα	48
8. Βιβλιογραφία	49

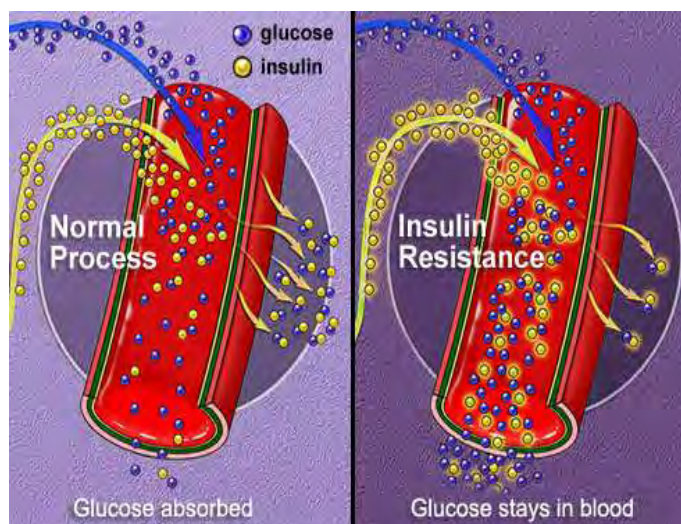
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι η πιο κοινή σοβαρή μεταβολική ασθένεια στον κόσμο και προσβάλλει εκατοντάδες εκατομμυρίων ανθρώπων. Πρόκειται για μια πάθηση κατά την οποία η γλυκόζη υπερπαράγεται από το ήπαρ και χρησιμοποιείται σε μικρότερη έκταση από τα άλλα όργανα [Stryer, 2012]. Χαρακτηρίζεται από μια τάση για χρόνια υπεργλυκαιμία με διαταραχές στο μεταβολισμό υδατανθράκων, των λιπών και των πρωτεϊνών που οφείλονται σε ελαττωματική έκκριση ή δράση της ινσουλίνης ή και των δυο [Marshall, 2011].

Τα συμπτώματα της πάθησης αυτής είναι η συχνουρία και αυξημένη αίσθηση δίψας και πείνας. Στους νεφρούς η διηθημένη γλυκόζη απορροφάται κανονικά στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια αλλά σε συγκεντρώσεις αίματος πάνω από 10 mM η επαναρρόφηση κορέννυται και εμφανίζεται γλυκόζη στα ούρα. Η γλυκοζουρία προκαλεί ωσμωτική διούρηση, αυξάνοντας την απέκκριση ύδατος καθώς και την ωσμωμοριακότητα του πλάσματος, που στη συνέχεια διεγείρει το κέντρο της δίψας. Η ωσμωτική διούρηση και η δίψα προκαλούν τα κλασικά συμπτώματα της πολουρίας και πολυδιψίας [Marshall, 2011].

Αν δεν αντιμετωπιστούν, οι μεταβολικές ανωμαλίες μπορεί να γίνουν πολύ έντονες, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη καταστάσεων επικίνδυνων για τη ζωή όπως κετοξέωση, μη κετονική υπεργλυκαιμία και η γαλακτική οξέωση [Marshall, 2011].



Εικόνα 1 : Παρουσίαση της συσσώρευσης γλυκόζης στο αίμα στη κατάσταση του ΣΔ τύπου 2. (<http://www.webmd.com/diabetes/ss/slideshow-type-2-diabetes-overview>)

1.2 Τύποι σακχαρώδους διαβήτη

Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 1

Ο διαβήτης τύπου 1 ή ινσουλινοεξαρτώμενος προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος που παράγουν ινσουλίνη και συνήθως εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 20 ετών (νεανικός διαβήτης) [Stryer, 2012]. Συνήθως οφείλεται σε γενετική προδιάθεση σε συνδυασμό με μετέπειτα συμβολή του περιβάλλοντος [Thompson and Thompson, 2011]. Το πάσχον άτομο χρειάζεται ινσουλίνη για να ζήσει καθώς από τον οργανισμό τους απουσιάζει η ινσουλίνη με συνέπεια η γλυκαγόνη να βρίσκεται σε επίπεδο υψηλότερο του φυσιολογικού. Επειδή υπάρχει ανεπάρκεια ινσουλίνης παρεμποδίζεται η είσοδος γλυκόζης στα κύτταρα. Το ήπαρ παραμένει παγιδευμένο σε κατάσταση γλυκονεογένεσης και κετογένεσης [Stryer L et al, 2012].

Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2

Ο διαβήτης τύπου 2 ή μη ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης αφορά το 90% των περιπτώσεων και συνήθως εμφανίζεται σε παχύσαρκους μεσήλικους [Stryer L et al, 2012]. Αυτός ο τύπος διαβήτη προκαλείται από διαταραχή στην έκκριση ινσουλίνης και αντίδραση στη δράση της ινσουλίνης [Thompson and Thompson, 2011]. Τα ακριβή αίτια εμφάνισης δεν είναι γνωστά αν και φαίνεται να παίζει ρόλο η κληρονομικότητα. Σε αποδεδειγμένες περιπτώσεις συνήθως συνυπάρχουν δυσλειτουργία των β-κυττάρων με ανεπαρκή απόκριση ινσουλίνης σε υπεργλυκαιμία και αντίσταση σε ινσουλίνη αλλά δεν είναι σαφές ποια είναι η πρωτογενής ανωμαλία. Η πάθηση αυτή υπόκειται σε ισχυρή οικογενή επίδραση. Ο βαθμός συμφωνίας σε μονοζυγωτικά δίδυμα είναι μεγαλύτερος του 90% , ενώ ο κίνδυνος ατόμου να προσβληθεί από διαβήτη είναι >50% όταν και οι δυο γονείς έχουν την ασθένεια. Περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι επίσης σημαντικοί. Πολλοί ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 είναι παχύσαρκοι, με ιδιαίτερη τάση για ενδοκοιλιακή παχυσαρκία, που ως γνωστόν προκαλεί αντίσταση στην ινσουλίνη και οι οποίοι έχουν ακόμα και άλλα στοιχεία του «μεταβολικού συνδρόμου». Η μειωμένη φυσική δραστηριότητα επίσης προξενεί αντίσταση στην ινσουλίνη, διάφορα δε φάρμακα, είναι διαβητογόνα [Κλινική χημεία Marshall-Bangert, 2011].



Εικόνα 2 : Στον διαβήτη τύπου 2 οι ασθενείς εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη, δηλαδή η ινσουλίνη παράγεται αλλά δεν χρησιμοποιείται σωστά με αποτέλεσμα τη συσσώρευση γλυκόζης στον οργανισμό του ασθενούς. <http://www.precisionnutrition.com/all-about-diabetes-mellitus>

1.3 Αντιμετώπιση

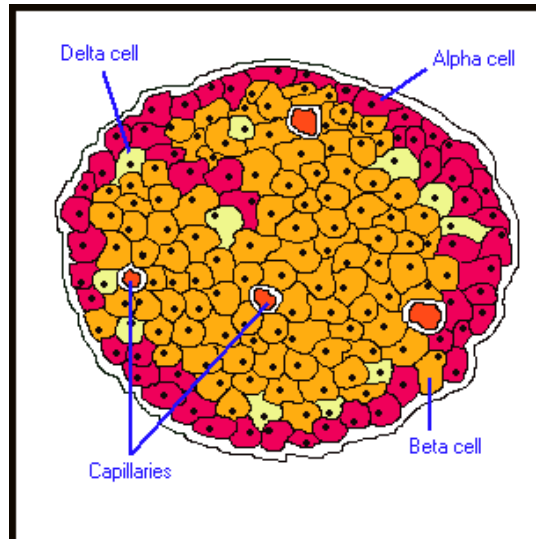
Για την αντιμετώπιση του Σ.Δ τύπου 2 πέρα από σωστή διατροφή, γυμναστική και απώλεια βάρους είναι αναγκαία η λήψη αντιδιαβητικών φαρμάκων ώστε να προληφθούν τυχόν επιπλοκές της ασθένειας. Συνήθως όμως δεν επιδιορθώνονται όλες οι ανωμαλίες που προκαλεί η ασθένεια και μετά από λίγα χρόνια εξέλιξής της δημιουργείται η ανάγκη διαφορετικής αντιμετώπισης της [M. Virally 2007]. Η ανάπτυξη νέων θεραπειών για τον διαβήτη τύπου 2 παραμένει μια εξαιρετικά απαιτητική διαδικασία. Οι ερευνητές στοχεύουν στην ενίσχυση της περιφερικής πρόσληψης γλυκόζης από την κυκλοφορία του αίματος, την καταστολή της υπερβολικά υψηλής παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ, ή την αποτροπή της πτώσης της λειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος. Μια από τις προσεγγίσεις είναι η αναστολή της υπερβολικής δραστηριότητας της φωσφοφυλάσης. Η αναστολή της δραστηριότητας της φωσφοφυλάσης του γλυκογόνου μειώνει την παραγωγή γλυκόζης [Baker, 2006].

1.4 Ομοιόσταση της γλυκόζης και ο ρόλος της ινσουλίνης

Για να διατηρηθεί το σωματικό βάρος σε σταθερά επίπεδα στο χρόνο, η εισαγωγή (intake) ενέργειας (κατανάλωση φαγητού) θα πρέπει να αντιστοιχεί στην κατανάλωση ενέργειας (το άθροισμα της εκκρινόμενης ενέργειας, των θερμικών απωλειών και της φυσικής δραστηριότητας), «ενεργειακό ισοζύγιο». Οποιαδήποτε απόκλιση από αυτή την ισορροπία οδηγεί σε αύξηση ή απώλεια βάρους. Οι άνθρωποι και τα περισσότερα θηλαστικά λαμβάνουν ενέργεια μέσα από διακριτά επεισόδια (discrete episodes) ή γεύματα. Η κύρια πηγή ενέργειας είναι η γλυκόζη. Οι περισσότεροι υδατάνθρακες περιέχουν γλυκόζη είτε ως δομική μονάδα, όπως στο άμυλο, είτε σε συνδυασμό με άλλους μονοσακχαρίτες, όπως στη λακτόζη. Μετά τη διάσπαση των υδατανθράκων στο λεπτό έντερο, η γλυκόζη απορροφάται από τα κύτταρα του εντέρου και οδηγείται στο αίμα. Μέσω του αίματος μεταφέρεται στα κύτταρα όπου και χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας. Ωστόσο, η γλυκόζη δε μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα χωρίς την παρουσία της ορμόνης ινσουλίνης. Αν δεν υπάρχει η ινσουλίνη, τα κύτταρα δε λαμβάνουν γλυκόζη και άρα ενέργεια, παρά το γεγονός ότι αυτή βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στο αίμα. Η «κίνηση» της γλυκόζης στον οργανισμό και η ταυτόχρονη διατήρηση της συγκέντρωσής της στο αίμα σε δεδομένα επιθυμητά επίπεδα (ομοιόσταση της γλυκόζης) είναι μια περίπλοκη διαδικασία που ελέγχεται από το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης –ινσουλίνης [Woods SC et al., 2006] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009].

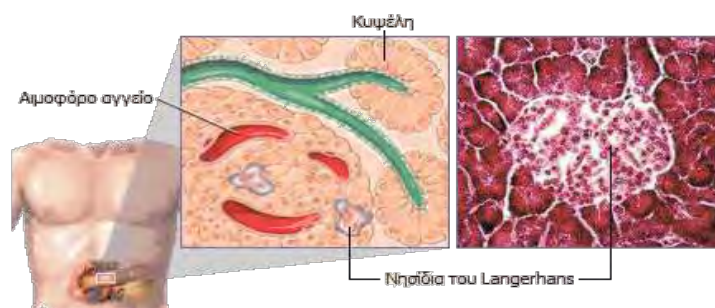
1.5 Το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης – ινσουλίνης

Η ενδοκρινής μούρα του παγκρέατος αποτελείται από απομονωμένα νησίδια που ονομάζονται νησίδια του Langerhans (Εικόνα 4,5).

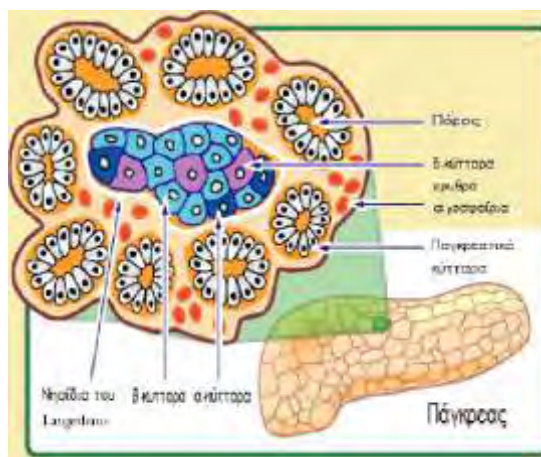


Εικόνα 3: Νησίδια του Langerhans.

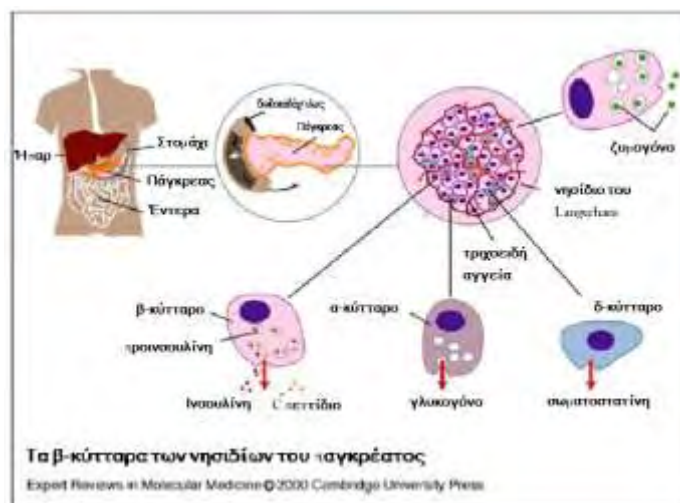
Στον ανθρώπινο οργανισμό τα νησίδια αυτά αριθμούν περίπου στο ένα εκατομμύριο, με συνολικό βάρος ιστού ένα γραμμάριο. Τα περισσότερα νησίδια περιέχουν τουλάχιστον τρεις τύπους κυττάρων: α-κύτταρα που εκκρίνουν γλυκογόνο, β-κύτταρα που εκκρίνουν ινσουλίνη και δ-κύτταρα που εκκρίνουν σωματοστατίνη (Εικόνες 5, 6). Τα β-κύτταρα αποτελούν το 80% του συνόλου των κυττάρων και βρίσκονται στο εσωτερικό των νησιδίων. Η περιφέρεια αποτελείται από α-κύτταρα, ενώ στο εσωτερικό βρίσκεται κι ένας μικρός αριθμός δ-κυττάρων. Οι ορμόνες που παράγονται από τα κύτταρα των νησιδίων του Langerhans έχουν πολυάριθμες λειτουργίες, η κυριότερη ωστόσο είναι κατά γενική ομολογία η ομοίωση της γλυκόζης [Woods SC et al., 2006] [Ελένη Α. Δασκαλάκη, 2009].



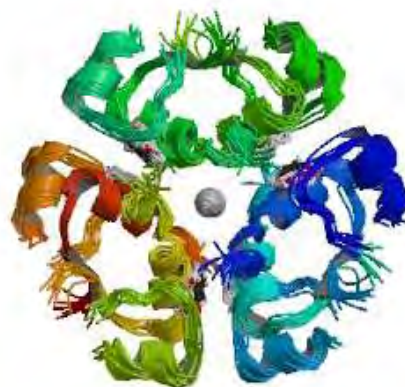
Εικόνα 4: Νησίδια του Langerhans στο ανθρώπινο πάγκρεας [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].



Εικόνα 5: Τύποι κυττάρων που περιέχονται στα νησίδια του Langerhans [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009].

