



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



## **ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

# **ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ**

**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

**ΑΝΤΩΝΙΟΥ ΙΩΑΝΝΗΣ  
ΛΑΡΙΣΑ - 2017**

**ΝΕΕΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ: ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ  
ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ  
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:** Δρ.Λεωνίδας Δημήτριος

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ:** ΔΟΜΙΚΗΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**NEW PHARMACEUTICAL APPROACHES:  
BIOCHEMICAL AND STRUCTURAL STUDIES ON  
GLYCOGEN PHOSPHORYLASE**

**ΙΟΑΝΝΙΣ ΑΝΤΟΝΙΟΥ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- **Δρ. Δημήτριος Δ. Λεωνίδας(επιβλέπων)**  
Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- **Δρ. Βασιλική Θ. Σκαμνάκη**  
Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- **Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά**  
Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές που εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δε διατηρούνται σταθερά. Με σκοπό τη θεραπεία της παθολογικής αυτής κατάστασης, ένζυμα και υποδοχείς που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μοριακοί στόχοι για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για κάποιο κέντρο σύνδεσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εν δυνάμει αντιυπεργλυκαιμικά φάρμακα. Ένας από τους σημαντικότερους μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων είναι το ένζυμο φωσφορυλάση του γλυκογόνου.

Στη παρούσα διατριβή, απομονώθηκε το ένζυμο μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GPb) από σκελετικούς μύες κουνελιού, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε τριτερπένια. Έτσι, προσδιορίστηκε η σταθερά IC<sub>50</sub> των παρακάτω εκχυλισμάτων με κωδικούς TFC2\_54\_G, TFC2\_43\_G2 και TFC2\_43\_G3. Η μείωση που εμφανίστηκε εκφράστηκε ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής. Η παρούσα μελέτη μπορεί να αποτελέσει την αφετηρία για το σχεδιασμό νέων ενώσεων οι οποίες θα συνδέονται στο κέντρο αναστολής.

### Λέξεις-κλειδιά:

Σακχαρώδης Διαβήτης, γλυκογόνο, μεταβολισμός γλυκογόνου, φωσφορυλάση του γλυκογόνου, φυτικά εκχυλίσματα, ενζυμική κινητική

## **ABSTRACT**

Diabetes mellitus (DM) is one of the most serious hormonal imbalance that occurs when the blood glucose (sugar) in the blood is not kept constant. In order to treat the pathological condition, enzymes and receptors involved in the regulation of glucose used as molecular targets for the directed by the structure design of compounds that exhibit high affinity for binding a center and can be used as potential hypoglycemic agents. One of the most important molecular targets for the design of new hypoglycemic drugs is the liver enzyme glycogen phosphorylase.

In this thesis, rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase (GPb) was used to study to assess the inhibitory activity of three phytochemical extracts rich in triterpenoids by kinetic experiments. Thus, the IC<sub>50</sub> values of the extracts TFC2\_54\_G1, TFC2\_43\_G2, and TFC2\_43\_G3 were determined. The inhibition was expressed using known enzyme inhibition models. This study may be the starting point for the design of new anti-hyperglycaemic compounds.

**Keywords:** Diabetes, glycogen metabolism, glycogen phosphorylase, inhibitor, kinetics

## Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη .....	3
Abstract.....	4
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>8</b>
1.1 Ιστορική Αναδρομή Σακχαρώδη Διαβήτη(ΣΔ) .....	8
1.2 Γενικά ΣΔ .....	8
1.3 Τύποι ΣΔ .....	9
1.3.1 ΣΔτ1 .....	9
1.3.2 ΣΔτ2 .....	10
1.3.3 ΣΔ κύησης .....	11
1.4 Ινσουλίνη .....	11
1.4.1 Ιστορία Ινσουλίνης .....	11
1.4.2 Βιολογικός Ρόλος Ινσουλίνης .....	12
1.4.3 Μεταβολικές επιδράσεις ινσουλίνης .....	12
1.4.4 Αντίσταση στην Ινσουλίνη .....	13
1.5 Γλυκαγόνη .....	13
1.5.1 Φυσιολογικός Ρόλος της Γλυκαγόνης .....	14
1.5.2 Έκκριση Γλυκαγόνης .....	14
1.6 Μηχανισμός δράσης Ινσουλίνης και Γλυκαγόνης .....	14
<b>2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ .....</b>	<b>15</b>
2.1 Γλυκόζη .....	15
2.1.1 Γενικά .....	15
2.1.2 Μεταβολισμός Γλυκόζης .....	15
2.1.3 Ρόλος Γλυκόζης .....	15
2.1.4 Ομοίωση Γλυκόζης – Ρόλος Ινσουλίνης .....	16
2.1.5 Διέγερση γλυκόζης στην Ινσουλίνη από τα β-κύτταρα παγκρέατος..	16
2.2 Γλυκογόνο .....	16
2.2.1 Γενικά .....	16
2.2.2 Σύνθεση του Γλυκογόνου.....	17
2.2.3 Αποδόμηση Γλυκογόνου .....	17
2.2.4 Ρόλος της Φωσφορικής Πυριδοξάλης .....	18
<b>3. ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ (GP).....</b>	<b>19</b>
3.1 Γενικά.....	19
3.2 Δομή της GP.....	21
3.3 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις .....	22
3.4 Βιολογικός ρόλος της GP .....	22
3.5 Κέντρα σύνδεσης της GP .....	23
3.5.1 Κέντρο φωσφορυλίωσης της ser14 .....	23
3.5.2 Αλλοστερικό κέντρο .....	23
3.5.3 Καταλυτικό κέντρο .....	23
3.5.4 Κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαρίτων .....	23
3.5.5 Κέντρο αναστολής .....	24
3.5.6 Νέο αλλοστερικό κέντρο .....	24
3.6 Η φωσφορυλάση γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων....	24
<b>4. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ .....</b>	<b>25</b>