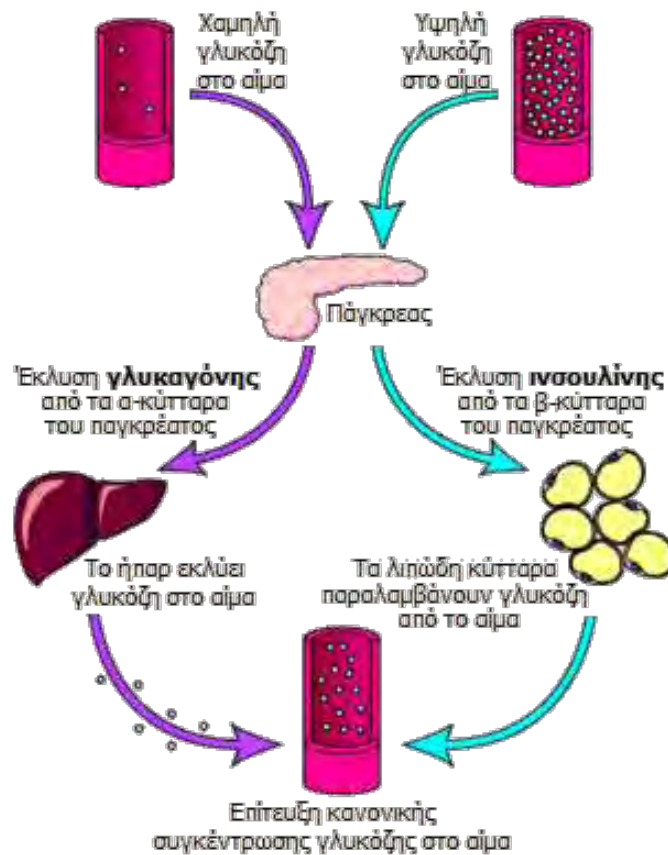


Εικόνα 6: Έκκριση ορμονών από το πάγκρεας, από κάθε είδος κυττάρων [Ελένη Α. Δασκαλάκη, Αθήνα 2009]



Εικόνα 7: Εξαμερές μόριο της ανθρώπινης ινσουλίνης, συμμετρική δομή, 3D απεικόνιση [RCSB, Protein Data Bank].

1.6 Μηχανισμός δράσης ινσουλίνης και γλυκαγόνης στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος:



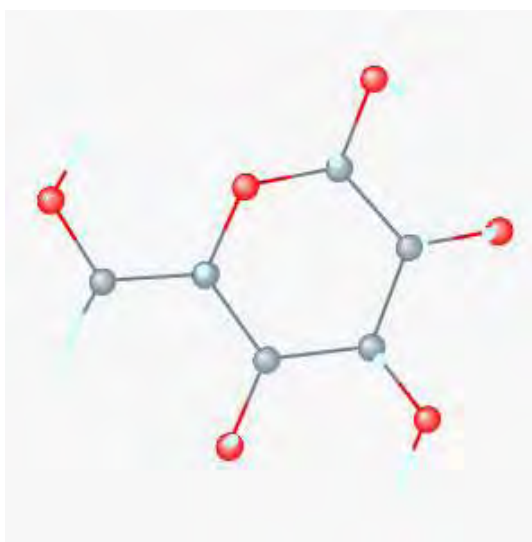
Εικόνα 8: Φυσιολογική ρύθμιση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα [Guyton & Hall, 11η έκδοση]

Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα οδηγεί στην απελευθέρωση ινσουλίνης από το πάγκρεας. Η ινσουλίνη κατευθύνεται στο ήπαρ, προκαλεί τη σύνθεση γλυκογόνου με επακόλουθη μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα, η οποία οδηγεί σε απελευθέρωση γλυκαγόνης από το πάγκρεας και πρόσληψη αυτής από το ήπαρ. Στον ηπατικό ιστό, η γλυκαγόνη προκαλεί την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης. Και οι δύο ορμόνες, στόχο έχουν να επαναφέρουν τα επίπεδα της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα για τον οργανισμό. [The important roles of insulin and glucagon: Diabetes and Hypoglycemia].

2. Βασικές γνώσεις

2.1 Γλυκόζη

Είναι μονοσακχαρίτης που αποτελείται από μια αλυσίδα 6 ατόμων άνθρακα συνδεδεμένων με 12 άτομα υδρογόνου και 6 άτομα οξυγόνου. Η διαμόρφωση με την οποία συναντάται συνηθέστερα στη φύση είναι αυτή της D-γλυκόζης. Η D-γλυκόζη όταν είναι σε διάλυμα κυκλοποιείται και η C-1 αλδεϋδική ομάδα του ανοικτού τύπου της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μία ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται καλείται πυρανόζη λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο. Έτσι προκύπτουν δύο στερεοϊσομερή, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη [Stryer L et al,2012].



Εικόνα 9: Δομή D-γλυκόζης [pubchem. ncbi.nlm.nih.gov]

Η γλυκόζη είναι ένα μείζον ενεργειακό υπόστρωμα και αποτελεί τη μόνη αξιοποιήσιμη μορφή ενέργειας για ορισμένους ιστούς πχ τα ερυθροκύτταρα και βραχυπρόθεσμα το κεντρικό νευρικό σύστημα. Πολλοί ιστοί είναι σε θέση να οξειδώνουν τη γλυκόζη πλήρως προς διοξείδιο του άνθρακα. Άλλοι τη μεταβολίζουν ως το στάδιο του γαλακτικού οξέος, το οποίο μπορεί και πάλι να μετατραπεί σε γλυκόζη με το μηχανισμό της γλυκονεογένεσης. Ακόμα και σε ιστούς που είναι σε θέση να οξειδώνουν πλήρως τη γλυκόζη, παράγεται γαλακτικό οξύ αν δεν επαρκεί το διαθέσιμο οξυγόνο (αναερόβιος μεταβολισμός). Οι πηγές γλυκόζης που χρειάζεται το σώμα είναι οι υδατάνθρακες των τροφών, καθώς και η ενδογενής παραγωγή με γλυκογονόλυση (απελευθέρωση γλυκόζης που είναι αποθηκευμένη ως γλυκογόνο) και με γλυκονεογένεση (σύνθεση γλυκόζης από πηγές όπως πχ γαλακτικό, γλυκερίνη και τα περισσότερα αμινοξέα) [Marshall, Bangert 2011].

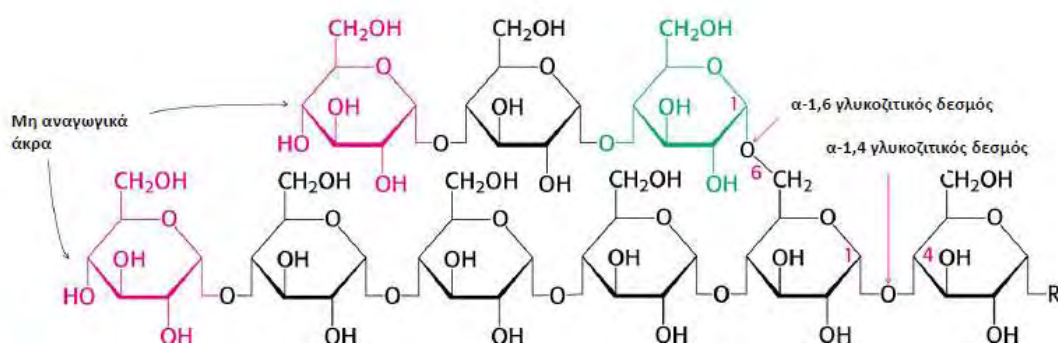
Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα εξαρτάται από τους σχετικούς ρυθμούς εισόδου της γλυκόζης στη κυκλοφορία και από την αξιοποίησή της. Η συγκέντρωση της φυσιολογικά υπόκειται

σε αυστηρό έλεγχο [Marshall,Bangert 2011]. Κατόπιν γεύματος η γλυκόζη αποθηκεύεται ως γλυκογόνο το οποίο κινητοποιείται κατά τη διάρκεια της νηστείας. Η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα συνήθως ελαττώνεται στα προ του γεύματος επίπεδα το πολύ μέσα σε 4 ώρες μετά το γεύμα. Ο έλεγχος της συγκέντρωσης της επιτυγχάνεται με τη συντονισμένη δράση της ινσουλίνης σε σχέση με τις «αντιρρυθμιστικές» ορμόνες, δηλαδή της γλυκαγόνης, της κορτιζόλης και άλλων οι οποίες έχουν αντίθετη δράση από την ινσουλίνη [Marshall,Bangert 2011]. Το ήπαρ ελευθερώνει γλυκόζη στο αίμα κατά τη διάρκεια της μυϊκής δραστηριότητας και στα διαστήματα μεταξύ των γευμάτων, η οποία θα προσληφθεί από τον εγκέφαλο και από τους σκελετικούς μυς [Stryer, 2012].

2.2 Γλυκογόνο

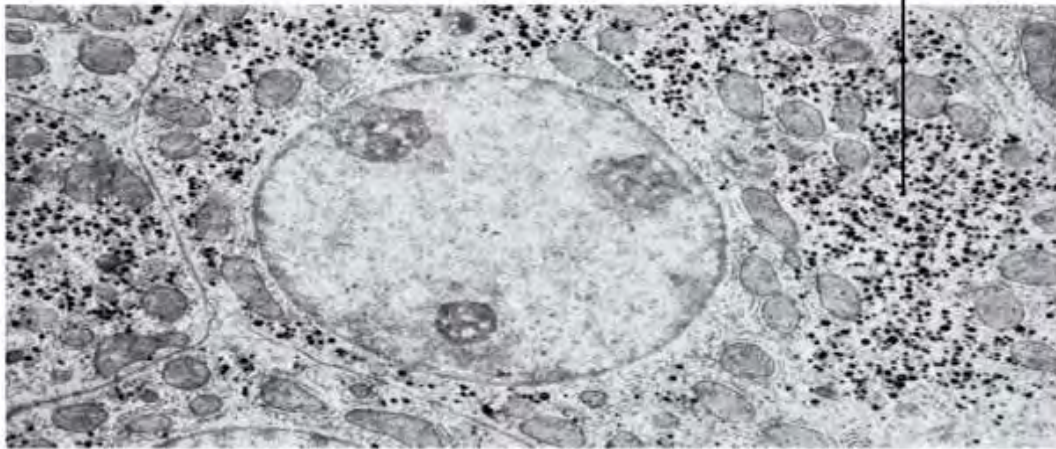
Το γλυκογόνο είναι μια άμεσα κινητοποιούμενη μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης. Είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει γλυκόζη όταν χρειάζεται ενέργεια. Τα περισσότερα κατάλοιπα γλυκόζης στο γλυκογόνο συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4. Οι διακλαδώσεις που απαντούν περίπου σε κάθε δέκατο κατάλοιπο σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α 1-6 [Stryer L et al, 2012]. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του γλυκογόνου και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν τη ποσότητα της γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Το γλυκογόνο δηλαδή, ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα.

Οι δυο κύριες θέσεις αποθήκευσης γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό,τι στους μυς αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται περισσότερο γλυκογόνο. Στο ήπαρ η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα της γλυκόζης που απαιτούνται για τις ανάγκες του οργανισμού ως συνόλου ενώ στους μυς οι διεργασίες ρυθμίζονται για τη κάλυψη αποκλειστικά των αναγκών των μυών. Τέλος να αναφερθεί ότι το γλυκογόνο βρίσκεται στο κυτοσόλιο υπό μορφή κοκκίων διαμέτρου 10-40nm [εικόνα 11] [Stryer L et al, 2012].



Εικόνα 10: Δομή γλυκογόνου : Στη δομή αυτή των δυο εξωτερικών διακλαδώσεων ενός μορίου γλυκογόνου, τα κατάλοιπα στα μη αναγωγικά άκρα είναι κόκκινα και το κατάλοιπο με το οποίο αρχίζει μια διακλάδωση είναι πράσινο. Το υπόλοιπο του μορίου του γλυκογόνου συμβολίζεται με R [Stryer, 2012].

Κοκκία γλυκογόνου



Εικόνα 11: Ηλεκτρονιομικρογραφία ενός ηπατικού κυττάρου. Τα πυκνά σωματίδια στο κυτταρόπλασμα είναι κοκκία γλυκογόνου [Stryer,2012].

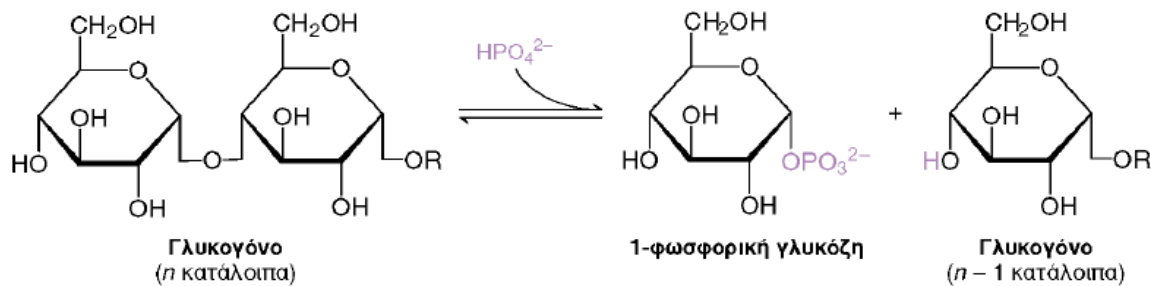
2.2.1 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση συνίσταται σε τρία βήματα : 1) απελευθέρωση της 1- φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο 2) ανακατασκευή του υποστρώματος του γλυκογόνου για νέα αποικοδόμηση και 3) μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6- φωσφορική γλυκόζη για περαιτέρω μεταβολισμό [Stryer L et al, 2012].

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι το καθοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου. Ο ρόλος της είναι να διασπά το υπόστρωμά της με τη προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi) προς απόδοση 1- φωσφορικής γλυκόζης.

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

Η φωσφορυλάση καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου του γλυκογόνου. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του C-1 του τελικού καταλοίπου και του C-4 του γειτονικού καταλοίπου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του ατόμου άνθρακα C-1 και του γλυκοζιτικού ατόμου οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν και η διαμόρφωση α στον C-1 άνθρακα διατηρείται [Stryer 2012]. Η αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6,8 ο λόγος ισορροπίας του ορθοφωσφορικού ιόντος προς την 1- φωσφορική γλυκόζη είναι 3,6 [D.Palm 1990].



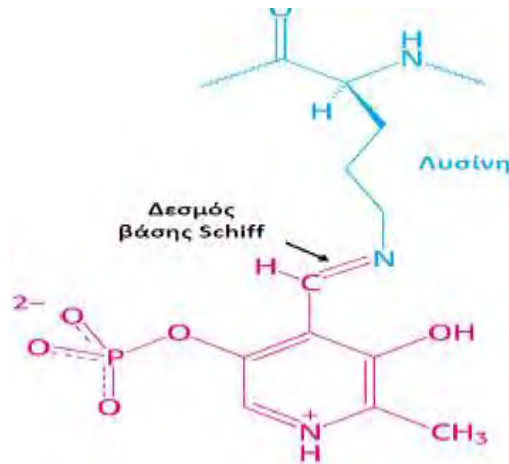
Εικόνα 12: Διάσπαση γλυκογόνου από φωσφορυλάση του γλυκογόνου με τη προσθήκη P_i , προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης [Stryer,2012].

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, διότι το απελευθερούμενο σάκχαρο είναι ήδη φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη) το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη, φορτισμένη αρνητικά κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι δυνατόν να διαχυθεί έξω από το κύτταρο.