4.1 Αρχές ενζυμικής κινητικής .....	25
4.1.1 Ένζυμα.....	25
4.1.2 Σχέση ταχύτητας αντίδρασης προς συγκέντρωση υποστρώματος.....	26
4.1.3 Κινητική Michaelis-Menten.....	26
4.1.4 Σταθερά $IC_{50}$ .....	27
4.1.5 Καταλυτικές σταθερές $K_m$ και $V_{max}$ .....	28
4.2 Αναστολείς ενζυμικών αντιδράσεων .....	28
4.2.1 Αναστολείς .....	28
4.2.2 Τύποι ενζυμικών αντιδράσεων.....	29
<b>5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>31</b>
Υλικά και μέθοδοι .....	
5.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου βαπο σκελετικού μυς κουνελιού.....	31
5.1.1 Υλικά .....	31
5.1.2 Όργανα.....	32
5.1.3 Πορεία .....	32
5.2 Κινητική μελέτη του γλυκογόνου .....	33
5.2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GPb.....	33
5.2.2 Πορεία.....	33
5.3 Παρασκευή Δαλυμαμάτων .....	34
5.4 Προσδιορισμός M-M ( $K_m$ ) της GPb.....	34
5.4.1 Όργανα.....	34
5.5 Προσδιορισμός $IC_{50}$ Αναστολέα .....	34
5.5.1 Υλικά .....	35
5.5.2 Όργανα .....	35
5.5.3 Πορεία .....	35
5.6 Προσδιορισμός φωσφόρου .....	36
5.7 Παρασκευή τυφλών .....	36
5.8 Μέθοδος ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου .....	36
5.8.1 Υλικά .....	36
5.8.2 Πορεία .....	37
5.9 Επεξεργασία δεδομένων κινητικών πειραμάτων –πρόγραμμα Graffit.....	37
<b>6. ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>37</b>
<b>7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>38</b>
7.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης βτου γλυκογόνου .....	38
7.2 Μετατροπή της μυικής φωσφορυλάσης βτου γλυκογόνου σε a.....	38
7.3 Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου .....	39
7.4 Κινητική μελέτη $IC_{50}$ Αναστολέα .....	40
7.4.1 $IC_{50}$ (TFC2_54_G1).....	40
7.4.2 $IC_{50}$ (TFC2_43_G2).....	41
7.4.3 $IC_{50}$ (TFC2_43_G3).....	42
7.5 Συμπεράσματα .....	43
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>44</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....</b>	<b>50</b>