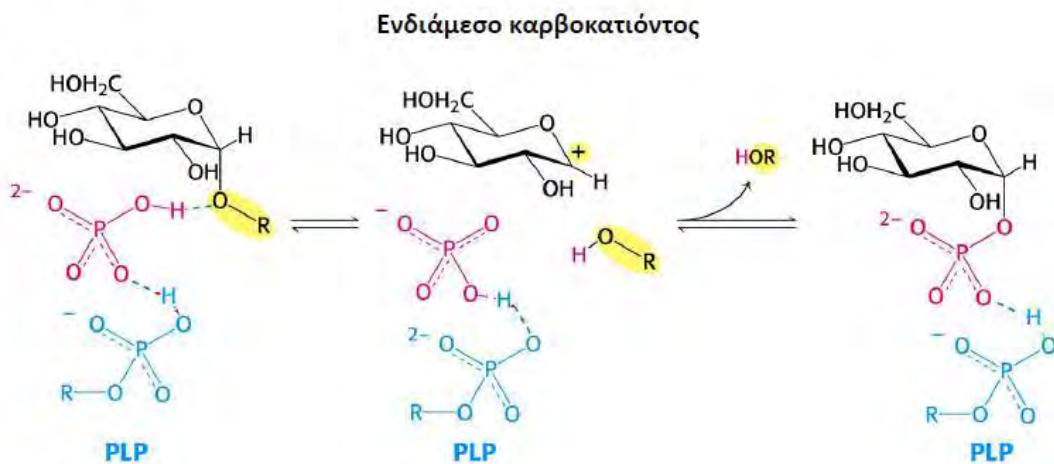
Η ιδιαίτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η φωσφορυλάση είναι να διασπάσει το γλυκογόνο φωσφορολυτικά παρά υδρολυτικά με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ATP που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Η διάσπαση αυτή χρειάζεται τον αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο [Stryer, 2012]. Τόσο το υπόστρωμα γλυκογόνου όσο και η παραγόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχουν διαμόρφωση α στον C-1 (δηλαδή το άτομο του οξυγόνου που συνδέεται στον C-1 είναι κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). 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 πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης. Επειδή η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α παρά β απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων. Η πιο πιθανή εξήγηση για τα αποτελέσματα αυτά είναι ότι σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν [Stryer L. Et al 2012].

2.2.2. Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου.

Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) είναι ένα παράγωγο της πυριδοξίνης και συμμετέχει στη διάσπαση του γλυκογόνου. Η αλδεϋδική ομάδα του συνενζύμου αυτού σχηματίζει μια βάση Schiff με τη πλευρική αλυσίδα μιας συγκεκριμένης λυσίνης (680) του ενζύμου [Stryer L et al, 2012]. Η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μια θέση μεταξύ της 5-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος γλυκογόνου.



Εικόνα 13: Δεσμός βάσης Schiff της φωσφορικής πυριδοξάλης [Stryer,2012].



Εικόνα 14: Μηχανισμός δράσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου: Μια προσδεσμένη ομάδα HPO_4^{2-} (κόκκινο) ευνοεί τη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού με προσφορά ενός πρωτονίου στην αποχωρούσα γλυκόζη (μαύρο). Η αντίδραση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καρβοκατιόντος και ευνοείται από τη μεταφορά ενός πρωτονίου από την πρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα της δεσμευμένης φωσφορικής πυριδοξάλης (μπλε). Η σύζευξη του καρβοκατιόντος του ορθοφωσφορικού έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της 1-φωσφορικής γλυκόζης.

Η 5-φωσφορική ομάδα της PLP δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό λειτουργώντας ως δότης και στη συνέχεια ως δέκτης πρωτονίων. Το ορθοφωσφορικό ιόν δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο που είναι συνδεδεμένο στον άνθρακα της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό ιόν προς σχηματισμό φωσφορικής γλυκόζης δεσμού α -1 με την επακόλουθη επιστροφή ενός ατόμου υδρογόνου στην φωσφορική πυριδοξάλη. (εικόνα 14) Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης [Stryer L et al,2012].

2.3 Φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο και αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου, καταλύοντας την αντίδραση φωσφορόλυσης του και απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη.

Στον οργανισμό υπάρχουν τρεις ισομορφές του ενζύμου, η φωσφορυλάση του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών, ανάλογες των ιστών στους οποίους εκφράζονται κατά προτίμηση [Rath VL et al., 1987] [Johnson LN, 1992]. Η ηπατική και η μυϊκή φωσφορυλάση είναι κατά προσέγγιση 90% παρόμοιες στην αλληλουχία αμινοξέων. Κάθε ισομορφή έχει διαφορετικό ρόλο στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών παρέχει ενέργεια στους μυς, η ηπατική φωσφορυλάση παράγει γλυκόζη για χρήση από άλλους ιστούς, ενώ 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 ιόντος. Αντίθετα, η ηπατική φωσφορυλάση έχει ομοιοστατικό ρόλο, καθώς η ισομορφή αυτή ρυθμίζει την απελευθέρωση γλυκόζης για τον οργανισμό ως σύνολο [Oikonomakos NG et al., 2000] [Stryer L et al, 2012].

Δομικά, η GP είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο πανομοιότυπες υπομονάδες των 97 kDa (842 αμινοξέα). Κάθε υπομονάδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε μια αμινο-τελική δομική περιοχή (≈ 480 κατάλοιπα) και μια καρβοξυ-τελική δομική περιοχή (≈ 360 κατάλοιπα).

Τόσο στους μύες όσο και στο ήπαρ, η GP υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: την μη φωσφορυλιωμένη χαμηλής δραστηριότητας και χαμηλής συγγένειας για το υπόστρωμα μορφή (GP_b) και την φωσφορυλιωμένη στη Ser14 υψηλής δραστηριότητας και υψηλής συγγένειας για το υπόστρωμα μορφή GP_a. Και στις δύο μορφές, αλλοστερικοί τροποποιητές μπορούν να προωθήσουν την ισορροπία μεταξύ μιας λιγότερο ενεργούς κατάστασης T και μιας πιο ενεργούς κατάστασης R [Oikonomakos NG et al., 2000] [Oikonomakos NG et al., 2002].

Η κατάλυση της αντίδρασης φωσφορόλυσης του γλυκογόνου από την GP γίνεται στο καταλυτικό της κέντρο το οποίο εντοπίζεται σε μια βαθιά σχισμή που σχηματίζεται με κατάλοιπα ανάμεσα στην καρβοξυ-τελική και την αμινο-τελική περιοχή κάθε υπομονάδας. Στο ενεργό κέντρο τα υποστρώματα, γλυκογόνο και ορθοφωσφορικό ανιόν, έρχονται σε γειτνίαση ώστε να επιτευχθεί η φωσφορόλυση του γλυκογόνου, και όχι η υδρόλυση του, αποκλείοντας τα μόρια του H₂O, με τη βοήθεια της PLP. Δύο είναι τα σημαντικότερα σημεία του μηχανισμού κατάλυσης από την GP. Το πρώτο είναι η διατήρηση της ανωμέρειας του γλυκογόνου στο προϊόν (1-φωσφορική α-D-γλυκόζη) (α-ανωμερές), που οφείλεται στο σχηματισμό του ανωμερικού καρβοκατιόντος και την κατάλληλα προσανατολισμένη (από κάτω) πυρηνόφιλη προσβολή του ορθοφωσφορικού ανιόντος. Το

δεύτερο σημείο είναι η απαίτηση της παρουσίας του συνενζύμου, φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με την ε-αμινομάδα της λυσίνης 680. Σύμφωνα με μελέτες μηχανισμού της κατάλυσης της αντίδρασης φαίνεται το συνένζυμο να δρα σαν δότης αλλά και δέκτης πρωτονίων κατά την κατάλυση [McLaughlin 1984].

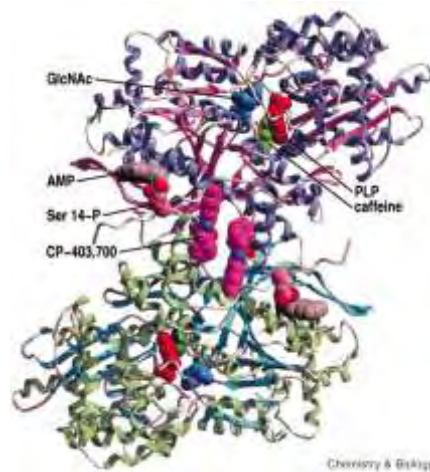
Φυσιολογικά η δραστηριότητα της GP ελέγχεται με ομοιοπολική τροποποίηση από το ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, μια πολύ μεγάλη πρωτεΐνη στους σκελετικούς μυς. Η κινάση μετά από έναν ορμονικό καταρράκτη αντιδράσεων (καταρράκτης της κυκλικής AMP) και την ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου (δέσμευση Ca^{2+}), προκαλεί φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης στη σερίνη 14 οδηγώντας στο σχηματισμό της GP_a (φωσφορυλιωμένη GP). Αντίθετα μία ειδική πρωτεϊνική φωσφατάση 1G (PP-G1) ή πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1), υδρολύει τον φωσφοεστερικό δεσμό, υδρολύει το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο σερίνης αποφωσφορυλιώνοντας τη φωσφορυλάση α , και έτσι η φωσφορυλάση μεταπίπτει στη μορφή GP_b (μη φωσφορυλιωμένη GP) [Rath et al., 2000] [Stryer L et al, 2012].

Στους σκελετικούς μύες η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ό,τι σε όλα τα ένζυμα μαζί που εξαρτώνται από την βιταμίνη B6. Βάση διαφόρων πειραμάτων που έγιναν στο παρελθόν, αποδείχτηκε το γεγονός ότι η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP είναι απαραίτητη για την δραστηριότητα του ενζύμου [Oikonomakos NG et al., 1992].

2.3.1 Δομή της φωσφορυλάσης

Οι κρυσταλλικές δομές της φωσφορυλάσης α και β έχουν προσδιοριστεί τόσο στην T όσο και στην R διαμόρφωση. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα διμερές που αποτελείται από δυο πανομοιότυπες υπομονάδες των 97KDa. Κάθε υπομονάδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε μια αμινο-τελική δομική περιοχή (480 κατάλοιπα) και περιέχει μια θέση πρόσδεσης γλυκογόνου και μια καρβοξυ-τελική δομική περιοχή (360 κατάλοιπα). Κάθε καταλυτικό κέντρο, σε κάθε υπομονάδα, περιέχει μια ομάδα συνενζύμου (PLP), παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6), συνδεδεμένη με τη λυσίνη (Lys) 680 του ενζύμου [Oikonomakos NG et al., 1992] [Stryer L et al., 2012].

Το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται σε μια βαθιά σχισμή που σχηματίζεται από κατάλοιπα από τις αμινο- και καρβοξυ- τελικές δομικές περιοχές. [Stryer, 2012]. Βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη έξι κέντρων σύνδεσης: το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14, καταλυτικό, το αποθηκευτικό, το νουκλεοζιτικό, το αλλοστερικό, και το νέο αλλοστερικό κέντρο. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε και ένα νέο κέντρο σύνδεσης, αυτό της κερσετίνης [Kantsadi, 2014].

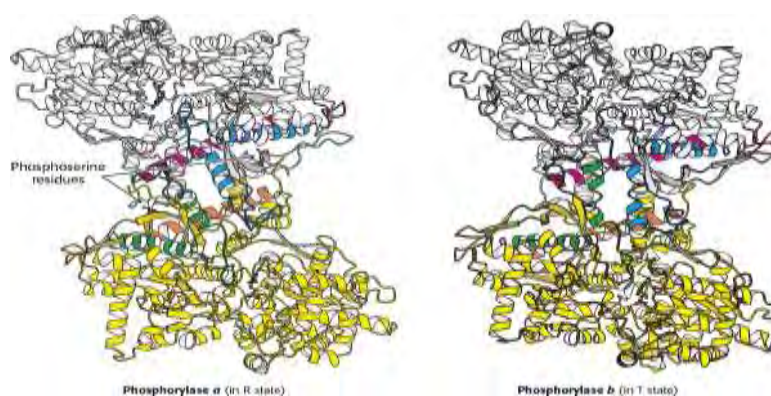


Εικόνα 15: Δομή της φωσφορυλάσης [V.Rath ,2000].

2.3.2 Μυϊκή φωσφορυλάση

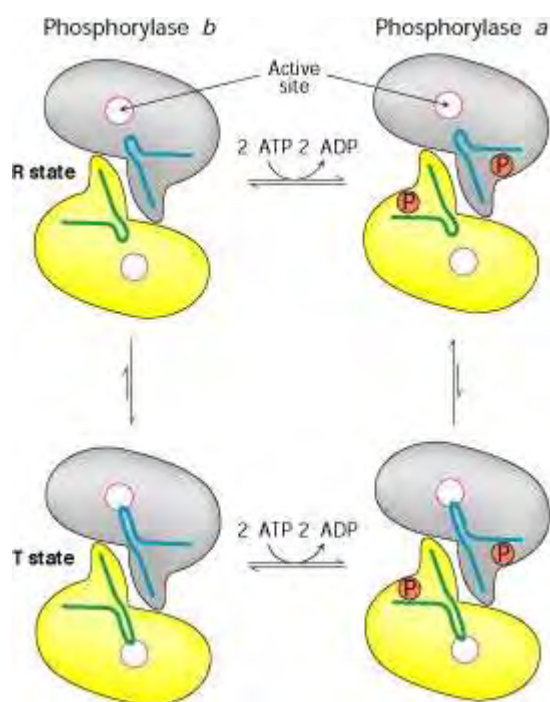
Η διμερής φωσφορυλάση των σκελετικών μυών υπάρχει σε δυο αλληλομετατρέπόμενες μορφές : μια συνήθως ενεργό φωσφορυλάση α και μια συνήθως ανενεργό κατάσταση β. (Εικόνα 22). Καθεμιά από τις δυο μορφές βρίσκεται σε μια ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης T. Η ισορροπία όμως για τη φωσφορυλάση α ευνοεί τη κατάσταση R ενώ η ισορροπία για τη φωσφορυλάση β ευνοεί τη κατάσταση T.

Η φωσφορυλάση α και η φωσφορυλάση β διαφέρουν κατά μια φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η φωσφορυλάση β μετατρέπεται σε α όταν φωσφορυλιωθεί η δεύτερη στη σερίνη 14 κάθε υπομονάδας μέσω ενός ενζύμου, της κινάσης της φωσφορυλάσης. [Stryer,2012]



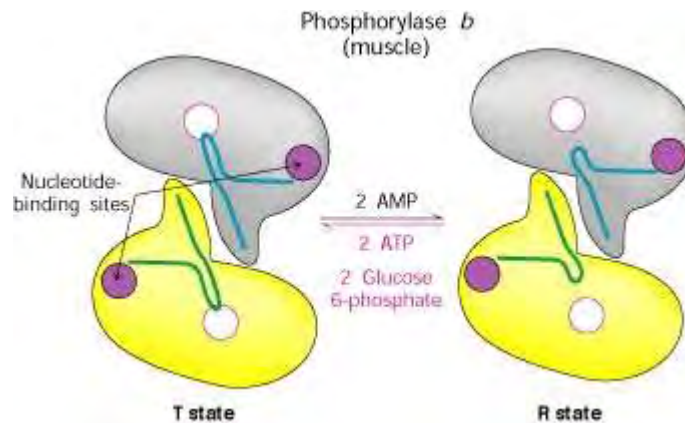
Εικόνα 16: Δομή της φωσφορυλάσης α και της φωσφορυλάσης β. Η φωσφορυλάση α είναι φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 14 κάθε υπομονάδας και η τροποποίηση αυτή ευνοεί τη δομή της πλέον ενεργού κατάστασης R. Η μια υπομονάδα παρουσιάζεται σε λευκό χρώμα και οι έλικες και οι βρόχοι που είναι σημαντικοί για τη ρύθμιση σε μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα δείχνεται με κίτρινο χρώμα και οι ρυθμιστικές δομές με πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση β δεν είναι φωσφορυλιωμένη και υπάρχει κυρίως στη κατάσταση T.