### Πίνακας Περιεχομένων για τις εικόνες

1. Αριθμός Ατόμων με διαβήτη παγκοσμίως .....	8
2. Συμπτώματα ΣΔτ2 .....	10
3. Μορφές ινσουλίνης.....	11
4. Απεικόνιση νησίδων.....	12
5. Συνοπτική παρουσίαση των αποκρίσεων τυπων κυτταρων .....	13
6. Μόριο γλυκαγόνης.....	14
7. Μηχανισμός δράσης ινσουλίνης και γλυκαγόνης.....	15
8. Δομή γλυκόζης.....	16
9. Δομή γλυκογόνου.....	17
10. Αποικοδόμηση γλυκογόνου .....	18
11. Μηχανισμός φωσφορύλασης αποικοδόμησης γλυκογόνου .....	19
12. Προτεινόμενος μηχανισμός φωσγορύλασης του γλυκογόνου απο την GP.....	20
13. Δεσμός βάσης Schiff της PLP.....	20
14. Αναπαράσταση ελέγχου δρασικότητας .....	22
15. Δομή της φωσγορύλασης ακαι b.....	23
16. Δομή GP.....	23
17. Κινητική M-M.....	29
18. Σχηματική IC <sub>50</sub> .....	30
19. Τρόποι δράσης αναστολέων .....	32
20. Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου .....	34
21. Ηλεκτροφόρηση πηκτης δειγμάτων GPb.....	43
22. Διάγραμμα κινητικής μελετης της GPb.....	44
23. Καμπύλη της δρασικότητας της συγκέντρωσης (TFC2_54_G1) και υπολογισμός της IC <sub>50</sub> .....	45
24. Καμπύλη της δρασικότητας της συγκέντρωσης (TFC2_43_G2) και υπολογισμός της IC <sub>50</sub> .....	46
25. Καμπύλη της δρασικότητας της συγκέντρωσης(TFC2_43_G3) και υπολογισμός της IC <sub>50</sub> .....	57

### Πίνακας Περιεχομένων για τους πίνακες

1. Συγκέντρωση x % της δρασικότητας του αναστολέα IC <sub>50</sub> (TFC2_54_G1).....	48
2. Συγκέντρωση x % της δρασικότητας του αναστολέα IC <sub>50</sub> (TFC2_43_G2).....	49
3. Συγκέντρωση x % της δρασικότητας του αναστολέα IC <sub>50</sub> (TFC2_43_G3).....	50

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ιστορική αναδρομή του Σακχαρώδη Διαβήτη :

Ο όρος "διαβήτης" αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Αρεταίο λόγω της συχνουρίας των διαβητικών [SaudiMedJ., 2002]. Το 1675 ο Βρετανός ThomasWillis ανακάλυψε τη γλυκιά γεύση των ούρων και του αίματος ασθενών, γεγονός που οφείλεται στη γλυκόζη, έτσι πρόσθεσε τη λέξη "σακχαρώδη" [Gale, E.A.M. ThomasWillis 2014 ]. Η συσχέτιση της γλυκιάς ουσίας των ούρων με το σάκχαρο, γίνεται μετά από 100 και περισσότερα χρόνια το 1776 από τον Άγγλο MatthewDobson. Εκείνος όμως που τελικά αποδεικνύει ότι το σάκχαρο των ούρων είναι γλυκόζη ήταν ο M. Chelreul το1815. Ένα σημαντικό ορόσημο στην ιστορία του διαβήτη είναι η καθιέρωση του ρόλου του ήπατος στη γλυκονεογένεση και η ιδέα ότι ο διαβήτης οφείλεται σε υπερβολική παραγωγή γλυκόζης. Ο ρόλος του παγκρέατος στην παθογένεση του διαβήτη αποκαλύφθηκε από τους JosephvonMering και OskarMinkowski το 1889 στην Αυστρία. Αργότερα, αυτή η ανακάλυψη αποτέλεσε τη βάση της απομόνωσης της ινσουλίνης και την κλινική της χρήση από τους SirFrederickBantingGrant και CharlesHerbertBest στον Καναδά το 1921 [SaudiMedJ 2002]. Ο Banting τιμάται στις 14 Νοεμβρίου, Παγκόσμια Ημέρα για το Διαβήτη, ενώ του απονεμήθηκε το βραβείο Νόμπελ το 1923. [Von Mehring J. & Minkowski O., 1890]

### 1.2 Γενικά για τον Σακχαρώδη Διαβήτη :

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι ένα σύνηθες χρόνια νόσημα των ενηλίκων που απαιτεί συνεχή ιατρική επίβλεψη. Ωστόσο, ανάλογα με τον τύπο του σακχαρώδη διαβήτη και την ηλικία του ατόμου, τόσο οι ανάγκες του όσο και η νοσηλευτική φροντίδα ενδέχεται να διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό [Medical–SurgicalNursingLemoneKarenBurke].

Ο ΣΔ σχετίζεται με την λειτουργία του παγκρέατος, το οποίο είναι ένας αδένας που βρίσκεται στον πίσω περιτοναϊκό χώρο και παράγει πολλές ορμόνες μεγάλης σημασίας. Πιο συγκεκριμένα, στην ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος, παράγονται η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη, που ρυθμίζουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο σώμα καθώς και άλλες ορμόνες οι οποίες συμβάλλουν στην πέψη ή στη διαδικασία με την οποία ο οργανισμός προβαίνει σε αποθήκευση ενέργειας από τις τροφές και στη ρύθμιση του σακχάρου του αίματος [Οικονομάκος Ν. Γ. (2001)]. Είναι σοβαρή ασθένεια με πολλαπλές επιπλοκές και πρόωρη θνησιμότητα. Ωστόσο, συνήθως σχετίζεται με την αδυναμία του ασθενή να παράγει ή και να χρησιμοποιεί ινσουλίνη, γεγονός που οδηγεί σε ψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα [DIABETES CARE, VOLUME 28, 2005]

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το Σακχαρώδη Διαβήτη (IDF), το έτος 2014 387 εκατομμύρια άνθρωποι έπασχαν από διαβήτη ενώ προβλέπεται ότι έως το 2035, ο



**Εικόνα 1 :** Αριθμός ατόμων με διαβήτη παγκοσμίως. IDF Diabetes Atlas Sixth Edition Update, International Diabetes Federation 2014



συνολικός αριθμός των πασχόντων θα ανέλθει σε 592 εκατομμύρια. Αυτό θα συμβεί γιατί ο παγκόσμιος πληθυσμός αυξάνεται, ζει περισσότερο, γίνεται πιο παχύσαρκος και αυξάνεται ολοένα και περισσότερο ο καθιστικός τρόπος ζωής. Η πιο σημαντική δημογραφική αλλαγή στον επιπολασμό του διαβήτη σε όλο τον κόσμο φαίνεται να είναι η αύξηση του ποσοστού των ατόμων ηλικίας >65 ετών. [Πετρωτός Κωνσταντίνος, Λάρισα, 2015] [Diabetes Care 2004]

### 1.3 Τύποι Σ.Δ

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης μπορεί να ταξινομηθεί σε δύο βασικούς τύπους και άλλες δύο μορφές :

- **ΣΔ τύπου I:** ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης ή νεανικός διαβήτης
- **ΣΔ τύπου II:** μη-ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης ή διαβήτης των ενηλίκων
- **Σακχαρώδης διαβήτης κύησης**
- **Άλλες ειδικές μορφές διαβήτη** οφείλονται σε γενετικές διαταραχές των β-κυττάρων, νοσήματα της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, φάρμακα, κλπ. που οφείλονται σε άλλες αιτίες, π.χ. γενετικές ανωμαλίες στη λειτουργία των β-κυττάρων, γενετικές διαταραχές στη δράση της ινσουλίνης, παθήσεις του εξωκρινούς παγκρέατος και αναφέρονται ως ώριμη έναρξη του νεανικού διαβήτη και όψιμος αυτοάνοσος διαβήτης των ενηλίκων [AmericanDiabetesAssociation. DiabetesCare 2014].

#### 1.3.1 Ο Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1

Χαρακτηρίζεται από απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης λόγω της μόνιμης καταστροφής των β-κυττάρων των παγκρεατικών νησίδων του Langerhans που εκκρίνουν την ινσουλίνη [DiabeticMedicine (2012)], [DiabetesCare, 2014].

Τα άτομα που πάσχουν από ΣΔ1 μπορεί να έχουν βαρύτερες ιατρικές επιπλοκές νωρίτερα από τους άλλους διαβητικούς. Για παράδειγμα, περίπου το 40% των ασθενών με διαβήτη τύπου 1 θα αναπτύξουν βαριά νεφρικά προβλήματα, που οδηγούν σε νεφρική ανεπάρκεια πριν την ηλικία των 50 ετών [AmericanDiabetesAssociation].

Το 90% των περιπτώσεων οφείλονται στη μεσολάβηση ανοσολογικού μηχανισμού, δηλαδή η διαταραχή αρχίζει ως μια χρόνια φλεγμονώδης διεργασία που συμβαίνει ως απάντηση στην αυτοάνοση καταστροφή των κυττάρων των νησιδίων. Η διεργασία αυτή αναστέλλει μακροπρόθεσμα την παραγωγή ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, με επακόλουθη έναρξη τη υπεργλυκαιμίας, η οποία συμβαίνει όταν καταστραφούν το 80-90% αυτών και λαμβάνει χώρα συνήθως σε μια μακρά προκλινική περίοδο. Πιστεύεται ότι οι λειτουργίες τόσο των α όσο και των β κυττάρων είναι παθολογικές, με έλλειψη ινσουλίνης και σχετική περίσσεια γλυκαγόνης, με αποτέλεσμα την υπεργλυκαιμία [Medical–SurgicalNursing].