Η σύγκριση των δομών της φωσφορυλάσης a και b αποκαλύπτει ότι οι μικρές διαφορές στις επιφάνειες επαφής των υπομονάδων επηρεάζουν τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου. Η μετάβαση από την κατάσταση T (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση b) στην R (αντιπροσωπεύεται από τη φωσφορυλάση a) συνεπάγεται μια στροφή 10 μοιρών γύρω από τον άξονα συμμετρίας του διμερούς και η μετάβαση αυτή συνδέεται με δομικές μεταβολές σε μία α-έλικα, 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 παρεμποδιζόμενο. Στη κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το ορθοφωσφορικό ιόν είναι καλά οργανωμένη. [Stryer,2012]



Εικόνα 17: Ρύθμιση της φωσφορυλάσης. Η φωσφορυλάση a και b βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργούς κατάστασης R και μια λιγότερο ενεργού κατάστασης T. Η φωσφορυλάση b είναι συνήθως ανενεργή διότι η ισορροπία ευνοεί κυρίως την κατάσταση T. Η φωσφορυλάση a είναι συνήθως ενεργή διότι η ισορροπία ευνοεί τη κατάσταση R. Οι ρυθμιστικές δομές δείχνονται με μπλε και πράσινο χρώμα. [Stryer L. et al, 2012]

Η θέση ισορροπίας της φωσφορυλάσης b μεταξύ των καταστάσεων T και R ανταποκρίνεται στις συνθήκες του κυττάρου. Η μυϊκή φωσφορυλάση b είναι ενεργός μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων AMP, η οποία δεσμεύεται σε μια θέση σύνδεσης νουκλεοτιδίου και σταθεροποιεί τη στερεοδιάταξη της φωσφορυλάσης b στην κατάσταση R. Η ATP δρα ως αρνητικός αλλοστερικός τελεστής ανταγωνιζόμενος την AMP ευνοώντας την κατάσταση T. Επομένως η μετάπτωση της φωσφορυλάσης b από την κατάσταση T στην R και αντιστρόφως ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο του κυττάρου. Τέλος, και η 6 - φωσφορική γλυκόζη ευνοεί την κατάσταση T της φωσφορυλάσης b. [Stryer L et al, 2012]

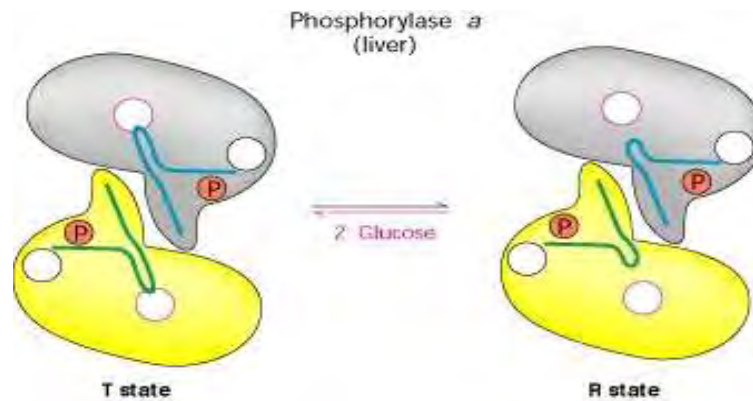


Εικόνα 18: Αλλοστερική ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης. Ένα χαμηλό ενεργειακό φορτίο, που αντιπροσωπεύεται από την υψηλή συγκέντρωση της AMP ευνοεί τη μετάβαση στη κατάσταση R. [Stryer, 2012]

Κάτω από τις περισσότερες φυσιολογικές συνθήκες η φωσφορυλάση b είναι ανενεργός λόγω των ανασταλτικών επιδράσεων της ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Αντίθετα, η φωσφορυλάση a είναι πλήρως ενεργή ανεξάρτητα από τα επίπεδα AMP, ATP και της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Στους μύες που βρίσκονται σε ηρεμία σχεδόν όλο το ένζυμο βρίσκεται στην ανενεργό μορφή b ενώ όταν αρχίσει η άσκηση η αύξηση της συγκέντρωσης της AMP οδηγεί στην ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης a [Stryer L et al, 2012]

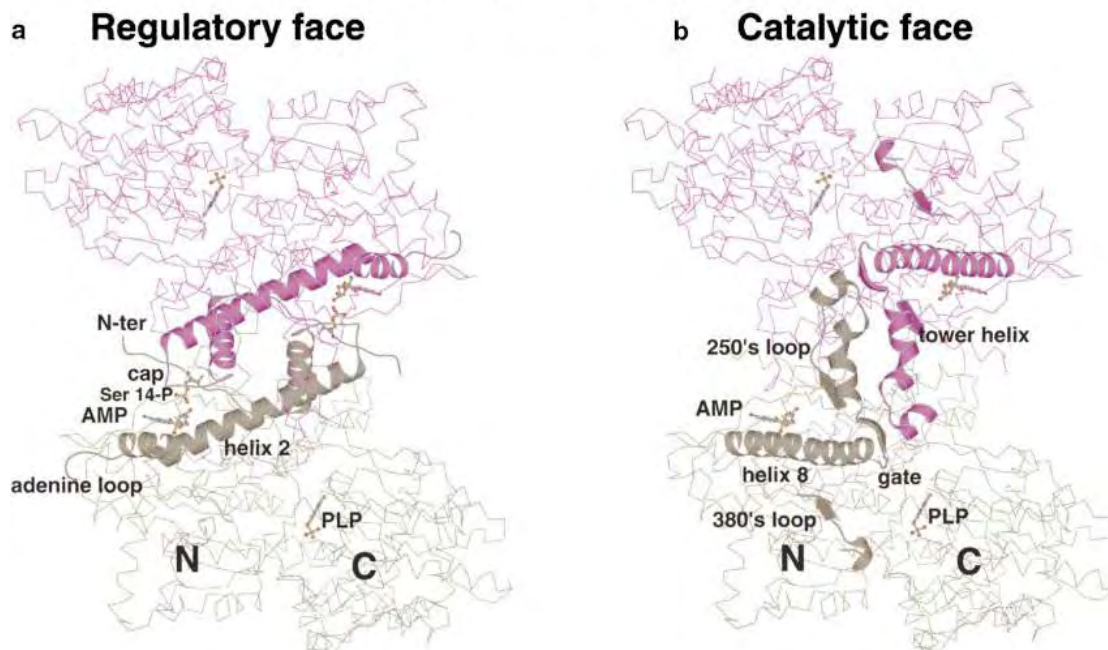
2.3.3 Ηπατική φωσφορυλάση

Η ηπατική φωσφορυλάση του ανθρώπου είναι ένα ομοδιμερές που αποτελείται από 846 κατάλοιπα σε κάθε υπομονάδα [V.Rath, 2000]. Σε αντίθεση με το ένζυμο των μυών, η ηπατική φωσφορυλάση a αλλά όχι η b παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από τη κατάσταση T στη κατάσταση R. Η δέσμευση της γλυκόζης μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης a από την κατάσταση R στην T απενεργοποιώντας το ένζυμο. Η γλυκόζη αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή της ηπατικής φωσφορυλάσης a καθώς όταν βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στον οργανισμό δεν υπάρχει ανάγκη κινητοποίησης του γλυκογόνου. Σε αντίθεση με τη μυϊκή, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται τις εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο όπως συμβαίνει στο συσπώμενο μυ. [Stryer L et al, 2012] Η φωσφορυλιωμένη φωσφορυλάση a παρουσιάζει είτε ενεργή είτε ανενεργή διαμόρφωση ενώ η μη φωσφορυλιωμένη b παρουσιάζει χαμηλή δραστηριότητα αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί μερικώς από την AMP. Η ενεργή διαμόρφωση εγκαθιδρύεται από τη φωσφορυλίωση της Ser14 και την πρόσδεση της AMP. Η ανενεργή διαμόρφωση εγκαθιδρύεται με αποφωσφορυλίωση, τη πρόσδεση γλυκόζης αλλά και με τη σύνδεση ετεροκυκλικών μορίων όπως η καφεΐνη. Η γλυκόζη προσδέεται στο καταλυτικό κέντρο, η καφεΐνη κοντά σε αυτό και η AMP σε μια συγκεκριμένη αλλοστερική θέση. Η γλυκόζη δρα συνεργιστικά με την καφεΐνη για να αναστείλει τη φωσφορυλάση [V.Rath, 2000].



Εικόνα 19 : Απεικόνιση της αλλοστερικής ρύθμισης της ηπατικής φωσφορυλάσης. Η πρόσδεση της γλυκόζης μετατοπίζει την ισορροπία στη κατάσταση T και απενεργοποιεί το ένζυμο [Stryer L et al, 2012].

Active HLGP



Εικόνα 20: Το διμερές μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει δυο επικράτειες τη ρυθμιστική και την καταλυτική. Η ρυθμιστική περιέχει τη θέση σύνδεσης AMP και τη θέση φωσφορυλίωσης. Η καταλυτική συνδέεται με το μόριο του γλυκογόνου [V L. Rath,2000].

2.4 Αναστολείς φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Στον διαβήτη τύπου 2, η αδυναμία του ήπατος να διατηρήσει την ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα είναι ένας σημαντικός παράγοντας της εμφάνισης υπεργλυκαιμίας στην κατάσταση απορρόφησης ή σε κατάσταση νηστείας. Συνεπώς η στόχευση της χρήσης ή παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ είναι ένας πιθανός στόχος για την αντιμετώπιση της ασθένειας αυτής. Οι πλέον

σημαντικοί στόχοι για φαρμακευτική παρέμβαση είναι οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται άμεσα στο μεταβολισμό της γλυκόζης όπως η γλυκοκινάση και η φωσφορυλάση [L.J Hampson,2005].

Είναι αποδεδειγμένο ότι αναστολείς της φωσφορυλάσης μειώνουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Αναστολείς όπως η γλυκόζη που σταθεροποιούν την T διαμόρφωση μπλοκάρουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου [Kantsadi, 2014]. Έτσι, η πλειοψηφία των αναστολέων που σχεδιάζονται στοχεύουν στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.

Παρόλο που ο κύριος στόχος των αναστολέων είναι η GPb του ήπατος του ανθρώπου, τα πειράματα διεξάγονται στη μυϊκή GPb κοκίλων (rmGPb) λόγω της σχετικά εύκολης απομόνωσης σημαντικών ποσοτήτων αλλά και της ανάπτυξης πρωτεϊνικών κρυστάλλων καλής ποιότητας. Η ηπατική και η μυϊκή φωσφορυλάση των κοκίλων είναι όμοια σε αμινοξική αλληλουχία κατά 80%. Ανάμεσα στις 170 αμινοξικές διαφορές μεταξύ των δυο ισομορφών οι 85 είναι συντηρημένες (49%) [Hayes, 2014]. Επιπροσθέτως το καταλυτικό κέντρο των δύο ενζύμων είναι απόλυτα συντηρημένο τόσο σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας όσο και δομής.

2.5 Χρήση εκχυλισμάτων ροδιού ως αναστολείς

Στην αρχαιότητα το ρόδι θεωρούνταν “ένα φαρμακείο από μόνο του”, χρησιμοποιούνταν ως αντιπαρασιτικός παράγοντας και βοηθούσε σε περιπτώσεις έλκους, διάρροιας και στις άφθες. Σύγχρονες χρήσεις του ροδιού περιλαμβάνουν τη θεραπεία του συνδρόμου της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας, θεραπείες ορμονικής υποκατάστασης, καρδιαγγειακή προστασία, στοματική υγιεινή, καθώς και χρήση του σε διάφορα καλλυντικά [A. Faria, 2011] Η δράση του επίσης συνδέεται με πρόληψη ή θεραπεία ασθενειών όπως αρθρίτιδα, ο καρκίνος και ο διαβήτης. [S. Banihani, 2013] Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, η επιστημονική έρευνα αποκάλυψε τη βιοχημική βάση για ορισμένες από τις παραδοσιακές χρήσεις του ροδιού. Σε αυτά τα χρόνια, ο αριθμός των επιστημονικών εργασιών σχετικά με ρόδι και της φαρμακευτικές του ιδιότητες έχει αυξηθεί. Ανάμεσα στα συστατικά του, το ελλαγικό οξύ, οι ελαγιταννίνες, οι ανθοκυανίνες και τα φλαβονοειδή φαίνονται να είναι περισσότερο υπεύθυνα για τη φαρμακευτική του δράση [A. Faria, 2011]. Πολλά συστατικά του ροδιού εμφανίζουν αντιδιαβητική δράση. Ένας βασικός μηχανισμός με τον οποίο τα κλάσματα ροδιού επηρεάζουν τον ΣΔ τύπου 2 είναι η μείωση του οξειδωτικού στρες και της υπεροξειδωσής των λιπιδίων [S. Banihani, 2013].

3. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

3.1 Αρχές ενζυμικής κινητικής:

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που δρουν ως βιολογικοί καταλύτες επειδή έχουν την ικανότητα να προάγουν ειδικές χημικές αντιδράσεις κάτω από τις ήπιες συνθήκες που επικρατούν στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Τα ένζυμα δεν αλλάζουν τη θέση της ισορροπίας σε μια αντιστρεπτή αντίδραση, αλλά επιταχύνουν την επίτευξή της χαμηλώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης, που απαιτείται κατά την μετατροπή υποστρώματος σε προϊόν, με το να διευκολύνουν τη δημιουργία της μεταβατικής κατάστασης. Τα ένζυμα έχουν τρία διακριτικά χαρακτηριστικά: υψηλή εξειδίκευση, υψηλή ταχύτητα αντίδρασης και μεγάλη ικανότητας ρύθμισης.

Όλα τα ένζυμα συνδέουν αντιστρεπτά το υπόστρωμά τους σε μια ειδική περιοχή δέσμευσης γνωστή ως το ενεργό κέντρο, που δημιουργείται από την τρισδιάστατη δομή του πρωτεϊνικού μορίου. Το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος (ES), υφίσταται μια καταλυτική αντίδραση, που προάγεται από ειδικά κατάλοιπα αμινοξέων στο ενεργό κέντρο, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του προϊόντος (P). Οι καταλυτικές ιδιότητες ενός ενζύμου συχνά εξαρτώνται από την ύπαρξη μη-πεπτιδικών μορίων, γνωστών ως συμπαραγοντες ή συνένζυμα, τα οποία συνδέονται με το ένζυμο και προάγουν την αντίδραση. Ορισμένα ένζυμα (αλλοστερικά) μπορεί να περιέχουν, εκτός από το ενεργό κέντρο, ξέχωρες ρυθμιστικές ή αλλοστερικές περιοχές για την σύνδεση άλλων μορίων, τα οποία, όταν συνδεθούν, τροποποιούν την καταλυτική δράση του ενζύμου επειδή επάγουν αλλαγές στη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου. Αυτά τα ρυθμιστικά μόρια ονομάζονται τροποποιητές και μπορεί να ενεργοποιούν ή να καταστέλλουν το ένζυμο [Γεωργάτσος, 2005].

Το 1913, ο Leonor Michaelis και η Maud Menten πρότειναν ένα μοντέλο, το μοντέλο Michaelis – Menten, το οποίο εξηγεί τα κινητικά χαρακτηριστικά πολλών ενζύμων. Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων, σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, ασχολείται με την μέτρηση των δύο χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου, V_{max} και K_M , και με την μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την ενζυμική αντίδραση. Οι κυριότεροι από τους παράγοντες αυτούς 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 [Stryer L, 2012].