Στο ΣΔ1, η καταστροφή των β παγκρεατικών κυττάρων είναι ταχεία κυρίως σε βρέφη και παιδιά, ενώ στους ενήλικες είναι πιο αργή. Στο τελευταίο στάδιο της νόσου, υπάρχει μικρή ή καθόλου έκκριση ινσουλίνης, η οποία εκδηλώνεται με χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στο πλάσμα. Το υπολειπόμενο C-πεπτίδιο μπορεί να ανιχνευθεί πάνω από 40 χρόνια μετά, ανεξάρτητα από το αν η αρχική διάγνωση έγινε κατά τη παιδική ηλικία ή την ενήλικη ζωή. Η κληρονομικότητα δε φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση του συγκεκριμένου τύπου διαβήτη. [DiabetesCare, 1997]

Η έναρξη της νόσου είναι αιφνίδια και συνήθως γίνεται αντιληπτή όταν παρουσιαστεί διαβητική κετοξέωση, μία ιδιαίτερα επικίνδυνη κατάσταση για τη ζωή του ασθενούς η οποία προκύπτει έπειτα από παρατεταμένη υπεργλυκαιμία, επακόλουθο της υπερβολικής διάσπασης του λίπους από τον οργανισμό ώστε να καλύψει τις ενεργειακές του ανάγκες αφού δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει τη γλυκόζη.

Η θεραπεία του ΣΔ1 συνίσταται στη χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης (ανθρώπινη ινσουλίνη η οποία παράγεται με τη τεχνολογία ανασυνδιασμένου DNA) σε ενέσιμη μορφή ή στη χρήση αντλιών έγχυσης παρέχοντας ινσουλίνη σε συνεχή έκκριση μιμούμενη τη βασική έκκριση της ορμόνης από τα β κύτταρα του παγκρέατος.

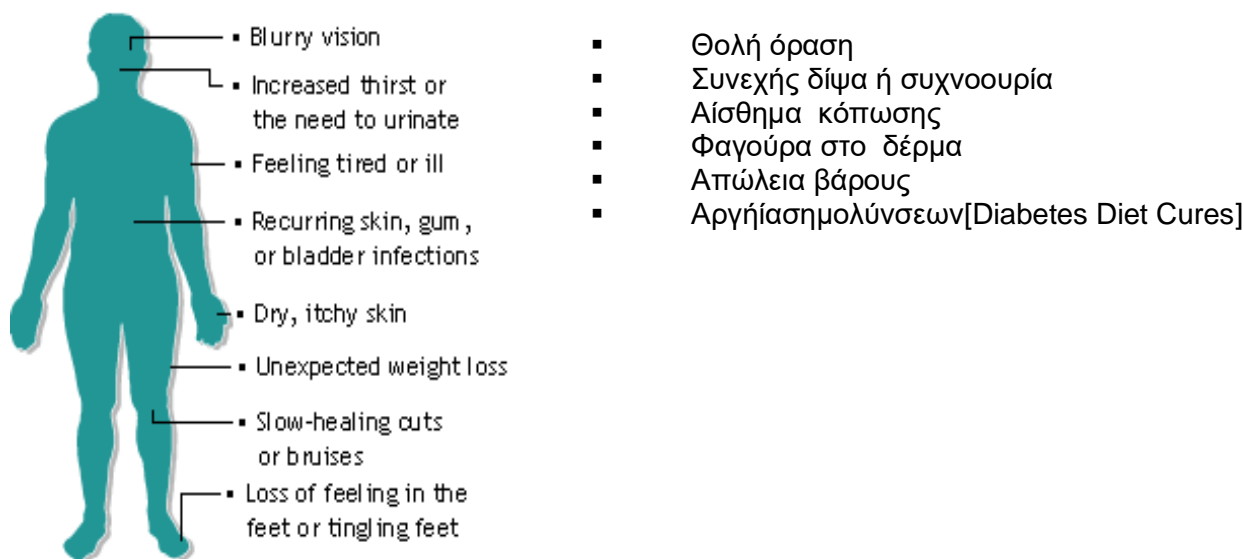
### 1.3.2 Ο Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2

Το 90% των περιστατικών διαβήτη ταυτίζεται με τον τύπου 2 . Παλιότερα ονομάζονταν σακχαρώδης διαβήτης των ενηλίκων ή μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης. Χαρακτηρίζεται από 4 ανωμαλίες του μεταβολισμού:

- παχυσαρκία
- μειωμένη δράση της ινσουλίνης
- δυσλειτουργία έκκρισης ινσουλίνης
- αύξηση της ενδογενούς γλυκόζης εξόδου

Χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία που οφείλεται σε ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης ή/και μειωμένη δραστηριότητα της ινσουλίνης σε διάφορους ιστούς όπως μυς, ήπαρ, και λιπώδης ιστός. Η αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία είναι συνήθως παρούσα πριν την έναρξη του κλινικού διαβήτη, καθορίζεται από έναν αριθμό παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της γενετικής, της ηλικίας, της παχυσαρκίας και αργότερα της ίδιας της υπεργλυκαιμίας. Η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να βελτιωθεί με μείωση του βάρους ή/και φαρμακολογική θεραπεία της υπεργλυκαιμίας, αλλά σπάνια αποκαθίσταται σε φυσιολογικά επίπεδα. Η ίδια η υπεργλυκαιμία επιδεινώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη και μειώνει την έκκρισή της. [Fonseca V.A., 2003]

Τα συμπτώματα του ΣΔ2 εμφανίζονται σταδιακά και μπορεί να είναι παρόμοια με εκείνα του ΣΔ1. Οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάζουν καθόλου ή ελάχιστη συμπτωματολογία για χρόνια πριν να διαπιστωθεί η νόσος.



**Εικόνα 2 :** Συμπτώματα ΣΔ2. Ως αποτέλεσμα, ο ΣΔ2 διαγιγνώσκεται αρκετά χρόνια μετά την έναρξη, αφού έχουν ήδη προκύψει επιπλοκές

Στις χρόνιες επιπλοκές της νόσου περιλαμβάνονται η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η διαβητική νεφροπάθεια που οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια, καρδιαγγειακές επιπλοκές όπως αθηροσκλήρωση και καρδιαγγειακή νόσο, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο και ανεπάρκεια της ροής του αίματος στα πόδια. Το υπερωσμωτικό μη κετονικό κώμα ανήκει στις οξείες επιπλοκές του διαβήτη τύπου 2. Σύμφωνα με την Ελληνική Ομοσπονδία για το Διαβήτη, τα άτομα που διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης ΣΔ2 είναι αυτά που εμφανίζουν κλινικά στοιχεία του μεταβολικού συνδρόμου όπως υπέρταση, αύξηση της περιφέρειας μέσης και διαταραχές των λιπιδίων του αίματος.

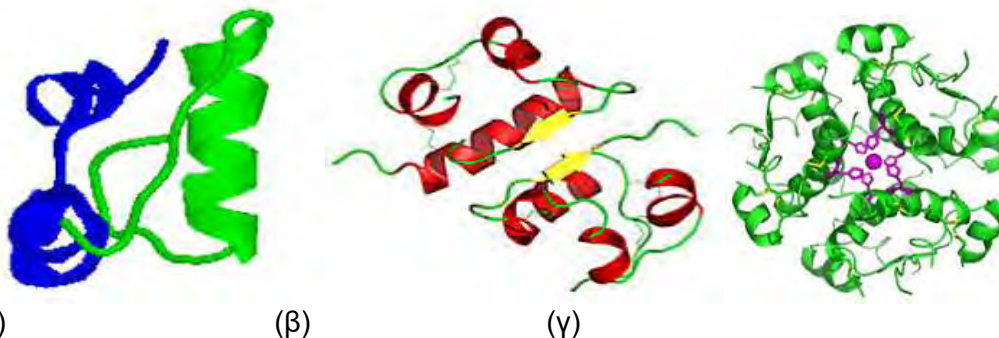
Οι κατευθυντήριες οδηγίες για τον έλεγχο του ΣΔ2 αναφέρονται κυρίως σε κατάλληλη διατροφή, άσκηση και χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η φαρμακευτική αγωγή που συνηθίζεται σε αυτούς τους ασθενείς, η οποία έχει διαφορετικό τρόπο και στόχο δράσης είναι: σουλφονουλιδίες, διγουανιδίνες για να αυξηθεί η παγκρεατική έκκριση ινσουλίνης, αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης που καθυστερούν την εντερική απορρόφηση των υδατανθράκων, θειαζολιδινεδιόνες. [ΟικονομακοςN.G., 2001].

### 1.3.3 Σακχαρώδης διαβήτης κύησης

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης έχει αναγνωριστεί κλινικά εδώ και πολλά χρόνια. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1824 στη Γερμανία [Hadden, Hillebrand, 1989]. Είναι υπεργλυκαιμία, που εμφανίζεται σε κάποιες έγκυες γυναίκες, συνήθως σε προχωρημένη εγκυμοσύνη. Η αιτία δεν είναι γνωστή, αλλά πιστεύεται ότι κάποιες ορμόνες από τον πλακούντα αυξάνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη της μητέρας, προκαλώντας αύξηση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα. Η υπεργλυκαιμία λόγω διαβήτη κύησης συνήθως εξαφανίζεται μετά τον τοκετό, αλλά τόσο οι γυναίκες που διαγνώστηκαν με διαβήτη κύησης, όσο και τα μωρά τους έχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν αργότερα διαβήτη τύπου 2. Γυναίκες με διαβήτη κύησης σε μία εγκυμοσύνη συχνά έχουν διαβήτη κύησης και σε επόμενες εγκυμοσύνες [DiabetesMellitus (1995-2004)].