Η ενεργότητα ενός ενζύμου, εκφράζεται με την ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Για την απλούστερη περίπτωση, όπου ένα υπόστρωμα μετατρέπεται μη αντιστρεπτά σε ένα προϊόν, στην αντίδραση:



(όπου k_1 , k_2 και k_{-1} οι κινητικές σταθερές της ταχύτητας των επιμέρους αντιδράσεων, E το ένζυμο, S το υπόστρωμα, ES το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, και P το προϊόν)

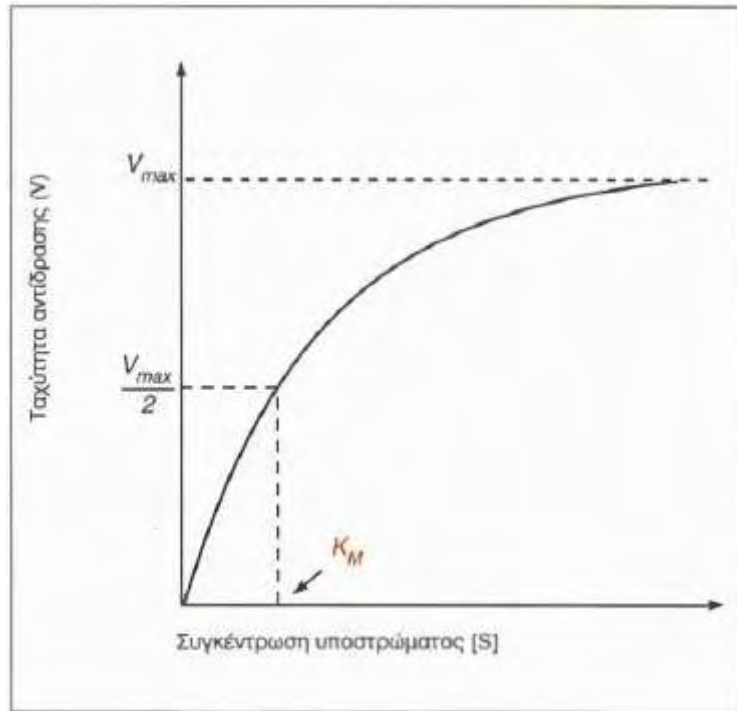
η ταχύτητα (V) ορίζεται σαν το ποσό του υποστρώματος (S) που καταναλώνεται ή το ποσό των προϊόντων (P) που δημιουργούνται στην μονάδα του χρόνου ($V=-d[S]/dt = d[P]/dt$) και υπολογίζεται από την **εξίσωση Michaelis - Menten**:

$$V_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Όπου V_o η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης, $[S]$ η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{\max} η μέγιστη ταχύτητα για την συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε και K_M η σταθερά Michaelis :

$$K_M \text{ (σταθερά Michaelis)} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Από την **εξίσωση Michaelis-Menten** προκύπτει ότι 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 (Εικόνα 30). Παρατηρούμε ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα αυξάνει γραμμικά με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική πρώτης τάξεως, $V_o=k[S]$), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η αρχική ταχύτητα γίνεται σταθερή και ανεξάρτητη από την συγκέντρωση του υποστρώματος (κινητική μηδενικής τάξεως ή κινητική κορεσμού, $V_o=k$) και πλησιάζει την οριακή τιμή της μέγιστης ταχύτητας, V_{\max} . Η **σταθερά Michaelis (K_M)** είναι η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία έχουμε το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας. Μας δίνεται επομένως μια εκτίμηση της συγγένειας του ενζύμου προς το συγκεκριμένο υπόστρωμα [Stryer L et al, 2012].



Εικόνα 21: Κινητική Michaelis-Menten: Ένα διάγραμμα της ταχύτητας (V_o) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$, για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική Michaelis- Menten, δείχνει ότι η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά Michaelis (K_M) είναι η συγκέντρωση υποστρώματος που παράγει μια ταχύτητα ίση με $V_{max}/2$ [Stryer L, 2012].

Οι καταλυτικές σταθερές K_M και V_{max} είναι χαρακτηριστικές μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η τιμή K_M για ένα ένζυμο εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συγκεκριμένου υποστρώματος, καθώς επίσης και από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως π.χ. το pH, η θερμοκρασία και η ιοντικής ισχύς. Η K_M έχει μονάδες συγκέντρωσης και για τα περισσότερα ένζυμα έχει τιμές μεταξύ 10^{-1} και 10^{-7} M. Αντιθέτως, η V_{max} , η μέγιστη ταχύτητα, αποκαλύπτει τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος (S) που μετατρέπονται σε προϊόν (P) ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου, όταν το ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Εξαρτάται από το ποσό του ενζύμου που χρησιμοποιείται και γι' αυτό εκφράζεται ως ταχύτητα σχηματισμού P ανά μονάδα ενζύμου (πχ $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ πρωτεΐνης) [Stryer L, 2012].

Μια άλλη πολύ χρήσιμη σταθερά είναι ο αριθμός ανακύκλωσης ή k_{cat} , ο οποίος ορίζεται ως $k_{cat} = V_{max} / [E]_T$, όπου $[E]_T$ είναι η ολική συγκέντρωση του ενζύμου. Η k_{cat} αντιστοιχεί στον μέγιστο αριθμό moles υποστρώματος που μπορούν να μετατραπούν σε προϊόν ανά mole ενζύμου ανά μονάδα χρόνου σε συνθήκες ενζυμικού κορεσμού, αντιπροσωπεύει δηλαδή τη μοριακή ενεργότητα του ενζύμου και εκφράζεται σε sec^{-1} . Η k_{cat} ισούται με την k_3 όταν $[S] \gg K_M$. Τέλος, η σταθερά εξειδίκευσης, k_{cat}/K_M , ο λόγος δυο σταθερών, εκφράζεται σε $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ και είναι ενδεικτική της κινητικής αποδοτικότητας του ενζύμου. Αντιστοιχεί στην σταθερά της ταχύτητας k_1 ανάμεσα στο υπόστρωμα και στο ελεύθερο ένζυμο, όταν $[S] \ll K_M$ [Stryer L, 2012].

3.2 Αναστολή ενζυμικών αντιδράσεων:

Η ενζυμική ενεργότητα επηρεάζεται από την ύπαρξη αναστολέων. Οι αναστολείς ενζύμων (I) είναι συνδέτες που ενώνονται ειδικά με ένα ένζυμο με ένα τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνουν την ικανότητα του να συνδέει το υπόστρωμα και να το μετατρέπει σε προϊόν, παρεμποδίζουν στην ουσία την ενζυμική αντίδραση.

Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη-αντιστρεπτή. Ένας **μη-αντιστρεπτός αναστολέας** διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο-στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά. Δεν μπορεί να απομακρυνθεί με ήπια μέσα όπως είναι η διαπίδυση και είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα. Ένας **αντιστρεπτός αναστολέας** μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα (π.χ. με διαπίδυση) και όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά την δραστηριότητά του. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς δεσμεύονται αμφίδρομα και μη ομοιοπολικά με το ένζυμο, έτσι, ώστε να αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας όπως στη σχέση:



(όπου I είναι ο αναστολέας και EI το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα)

Όλα τα είδη αντιστρεπτών αναστολέων χαρακτηρίζονται από την σταθερά διαστάσεως του αναστολέα K_i , η οποία αφορά τη διάσταση του συμπλόκου EI και επηρεάζει την K_M ή την V_{max} του ενζύμου με τον όρο $1+[I]/K_i$.

$$K_i = [E][I] / [EI]$$

Στη **συναγωνιστική αναστολή**, ο αναστολέας (I) δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και συναγωνίζεται με το υπόστρωμα (S) για δέσμευση στο ενεργό κέντρο. Ο αναστολέας αυτός καλείται συναγωνιστικός. Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, η ταχύτητα της αντίδρασης μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή της V_{max} , διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Η σφραγίδα γνησιότητας της συναγωνιστικής αναστολής είναι ότι η δράση του αναστολέα μπορεί να υπερνικηθεί από αρκετά υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος. Εντούτοις, η φαινομενική τιμή της K_M μεταβάλλεται. Αυτή η νέα τιμή της K_M είναι αριθμητικά ίση με:

$$\text{φαινομενική } K_M = K_M (1 + [I] / K_i)$$

(όπου [I] είναι η συγκέντρωση του αναστολέα και K_i είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα)

Καθώς αυξάνεται η τιμή [I], αυξάνεται και η τιμή K_M , αλλά η V_{max} δεν επηρεάζεται.

Η εξίσωση Michaelis - Menten στο σύστημα με συναγωνιστική αναστολή είναι της μορφής:

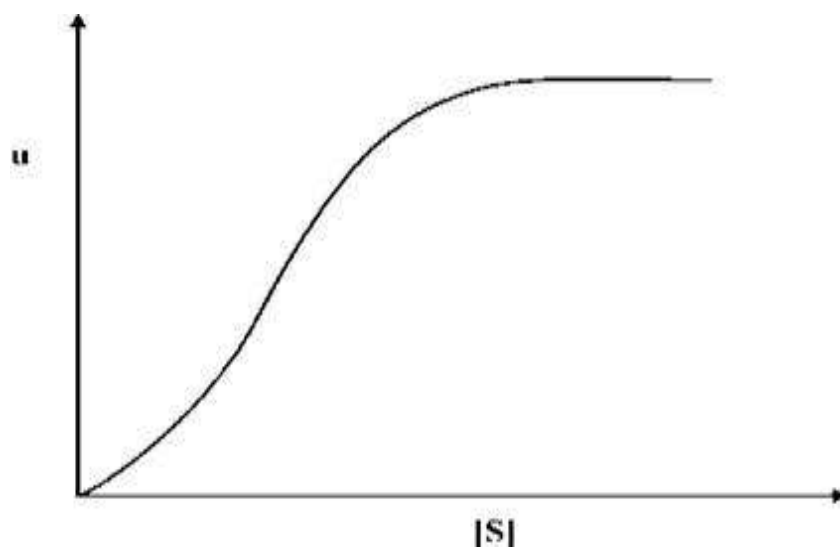
$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M (1 + [I]/K_i)}$$

Παρατηρούμε ότι η μέγιστη ταχύτητα V_{max} δεν μεταβάλλεται, ενώ η τιμή της σταθεράς Michaelis μεγαλώνει κατά το ποσό $([I]K_i + 1)$. Όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι μηδέν, ή όταν η σταθερά K_i , που ορίζεται ως η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI, είναι πολύ μικρή, δηλαδή υπάρχει μικρή αγχιστεία μεταξύ ενζύμου και αναστολέα, δεν φανερώνεται η αναστολή, με αποτέλεσμα η K_M να είναι φυσιολογική. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι τόσο μεγάλη, δηλαδή η [S] πάει να πάρει την τιμή που μας δίνει η μέγιστη ταχύτητα, ώστε ο όρος K_i να γίνεται πάλι μηδαμινός, με αποτέλεσμα η φυσιολογική V_{max} να μη μεταβάλλεται. Λόγω λοιπόν της μορφής του παρονομαστή στην εξίσωση, η μεγαλύτερη αναστολή εμφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα, δηλαδή η τιμή της [I], είναι ψηλή ή όταν η τιμή της [S] είναι χαμηλή. Αντίθετα, η αναστολή εξαφανίζεται όταν η συγκέντρωση του αναστολέα είναι πολύ χαμηλή ή όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ ψηλή [Γεωργάτσος, Γιουψάνης, Κυριακίδης 2001] [Γεωργάτσος, 2005].

Στη **μη-συναγωνιστική αναστολή**, το υπόστρωμα μπορεί να προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα. Εντούτοις, το σύμπλοκο ενζύμου-αναστολέα-υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Δεδομένου ότι ο αναστολέας συνδέεται σε διαφορετική περιοχή από αυτήν του υποστρώματος, η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος δεν ωφελεί. Στην ουσία ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου. Το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου. Η K_M δεν επηρεάζεται αλλά η V_{max} ελαττώνεται. Η μη-συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να υπερνικηθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος [Stryer L, 2012].

Η κινητική Michaelis-Menten, όπως έχει τροποποιηθεί και επεκταθεί για να περιλαμβάνει και αντιστρεπτές αντιδράσεις και αντιδράσεις δύο ή περισσότερων υποστρωμάτων, ισχύει για πάρα πολλές ενζυμικές αντιδράσεις. Τα **αλλοστερικά ένζυμα** όμως δεν υπακούουν σε αυτή. Τα αλλοστερικά ένζυμα αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες και πολλαπλά ενεργά κέντρα και δίνουν μια σιγμοειδή σχέση ανάμεσα στην αρχική ταχύτητα αντίδρασης (V_o) και στη συγκέντρωση

του υποστρώματος [S] (Εικόνα 22). Σε ένα αλλοστερικό ένζυμο η σύνδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο μιας υπομονάδας αλλάζει τη μοριακή του διαμόρφωση. Η αλλαγή αυτή μεταδίδεται στις άλλες υπομονάδες συνεργειακά και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ή μειωμένη δραστικότητα των άλλων υπομονάδων για τη σύνδεση άλλων μορίων υποστρώματος. Επιπλέον, η δραστικότητα των αλλοστερικών ενζύμων μπορεί να μεταβληθεί από ρυθμιστικά μόρια που προσδέονται αντιστρεπτά σε ειδικές περιοχές, διαφορετικές από τα καταλυτικά κέντρα και μπορεί να επηρεάσει την ενζυμική ενεργότητα. Συνήθως οι αλλοστερικοί τροποποιητές επηρεάζουν την τάση σύνδεσης της ενεργής περιοχής με το υπόστρωμα, υπάρχουν ωστόσο και αλλοστερικά συστήματα στα οποία αλλάζει η ταχύτητα μετατροπής του συμπλόκου ES σε προϊόντα. Η σταθερά Michaelis K_M δεν χρησιμοποιείται με αλλοστερικά ένζυμα [Stryer L, 2012].



Εικόνα 22: Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου: Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν σιγμοειδή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος [Stryer L, 2012].

4. Σκοπός εργασίας

Η αύξηση αριθμού των ασθενών που πάσχουν από ΣΔτ2 έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με στόχο την ανακάλυψη νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών σκευασμάτων, τα οποία έχουν ως στόχο τα ένζυμα και τους υποδοχείς που συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα [Kurukulasuriya et al, 2003].

Το ήπαρ είναι ένα όργανο που έχει ως σκοπό να αποκαθιστά της ενεργειακές ανάγκες των άλλων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (hIGP), ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, αποτελεί έναν ισχυρό υποψήφιο μοριακό στόχο για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων για τον έλεγχο της υπεργλυκαιμίας στο ΣΔτ2. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της hIGP, καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό, λόγω του κεντρικού της ρόλου στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου και την απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς γι' αυτό το ρόλο που διαδραματίζει, η hIGP αξιοποιείται ως ένα μοντέλο για το σχεδιασμό ισχυρών αναστολέων της, (GPIs), ως πιθανοί νέοι υπογλυκαιμικοί παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ενδογενή ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση. Η αναστολή του ενζύμου αυτού έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου και τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών με ΣΔτ2 [Treadway et al., 2001] [Agius et al., 2001] [Kristiansen M, 2004].

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο *εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας* με στόχο τη μελέτη του ενζύμου της GP για την κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών παραγόντων. Η μετέπειτα εφαρμογή μεθόδων πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης-σύνθεσης γλυκογόνου στο ΣΔτ2. Η βιοχημική μελέτη του ενζύμου αποτελεί σήμερα μία πορεία εργασιών με στόχο την ανακάλυψη ουσιών με δύο κυρίως χαρακτηριστικά: υψηλή εκλεκτικότητα και υψηλή συγγένεια για την πρωτεΐνη-στόχο.

5. Υλικά και μέθοδοι

5.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μύες κονίκλων

Η απομόνωση έγινε με τροποποίηση της μεθόδου Fisher & Krebs. Αντί της L- κυστεΐνης χρησιμοποιείται 2 μερκαπτοαιθανόλη σε όλα τα στάδια της πορείας του καθαρισμού.

Υλικά :

- Τρεις αρσενικοί κόνικλοι της ποικιλίας *oryztolacus cunicullus*
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου 50:50:1 (50mM φωσφογλυκερόλης, /HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου KHCO_3
- Διάλυμα οξικού οξέος CH_3COOH 1 N
- Διάλυμα 90 % w/v θειικού αμμωνίου $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 2M (χωρίς ρύθμιση pH)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris [τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου]/HCl 0,001 M pH 7,5
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0,3 M, pH 7.0
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0,1 M , pH 7.0
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0,1 M , pH 7.0
- Διάλυμα $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης

Όργανα

- Αναλυτικός ζυγός
- Πεχάμετρο
- Φυγόκεντρος
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο

Διαδικασία :

Βήμα 1^ο: Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση ενζύμου από αυτόν

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μύες από τρεις κόνικλους. Οι μύες αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται τρεις εκχυλίσεις με απιονισμένο ύδωρ εν ψυχρώ. Οι δύο πρώτες με όγκο ύδατος αριθμητικά ίσο με το βάρος των μυών και η τρίτη με όγκο ύδατος ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική

διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνά τα 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που συλλέγεται διηθείται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση αιωρούμενων σωματιδίων και λιπών.

Βήμα 2^ο : Όξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH₃COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 λεπτά σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των διάφορων πρωτεϊνών η θολρότητα του εκχυλίματος αυξάνει. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση στα 5000rpm για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 0-4 °C. Ακολουθεί η διήθηση του υπερκείμενου υγρού με τη βοήθεια της αντλίας κενού σε χωνί Buchner εν ψυχρώ για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH στο 6.8 με χρήση κορεσμένου KHCO₃ και το διάλυμα ογκομετρείται.

Βήμα 3^ο : Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειικό αμμώνιο κορεσμού 41% με προσθήκη όγκου διαλύματος θειικού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε λίτρο ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για περίπου 16 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 5000rpm για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διαλυτοποιείται στον ελάχιστο δυνατό όγκο απιονισμένου ύδατος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί διαπίδυση στους 4°C έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Tris 0.001M (pH 7.5) για 16 ώρες.

Βήμα 4^ο : Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 5500 rpm για 30 λεπτά στους 0-4 °C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 2-μερκαπτοαιθανόλης 0,3 M pH 7 όγκου ίσο με το 1/9 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος EDTA 0.1M pH 7.0 ίσο με το 5x10⁻³ του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης και αλκαλικού διαλύματος Tris για ρύθμιση του pH σε 8,8. Μετά από επώαση του μίγματος στους 37 °C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH₃COOH 1 N, για ρύθμιση του pH στο 7. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 15000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 0-4 °C και το υπερκείμενο διάλυμα ογκομετρείται

Βήμα 5^ο : Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με τη προσθήκη 1 ml AMP 0,1 M pH 7 και (CH₃COO)₂Mg 1 M pH 7 ανά 100 mL υπερκείμενου διαλύματος εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης. Το μίγμα αφήνεται στους 0 °C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου. Στη συνέχεια οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρηση στους 1550 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 0-4 °C και διαλυτοποιούνται σε θερμοκρασία 30 °C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραιώσης (διάλυμα 50:50:1 β-μερκαπτοαιθανόλη/ β-GP/ EDTA pH 6,8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται σε ταχύτητα 17500 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 25-30 °C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων. Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με προσθήκη AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ όπως και στη κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση σε θερμοκρασία 0-4 °C για 6 ώρες. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP και $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$.

Βήμα 6° : Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης β γλυκογόνου μετά τη τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30 °C. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της φωσφορυλάσης με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης (100%). Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -20 °C.

5.2 Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

5.2.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας GPb

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

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου (n κατάλοιπα) προς γλυκογόνο (n-1 κατάλοιπα) και απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης. Στο πειραματικό μέρος διεξάγεται η αντίθετη αντίδραση. Παρουσία δηλαδή του ενζύμου, μόρια 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και απελευθερώνονται ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi) η συγκέντρωση των οποίων μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά

Διαδικασία :

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα λαμβάνεται και αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1 (50 mM β-φωσφογλυκερόλη, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 mM EDTA). Πιο συγκεκριμένα, 10 μL ενζύμου αραιώνονται με 1000 μL του ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Στη συνέχεια με τη βοήθεια του φασματοφωτομέτρου μετρούμε την απορρόφηση του σε μήκος κύματος 280 nm και διαιρούμε αυτή τη τιμή με την ειδική δραστηριότητα της φωσφορυλάσης. Η τελική τιμή αποτελεί τη συγκέντρωση σε mg/mL.

Στη συνέχεια παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα. Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται το ενζύμου, γλυκογόνο 0,2% (w/v), νερό και ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1. Αφότου παρασκευαστεί το ενζυμικό διάλυμα επώάζεται για 15 λεπτά στους 30 °C.

Ακολουθεί η παρασκευή των υποστρωμάτων. Οι διάφοροι σωλήνες διαφέρουν μεταξύ τους μόνο ως προς τη συγκέντρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης (9 mM, 18 mM, 27 mM, 45 mM και 90 mM). Περιέχουν 200 μ L 1-P γλυκόζης, 18 μ L AMP και 502 μ L dH₂O. Στη συνέχεια επωάζονται για 3 λεπτά στους 30 °C.

Μετά την επώαση, 180 μ L από το ενζυμικό μίγμα προστίθεται στον σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Ανά ένα λεπτό λαμβάνονται 200 μ L από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μ L SDS 1% (w/v). Το SDS είναι ισχυρό απορρυπαντικό και έχει την ικανότητα να αποδιατάσσει το ένζυμο και να σταματά η αντίδραση. Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων με τη μέθοδο που θα αναλυθεί παρακάτω. Μετρώντας τα ορθοφωσφορικά ιόντα, ουσιαστικά μετρούμε και την δραστικότητα του ενζύμου. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε 5 μ g ενζύμου ανά mL, 1 mM AMP, 0,2% w/v γλυκογόνο, 2 mM 1-P γλυκόζη, 100 mM KCl και 1 mM DTT. Η θερμοκρασία στη οποία εκτελείται το πείραμα είναι 30 °C και το pH 6,8.

5.2.2 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (K_m)

Η σταθερά Michaelis-Menten ορίζεται ως η συγκέντρωση εκείνη του υποστρώματος που επιτρέπει στη καταλυτική αντίδραση να προχωρεί με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας. Όσο πιο μεγάλη η K_m τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να πετύχουμε τη μισή από τη μέγιστη ταχύτητα [Ενζυμολογία Ι.Γ.Γεωργατσός 2001]. Η σταθερά αυτή αποτελεί μέτρο της συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμα. Για να υπολογιστεί, απαιτείται η κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων υποστρώματος.

Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25 μ g ενζύμου/mL, γλυκογόνο 5% (w/v) και το ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1. Στη συνέχεια ετοιμάζονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες όπου καθένας θα περιέχει διαφορετική συγκέντρωση α -D-Glc-1-P. Θα προστεθούν λοιπόν, 200 μ L από τις συγκεντρώσεις 2, 4, 6, 10 και 20 mM, 18 μ L AMP 50mM και 502 μ L H₂O.

Το ενζυμικό διάλυμα αφήνεται για επώαση στους 30 °C για 15 λεπτά και τα υποστρώματα για 3 περίπου λεπτά. Η αντίδραση θα ξεκινήσει όταν προστεθούν 180 μ L ενζυμικού διαλύματος στους σωλήνες των υποστρωμάτων. Στη συνέχεια κάθε ένα λεπτό λαμβάνονται δείγματα των 200 μ L από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μ L SDS 1% (w/v).

Στα δείγματα γίνεται φασματοφωτομέτρηση ώστε να προσδιοριστούν τα ορθοφωσφορικά ιόντα με τη μέθοδο που θα περιγραφεί παρακάτω. Εκτός από τα δείγματα γίνεται και προσδιορισμός φωσφόρου και στα τυφλά.

5.2.3 Προσδιορισμός IC50 αναστολέα.

Η σταθερά IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει τη μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στη περιοχή του IC₅₀ και για συγκεκριμένη συγκέντρωση G1P (1-P γλυκόζη)

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας της σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων. Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της φωσφορυλάσης λειτουργούν σύμφωνα με την πλήρως συναγωνιστική αναστολή αφού η σύνδεση τους στο καταλυτικό κέντρο εμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος. Σύμφωνα με το μοντέλο της πλήρους συναγωνιστικής αναστολής ο αναστολέας συνδέεται με το υπόστρωμα και εμποδίζει το σχηματισμό συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος .

Όργανα

- Υδατόλουτρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Συσκευή vortex
- Πεχάμετρο
- Χρονόμετρο
- Πεχαμετρικό χαρτί

Υλικά :

Απιονισμένο ύδωρ

Διάλυμα ενζύμου

Διάλυμα 1-Φωσφορικής γλυκόζης 18mM

Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης AMP 50 mM

Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου 50:50:1 pH 6,8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης(β-GP) , 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA

Γλυκογόνο 1% (w/v)

Διάλυμα SDS 1% (w/v)

Διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων (Pi) 1 mM pH 6,8

Διάλυμα ασκορβικού οξέος

Διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου

Διάλυμα όξινου ψευδαργύρου

5.2.4 Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε γλυκερόλη παίρνουμε 10 μ L και το αραιώνουμε σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος 50:50:1. Το διάλυμα φωτομετρείται σε μήκος κύματος 280 nm για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης της GPb με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής $b=1$ cm. Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ενζύμου είναι 1.32 και η επιθυμητή συγκέντρωση του ενζύμου είναι 25 μ g/mL οπότε υπολογίζεται ο όγκος του ενζύμου που απαιτεί το πείραμα.

Ακολούθως, παρασκευάζεται το ενζυμικό διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει την GPb (25 μ g/mL), απιονισμένο νερό, γλυκογόνο 10% w/v και το ρυθμιστικό διάλυμα 50:50:1. Έτσι με τη προσθήκη του ενζυμικού στο υπόστρωμα η αντίδραση πραγματοποιείται στις εξής συνθήκες : GPb 5 μ g/ mL, γλυκογόνο 0,2 % w/v AMP 1 mM , α -D- Glc-1-P σταθερής συγκέντρωσης και αναστολέα μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης. Το ενζυμικό διάλυμα τοποθετείται για επώαση για 15 λεπτά στους 30 °C.

5.2.5 Διαλυτοποίηση παραπροϊόντων χυμοποίησης ροδιού σε διάλυμα DMSO

Ζυγίζονται 5 mg της ουσίας του αναστολέα και διαλύονται σε 80 μ L ενός οργανικού διαλύτη (DMSO). Το pH ρυθμίζεται περίπου στο 6,8 με πεχαμετρικό χαρτί με διάλυμα NaOH 0,1 M και γίνεται συμπλήρωση ως τα 100 μ L με DMSO. Η συγκέντρωση δηλαδή του stock είναι 50 mg/ml

Στη συνέχεια παρασκευάζονται διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, ώστε να βρεθεί η IC₅₀.

Η σταθερή συγκέντρωση της α -D-Glc-1-P είναι 9 mM, του AMP 50mM και του DMSO 100%. Μετά τη προσθήκη του ενζυμικού οι συγκεντρώσεις θα είναι : 2 mM ένζυμο, 1 mM AMP και 2% (v/v) DMSO. Στο τέλος συμπληρώνεται με ύδωρ έως τελικού όγκου 720 μ L.

	Control	Διάλυμα με αναστολέα
α-D-GIC-1-P (9mM)	200μL	
AMP	18μL	18μL
Αναστολέας		18μL
DMSO 100%	18μL	
H₂O	484μL	484μL
Τελικός όγκος (V_τ)	720μL	720μL

Πίνακας 1

Επίσης παρασκευάζεται και ένα διάλυμα ελέγχου (control) το οποίο δε περιέχει αναστολέα.

5.2.6 Παρασκευή διαλυμάτων για τον προσδιορισμό φωσφόρου

Διάλυμα μολυβδαινίου:

Αποτελείται από 1,5 g μολυβδαινικό αμμώνιο και 1,75g οξικό ψευδάργυρο διαλυμένα σε 80mL απιονισμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 5 με HCl 10N. Το διάλυμα θα τοποθετηθεί σε σκούρο μπουκάλι γιατί είναι φωτοευαίσθητο

Διάλυμα ασκορβικού οξέος:

Για τη παρασκευή του διαλύονται 2g ασκορβικού σε τελικό όγκο 20mL. Το pH ρυθμίζεται στο 5 με NaOH 10N. Το διάλυμα θα τοποθετηθεί επίσης σε σκούρο μπουκάλι γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Στη συνέχεια ενώνουμε τα δυο διαλύματα σε αναλογία 4:1 και επωάζουμε για 15 λεπτά στους 30°C.

5.2.7 Πειραματική διαδικασία:

Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 180 μL από το ενζυμικό διάλυμα σε χρόνο 0 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει υπόστρωμα όγκου 720 μL ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Στη συνέχεια ανά 1 λεπτό λαμβάνονται από 200 μL του διαλύματος και μεταφέρονται σε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50 μL SDS 1% (w/v). Λόγω της παρουσίας του SDS σταματά η αντίδραση καθώς το απορρυπαντικό αποδιατάσσει και αδρανοποιεί το ένζυμο. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε διαφορετική συγκέντρωση του αναστολέα.

Στα δείγματα στη συνέχεια θα προστεθούν 2,5 mL διαλύματος ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου, ανά ίσα χρονικά διαστήματα και ανάμεσα στις τοποθετήσεις πραγματοποιείται σύντομη ανάδευση με τη βοήθεια της συσκευής vortex και τοποθετείται το καθένα πίσω στο υδατόλουτρο όπου θα επωαστούν για άλλα 15 λεπτά σε θερμοκρασία 30 °C. Στη συνέχεια ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm. Από τα αποτελέσματα των φωτομετρήσεων

υπολογίζεται ο αριθμός των Ρi που έχουν απελευθερωθεί. Τα αποτελέσματα αυτά θα επεξεργαστούν μέσω του προγράμματος Graffit προκειμένου να προσδιοριστεί η IC₅₀.

5.2.8 Προσδιορισμός φωσφόρου

Η κινητική μελέτη του ενζύμου πραγματοποιείται λόγω της απελευθέρωσης ορθοφωσφορικών ιόντων κατά τη πορεία του σχηματισμού του γλυκογόνου. Ο προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών ιόντων γίνεται με τη μέθοδο του ασκορβικού οξέος. Αυτή στηρίζεται στον σχηματισμό έγχρωμης ετεροπολυμεταλλικής ένωσης σε ήπιο όξινο περιβάλλον παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850 nm.