### 1.4 Ινσουλίνη

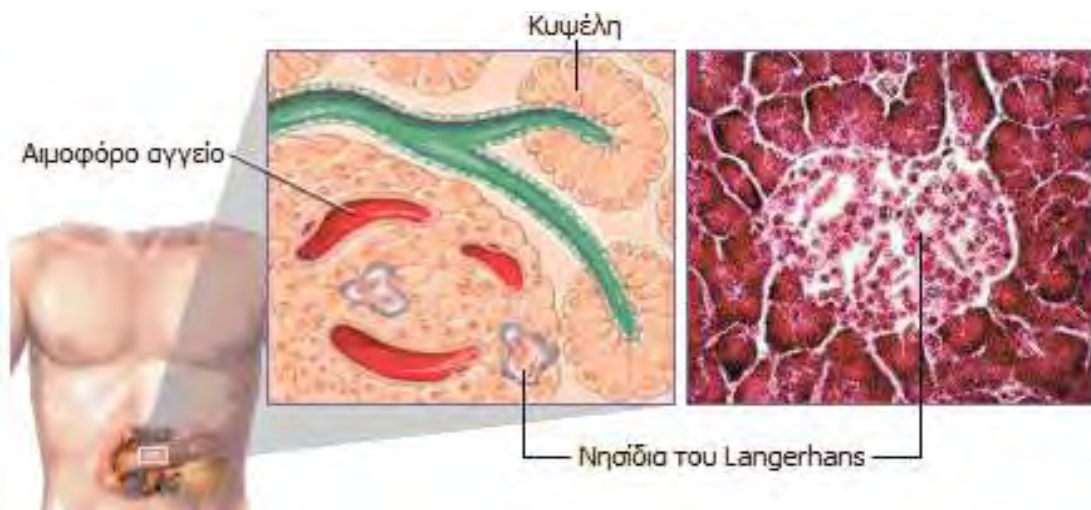
Η ινσουλίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη με MB 58 kDa η οποία αποτελείται από 51 αμινοξέα, τα οποία σχηματίζουν δύο αλυσίδες την A (21 αμινοξέα) και τη B (30 αμινοξέα). Οι αλυσίδες αυτές συνδέονται μεταξύ τους με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Η δομή της A αλυσίδας σταθεροποιείται από έναν επιπλέον δισουλφιδικό δεσμό [Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs, Volume 5].



**Εικόνα 3:** Μορφές ινσουλίνης (α): Μονομερές ινσουλίνης (βιολογικώς δραστική μορφή). (β) Διμερές ινσουλίνης (η κυριότερη μορφή σε υδατικό διάλυμα). (γ) Εξαμερές ινσουλίνης συκκρατούμενο από δύο ιόντα Zn(II) που συμπλέκονται μέσω της ιστιδίνης της β-αλυσίδας (B10-His) [DodsonG.G., WhittinghamJ.L.]

#### 1.4.1 Ιστορική αναδρομή ινσουλίνης

Η ιστορία της ινσουλίνης ξεκίνησε το 1869. Ένας φοιτητής ιατρικής του Πανεπιστημίου του Βερολίνου, ο Paul Langerhans (1847-1888) εξετάζοντας στο μικροσκόπιο τομές παγκρεατικού ιστού (δεξιά), εντόπισε κάποιες άγνωστες μέχρι τότε συστάδες (clusters) κυττάρων και δεν μπόρεσε να διαπιστώσει τον φυσιολογικό τους ρόλο. Οι συστάδες αυτές ονομάστηκαν αργότερα νησίδια του Langerhans και είναι συναθροίσεις κυττάρων κάποια από τα οποία παράγουν και εκκρίνουν ινσουλίνη. Η ινσουλίνη εκκρίνεται μέσω των αιμοφόρων αγγείων απ' ευθείας στο αίμα, σε αντίθεση με τη μέχρι τότε γνωστή έκκριση παγκρεατικού υγρού (μίγμα πεπτικών ενζύμων) στο δωδεκαδάκτυλο.