5.2.9 Παρασκευή τυφλών

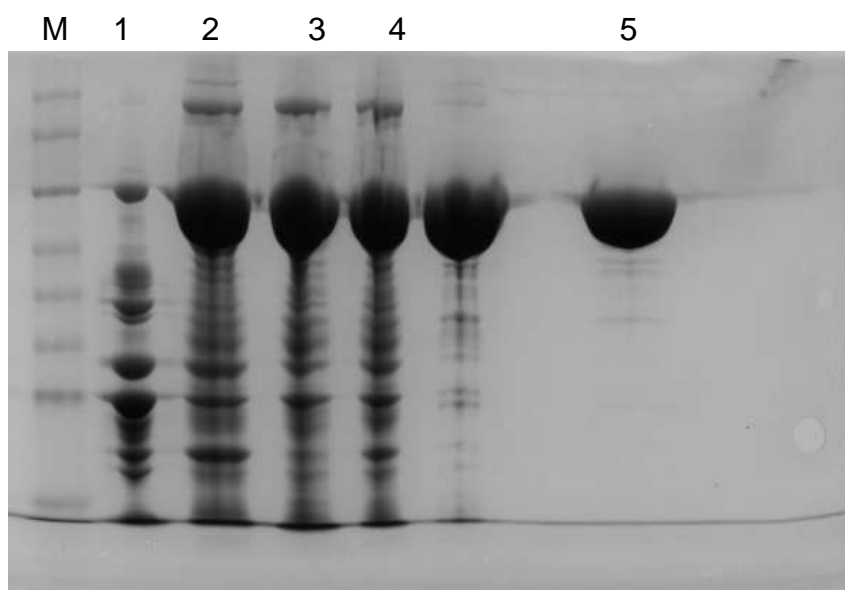
Η μέθοδος προσδιορισμού της IC₅₀ βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν από την αντίδραση σχηματισμού του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb. Στη μέτρηση των απορροφήσεων χρειάζεται να μην ληφθούν υπόψη οι απορροφήσεις λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων που δεν προκύπτουν από τη δράση της GPb. Για το λόγο αυτό απαιτείται η μέτρηση διαλυμάτων ελέγχου. Παρασκευάζονται λοιπόν τα παρακάτω διαλύματα έλεγχου:

- νερού για τον μηδενισμό του φωτομέτρου
- ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα
- Glc-1-P λόγω της υδρόλυσης της
- γλυκογόνο λόγω της πιθανής ύπαρξης φωσφορικών ιόντων
- γνωστής συγκέντρωσης Ρi

6. Αποτελέσματα

6.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου (GPb):

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



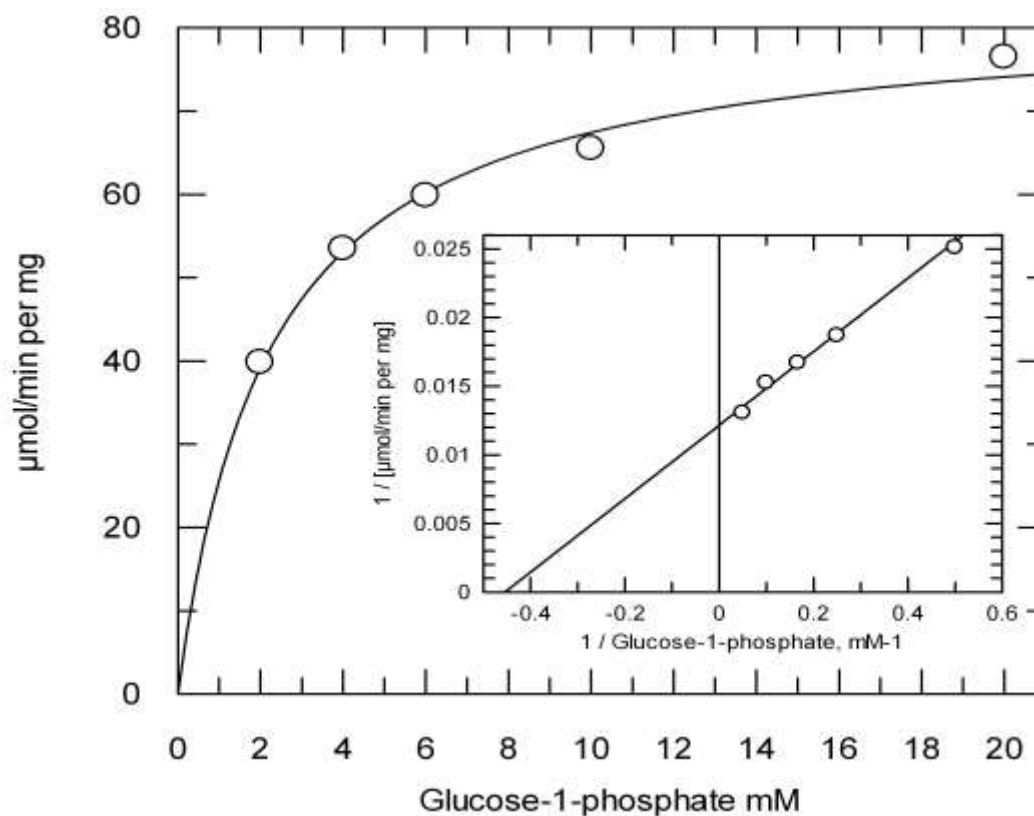
Εικόνα 23 : Ηλεκτροφόρηση πηκτής δειγμάτων του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, σε κάθε βήμα της απομόνωσης της GPb. Αρχικά εμφανίζεται ο μάρτυρας. Στην πρώτη διαδρομή εμφανίζεται το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μετά την όξινη καταβύθιση. Στην δεύτερη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την καταβύθιση με θειικό αμμώνιο. Στην τρίτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την θερμική κατεργασία σε υψηλό pH . Στην πέμπτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη (GPb).

6.2 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων:

6.2.1 Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου:

Η σταθερά Km (σταθερά Michaelis-Menten) 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 Km ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}). Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της Km.

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=2.2 \pm 0.25$ mM και $V_{max}=82.24 \pm 2.4$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Στη παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G1P).



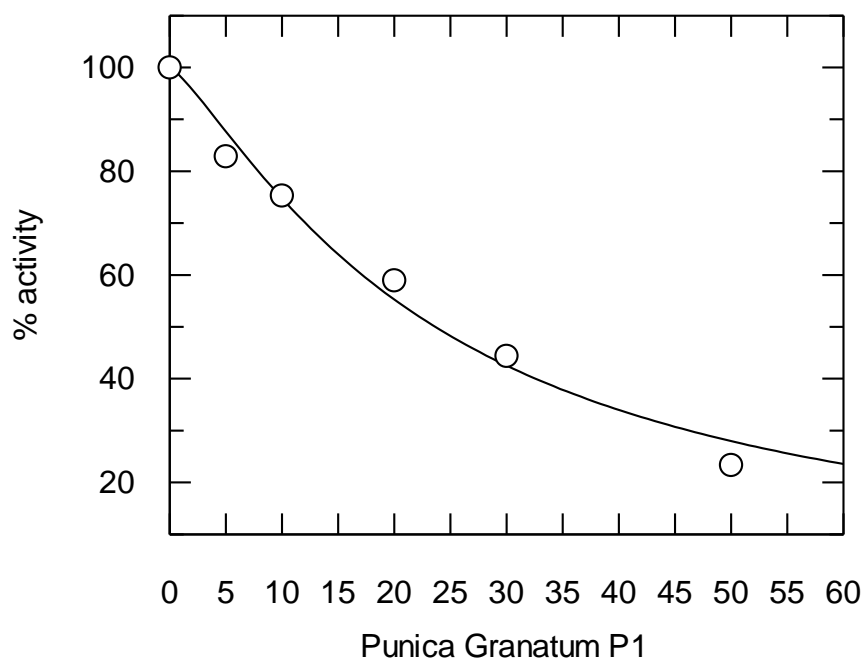
Εικόνα 24: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης β του γλυκογόνου (GPb), σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος της Glc-1-P [2, 4, 6, 10, 20 mM], στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση AMP [50mM] και γλυκογόνου 0.2% w/v . Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

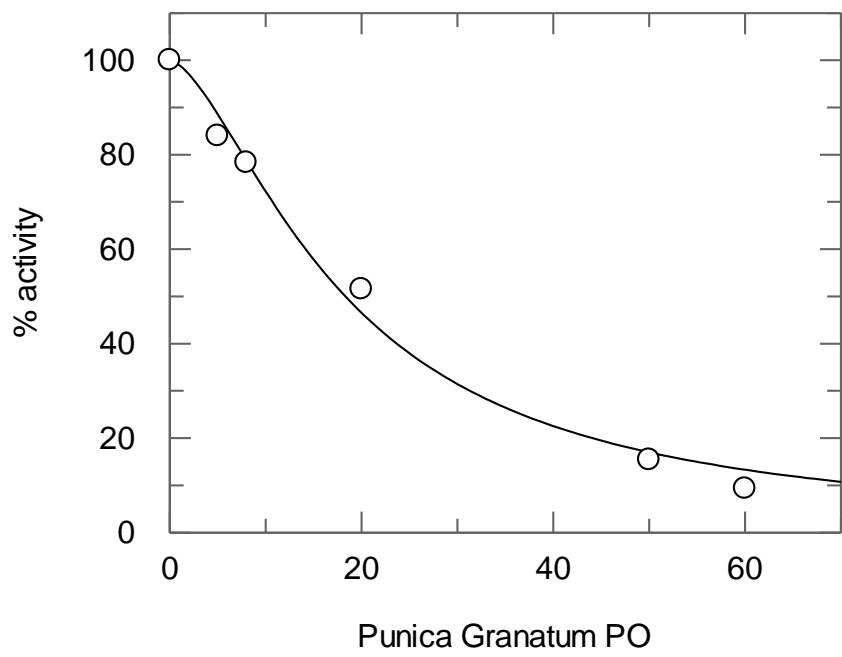
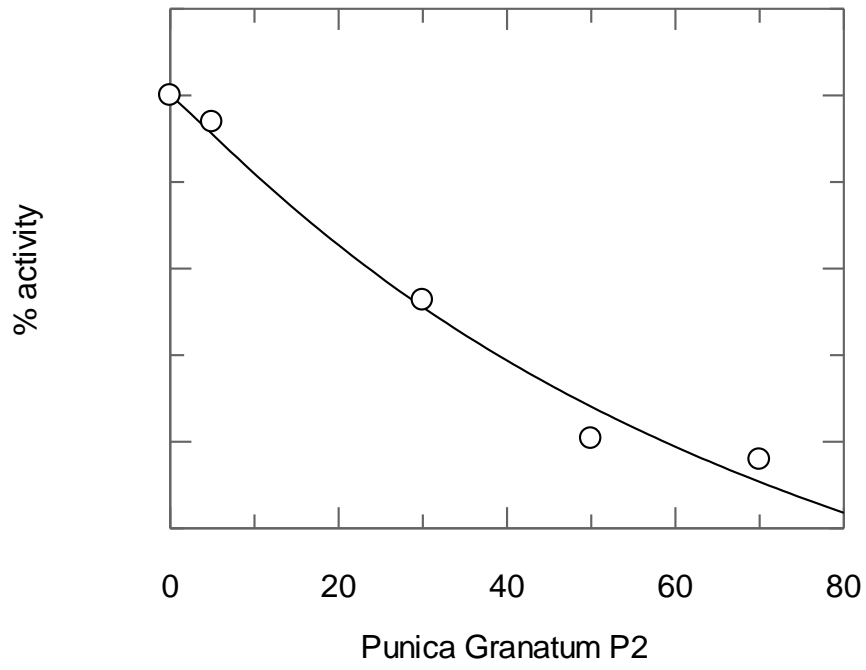
6.2.2 Κινητική μελέτη εκχυλισμάτων παραπροϊόντων επεξεργασίας ροδιού:

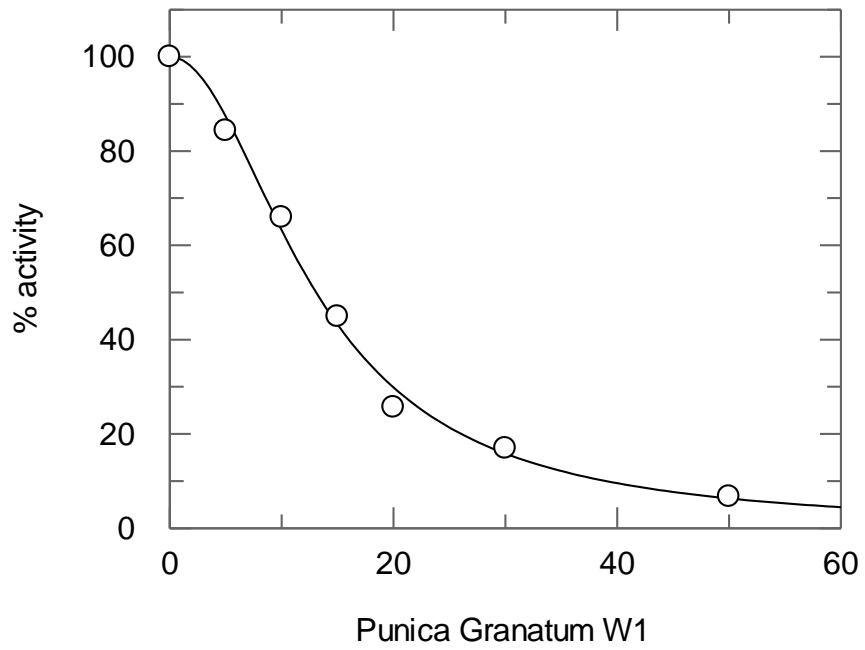
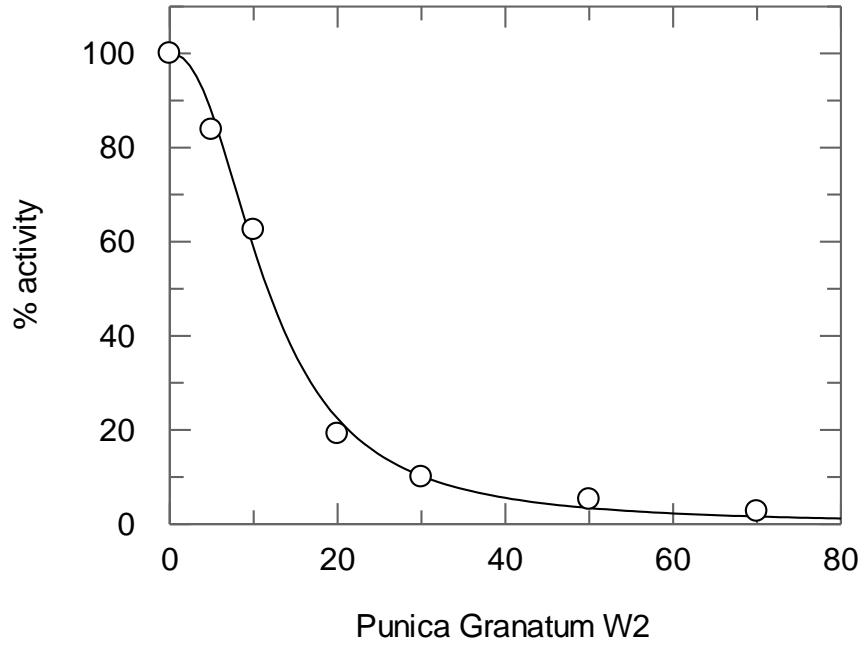
Για το σκοπό της εργασίας, πραγματοποιήθηκαν κινητικά πειράματα με τη φωσφορυλάση β του γλυκογόνου από μύες κονίκλων (rmGPb), προς τη κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, για να εκτιμηθεί η ανασταλτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ροδιού (*Punica Granatum*) ως προς τη δράση του ενζύμου. Ακολουθούν τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Grafit [Leatherberrow,1998]. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα εκχυλίσματα *Punica Granatum* που μελετήθηκαν καθώς και οι τιμές των IC_{50} .

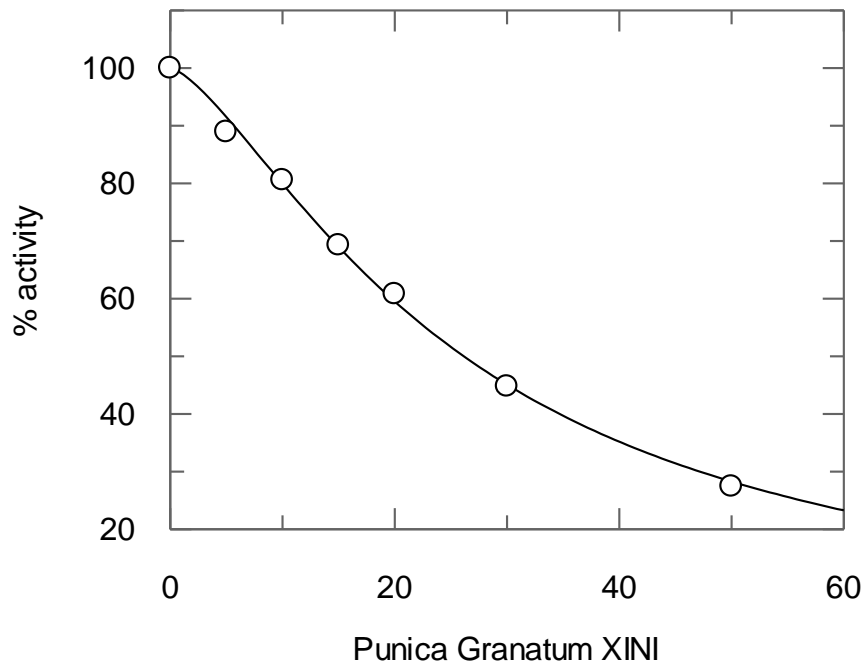
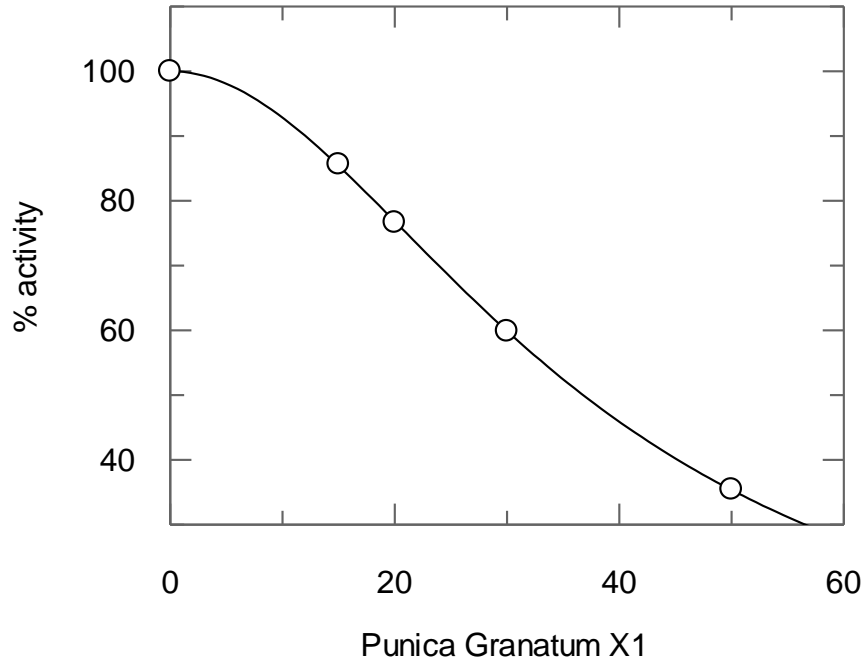
Οι πειραματικές συνθήκες και ο προσδιορισμός των IC₅₀ αναφέρονται στο πειραματικό μέρος. Η ενζυμική αντίδραση έλαβε χώρα σε σταθερές συγκεντρώσεις AMP [50mM], Glc-1-P [9mM] και σε διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων.

Εκχυλίσματα Ροδιών	IC₅₀ (μg/ml)
Ρόδι Π2	85,4 ± 9,3
Ρόδι ΠΟ	18,3 ± 1,3
Ρόδι W2	11,7 ± 0,5
Ρόδι X1	36,8 ± 0,1
Ρόδι W1	13,1 ± 0,4
Ρόδι Π1	23,7 ± 1.6
Ρόδι XINI	26.1 ± 0.5









7. Συμπεράσματα

Η παρούσα διατριβή αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας ως προς την ανασταλτική επίδραση φυτικών εκχυλισμάτων έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η βιοχημική μελέτη της GP στοχεύει στην κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών παραγόντων για τη θεραπεία του ΣΔτ2.

Για να εκτιμηθεί η ανασταλτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ροδιού (*Punica Granatum*) πραγματοποιήθηκαν κινητικά πειράματα με τη φωσφορυλάση b του γλυκογόνου από σκελετικούς μύες κονίκλων (rmGPb), προς τη κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, *in vitro*. Η κινητική μελέτη έδειξε ότι ορισμένα από αυτά τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50% (IC₅₀), σε σημαντικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Τα εκχυλίσματα ροδιού που μελετήθηκαν δείχνουν ικανά να αναστείλουν τη rmGPb, με το εκχύλισμα W2 να εμφανίζει αναστολή με IC₅₀=11.7 ± 0,5 μg/mL, και να αποτελεί το πλέον ισχυρό βιοενεργό εκχύλισμα από αυτά που δοκιμάστηκαν για να αναστείλει τη γλυκογονόλυση, μιας και η τιμή της IC₅₀ είναι γύρω στα 10 μg/mL. Το εκχύλισμα W1 παρουσίασε IC₅₀ παρόμοια με εκείνη του W2, γεγονός που δηλώνει επίσης ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (rmGPb) σε αποδεκτή συγκέντρωση [Kantsadi A.L. et al., 2014]. Το εκχύλισμα Π2 από την άλλη πλευρά, βρέθηκε να εμφανίζει αναστολή με αρκετά μεγάλη τιμή IC₅₀ γεγονός που δηλώνει ότι απαιτείται μια αρκετά υψηλή συγκέντρωση για αναστολή του ενζύμου, καθιστώντας τα συγκεκριμένα φυτικά εκχυλίσματα ροδιών όχι ιδιαίτερα σημαντικούς αναστολείς.

Η μετέπειτα εφαρμογή μεθόδων κρυσταλλογραφίας, των παραπάνω εκχυλισμάτων, για την ανάλυση της 3D δομής συμπλόκων ενζύμου-αναστολέα, σε υψηλή ευκρίνεια, θα μας βοηθήσει να ταυτοποιήσουμε τις βιοδραστικές ουσίες αυτών των εκχυλισμάτων καθώς και τα κέντρα σύνδεσής τους στο ένζυμο, με αποτέλεσμα την αναστολή του. Τέλος, με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας θα μπορέσουμε να μελετήσουμε το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ της πρωτεΐνης και των εκχυλισμάτων και να οδηγηθούμε στο σχεδιασμό ενώσεων υψηλής συγγενείας και ρυθμιστικής ικανότητας στην ισορροπία αποικοδόμησης και σύνθεσης του γλυκογόνου στο ΣΔτ2.

8. Βιβλιογραφία

- <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/type-2/>
- Κλινική Χημεία Marshall-Bangert εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης
- Stryer Lubert, Berg Jeremy, Tymoczko John (2012). *Βιοχημεία*. Ενιαίος Τόμος. Έκδοση 1^η. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο.
- Σμοκοβίτης Α. (2004). *Φυσιολογία*. Έκδοση 4η. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη. Θεσσαλονίκη
- Ιατρική Γενετική R.L Nussbaum, R.R. McInnes, H.F Willard , 2007 , εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης
- Δασκαλάκη Α. Ελένη. (2009). Σχεδίαση, Ανάπτυξη και In silico Συγκριτική Αξιολόγηση Ελεγκτών Κλειστού Βρόχου για Άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1. ΕΜΠ.
- Γεωργάτσος Ι.Γ. (2005). *Εισαγωγή στη βιοχημεία*. Έκδοση 6η. Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη.
- Γεωργάτσος Ι. Γ., Γιουψάνης Τ. Α., Δ. Α. Κυριακίδης (2001). *Ενζυμολογία*. Έκδοση 4η. Εκδόσεις ΖΗΤΗ.
- Οικονομάκος Ν. Γ. (1977). Χημική τροποποίηση ενός αλλοστερικού ενζύμου, Διδακτορική διατριβή. ΕΚΠΑ.
- Οικονομάκος Ν. Γ. (2001). Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, Χημικά Χρονικά. Vol 63: 258-261.
- Guyton C Arthur & Hall E John (2008). *Ιατρική Φυσιολογία*. Έκδοση 11η. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου. Αθήνα.
- Agius L., Aiston S., Hampson L., Gomez-Foix A.M., Guinovart J.J. (2001). Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis. *J Biol Chem*. Vol 276: 23858– 23866.
- American Diabetes Association (2001). Clinical practice recommendations: gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. Vol 24 (Suppl. 1): 77–79.
- American Diabetes Association (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. Vol 33 (Suppl. 1): 62–69.
- American Diabetes Association (2014). Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. Vol 37 (Suppl. 1): 14–80.
- American Diabetes Association (2015). Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. Vol 38 (Suppl. 1): 8–16.
- Baker D , Timmons J, Greenhaff P, Glycogen Phosphorylase Inhibition in Type 2 Diabetes Therapy *Diabetes*, Vol. 54, August 2005
- Banihani S. , Samer Swedan, Ziyad Alguraan , Pomegranate and type 2 diabetes. [Nutrition Research](#) ,Volume 33, Issue 5 Pages 341-348, May 2013
- Barford D., Hu S.H., Johnson L.N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase. *Nature*. Vol 340: 609–616.
- Coppack S., Patel J., Lawrence V. (2001). Nutritional regulation of lipid metabolism in human adipose tissue. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. Vol 109: (Suppl. 2): 202.

- Dimitriadis G., Boutati E., Lambadiari V., et al. (2004). Restoration of early insulin secretion after a meal in type 2 diabetes: effects on lipid and glucose metabolism. *Eur. J. Clin. Invest.* Vol 34: 490–7.
- Dimitriadis G., Mitrou P., Lambadiari V., et al. (2006). Glucose and Lipid Fluxes in the Adipose Tissue after Meal Ingestion in Hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Vol 91: 1112–8.
- Dimitriadis G., Mitrou P., Lambadiari V., et al. (2006). Insulin action in adipose tissue and muscle in hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Vol 91: 4930–7.
- Dube S., Errazuriz I., Cobelli C., Basu R., Basu A. (2013). Assessment of insulin action on carbohydrate metabolism: physiological and non-physiological methods. *Diabet. Med.* Vol 30(Suppl. 6): 664–670.
- Faria A. & Calhau C., *The Bioactivity of Pomegranate: Impact on Health and Disease*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51:626–634 (2011)
- Frayn K. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia.* Vol 45: 1201–10.
- Frayn K., Shadid S., Hamrani R., et al. (1994). Regulation of fatty acid movement in human adipose tissue in the postabsorptive-to-postprandial transition. *Am. J. Physiol.* Vol 266: 308–317.
- Gerich J.E., Charles M.A., Grodsky G.M. (1976). Regulation of pancreatic insulin and glucagon secretion. *Annu. Rev. Physiol.* Vol 38: 353–388.
- Hayes J., Kantsadi A., Leonidas D., Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes, *Phytochem Rev* (2014) 13:471–498
- Hampson L., Arden C, Agius L, Ganotidis M., Kosmopoulou M., Tiraidis C., Elemen Y., Sakarellos C, Leonidas D, Oikonomakos N., Bioactivity of glycogen phosphorylase inhibitors that bind to the purine nucleoside site, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (2006) 7835–7845, 2006
- International Diabetes Federation (2011). *Global Burden: Prevalence and Projections, 2011 and 2030.*
- Jensen M. (2002). Adipose tissue and fatty acid metabolism in humans. *J. R. Soc. Med.* Vol 95: (Suppl. 42): 3.
- Johnson L.N. (1992). Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *The FASEB Journal.* Vol 6 (Suppl. 6): 2274–2282.
- Johnson L.N., Hajdu J. (1989). Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals. *Biophysics & Synchrotron Radiation.* Hasnain S. edition. 142–155.
- Kantsadi A., Apostolou, S., Theofanous, G., Stravodimos, E., Kyriakis, V., Gorgogietas, D., Chatzileontiadou, K., Pegiou, V., Skamnaki, D., Stagos, D., Kouretas, A., Psarra, S., Haroutounian, D. Leonidas Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase, 2014
- Khan A.H., Pessin J.E. (2002). Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia.*

- Kitabchi A., G. Umpierrez J. Miles, J. Fisher Hyperglycemic Crises in Adult Patients With Diabetes, *Diabetes Care*, volume 32, number 7, June 2009
- Kosmopoulou, M.N., Leonidas, D.D., Chrysin, E.D., Eisenbrand, G., and Oikonomakos, N.G. (2005) Indirubin-3'-aminoxy-acetate inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor and the allosteric site. Broad specificities of the two sites. *Letters in Drug Design & Discovery*, in press.
- Kristiansen M., Andersen B., Iversen L.F., Westergaard N. (2004). Identification, synthesis, and characterization of new glycogen phosphorylase inhibitors binding to the allosteric AMP site. *J. Med. Chem.* Vol 47: 3537–3545.
- Kurukulasuriya R., Link J.T., Madar D.J., Pei Z., Richards S.J., Rohde J.J., Souers A.J., Szczepankiewicz B.G. (2003). Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of the hepatic glucose production. *Current Medicinal Chemistry*. Vol 10: 123–153.
- Kyriakis E., Stravodimos G., Kantsadi A., Chatzileontiadou D., Skamnaki V, Leonidas D. Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b, *FEBS Letters* 589 (2015) 1787–1794
- Liu Z., Barrett E. (2002). Human protein metabolism: its measurement and regulation. *Am. J. Physiol.* Vol 283: 105.
- McLaughlin P.J., Stuart D.I., Klein H.W., Oikonomakos N.G., Johnson L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. *Biochemistry*. Vol 23: 5862–5873.
- Melpidou A.E., Oikonomakos N.G. (1983). Effects of glucose-6-P on the catalytic and structural properties of glycogen phosphorylase a. *FEBS*. Vol 154: 105–110.
- Monod J., Changeux J.P., Jacob F. (1963). Allosteric Proteins and Cellular Control Systems. *J. Mol. Biol.* Vol 6: 306–329.
- Monod J., Wyman J., Changeux J.P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* Vol 12: 88–118
- Najjar S. (2001). *Insulin Action: Molecular Basis of Diabetes*. Encyclopedia of Life Sciences (John Wiley & Sons).
- Oikonomakos N.G. (2002). Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* Vol 3: 561–586.
- Oikonomakos N.G., Acharya K.R., Johnson L.N. (1992). Post-Translational Modifications of Proteins. Harding J.J. & Crabbe M.J. C. eds. CRC Press Inc. Boca Raton. Florida. 81–127.
- Oikonomakos N.G., Kosmopoulou M., Zographos S.E., Leonidas D.D., Chrysin E.D., Somsak L., Nagy V., Praly J.P., Docsa T., Toth B., Gergely P. (2002). The Binding of N-acetyl-N'-b-D-glucopyranosyl urea and N-benzoyl-N'-b-D-glucopyranosyl urea to glycogen phosphorylase b. Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* Vol 269: 1684–1696.
- Oikonomakos N.G., Schnier J.B., Zographos S.E., Skamnaki V.T., Tsitsanou K.E., Johnson L.N. (2000a). Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site. *J. Biol. Chem.* Vol 275: 3456634573.

- Oikonomakos N.G., Skamnaki V.T., Tsitsanou K.E., Gavalas N.G., Johnson L.N. (2000b). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure*. Vol 8: 575–84.
- Oikonomakos N.G., Somsak L., Opin C. (2008). *Invest. Drugs*. Vol 9: 379.
- Orskov C., Holst J.J., Poulsen S.S., Kirkegaard P. (1987). Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man. *Diabetologia*. Vol 30 (Suppl.11): 874–81.
- Palm D., Klein H., Schinzel R., Buehner M., and Helmreich E., The Role of Pyridoxal 5'-Phosphate in Glycogen Phosphorylase Catalysis, *Biochemistry* , Volume 29, Number 5 February 6, 1990
- Patzelt C., Schiltz E. (1984). Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment that contains two glucagon-like sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* Vol 81:5007–5011.
- Rath V.L., Amimirati M., Danley D.E., Ekstrom J.L., Gibbs E.M., Hynes T.R., Mthinowetz A.M., McPherson R.K., Olson T.V., Treadway J.L. and Hoover D.J. (2000). Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at new allosteric site. *Chemistry and Biology*. Vol 7 (Suppl. 9): 677–682.
- Rath V, M. Ammirati, P. LeMotte, Fennell K, Mansour M., Danley D., Hynes T., Schulte G., Wasilko D, and Pandit J., Activation of Human Liver Glycogen Phosphorylase by Alteration of the Secondary Structure and Packing of the Catalytic Core, *Molecular Cell*, Vol. 6, 139–148, July, 2000,
- Rath V.L., Newgard C.B., Sprang S.R., Goldsmith E.J. and Fletterick R.J. (1987). Modeling the biochemical differences between rabbit muscle and human liver phosphorylase. *Proteins Struct. Funct. Genet*. Vol 2: 225–235.
- Reece J., Campbell N. (2002). *Biology*. San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-8053-6624-5.
- Somsák L., Czifrák K., Tóth M., Bokor É., E.D. Chrysin, K.-M. Alexacou, J.M. Hayes, C. Tiraidis, E. Lazoura, D.D. Leonidas, S.E. Zographos and N.G. Oikonomakos, New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15, 2933-2983
- Steiner D.F., Oyer P.E. (1967). The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol 57 (Suppl. 2): 473–80.
- Steiner D.F., Philipson L.H. (2009). *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships*. NCBI.
- Virally M., J.-F. Blicklé, J. Girard, S. Halimi, D. Simon, P.-J. Guillausseau. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives, *Diabetes and Metabolism* 33 , 2007
- Woods S.C., Lutz T., Geary N., Langhans W. (2006). Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Phil. Trans. R. Soc. B*. Vol 361: 1219–1235.