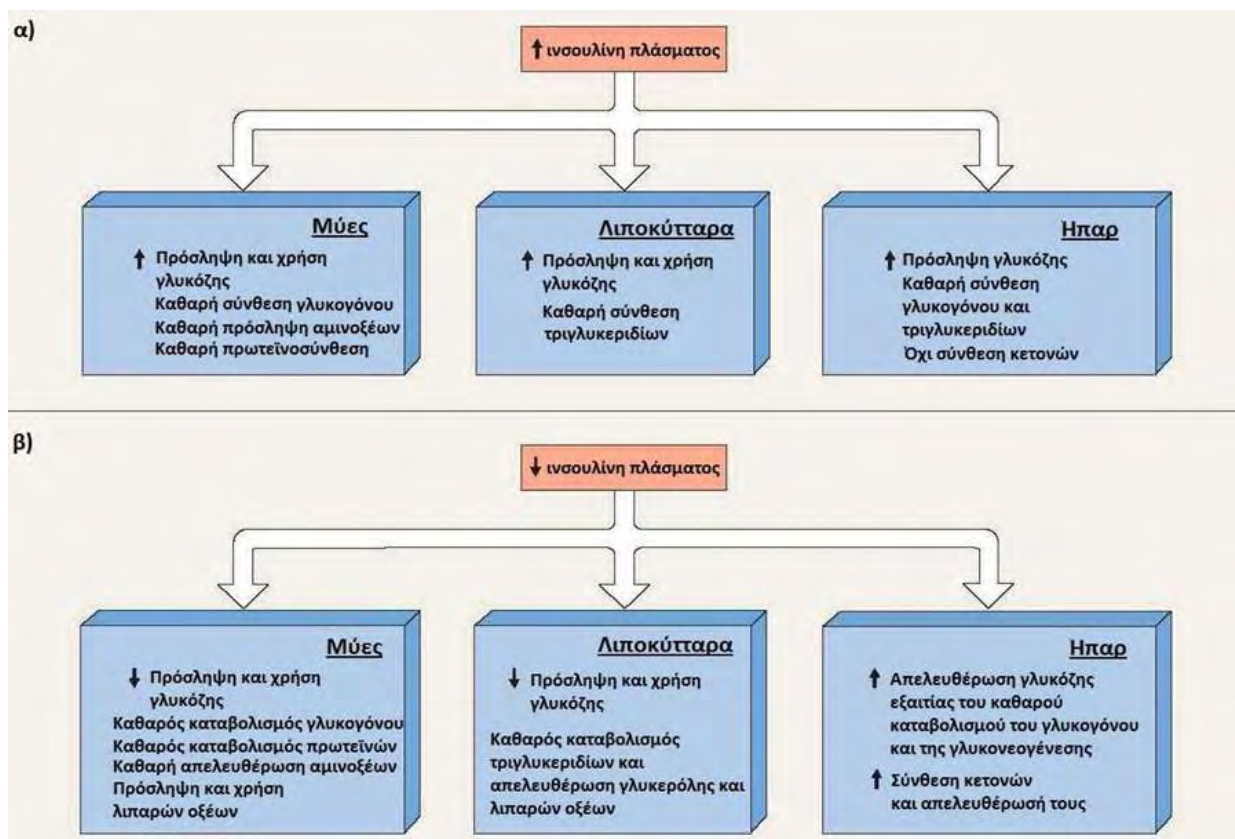


**Εικόνα 4 :**Απεικόνιση των νησιδίων Langerhans

#### 1.4.2 Βιολογικός ρόλος ινσουλίνης

Η ινσουλίνη εκκρίνεται από τα β-κύτταρα που αποτελούν το 60-85% των κυττάρων των νησιδίων Langerhans. Τα β-κύτταρα "διεγείρονται" από τα μόρια γλυκόζης και η δράση της είναι ξεκάθαρα αναβολική. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, τόσο αυξάνει ο ρυθμός έκκρισης ινσουλίνης. Με τη σειρά της η ινσουλίνη διευκολύνει την πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα είδη κυττάρων του οργανισμού, όπως τα μυϊκά κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα λιπώδη κύτταρα. Χωρίς την ινσουλίνη τα κύτταρα αυτά δεν μπορούν να προσλάβουν γλυκόζη που αποτελεί την κύρια πηγή χημικής ενέργειας. Επιπλέον, η ινσουλίνη προκαλεί την "αποταμίευση" γλυκόζης στα κύτταρα και κυρίως στο ήπαρ υπό τη μορφή γλυκογόνου (glycogen). Κατά τη διάρκεια της νηστείας αυξάνεται η παραγωγή ηπατικής γλυκόζης καθώς και η γλυκογονόλυση. Στο ήπαρ μειώνεται η σύνθεση των λιπιδίων και παράλληλα αυξάνεται η λιπόλυση στον λιπώδη ιστό. Η ινσουλίνη είναι η κύρια ορμόνη στο μεταβολισμό της γλυκόζης [Gonzalez-FranquesaA., 2012]

**1.4.3 Οι μεταβολικές επιδράσεις της ινσουλίνης εντοπίζονται κυρίως στα μυϊκά και ηπατικά κύτταρα, καθώς και στο λιπώδη ιστό.**

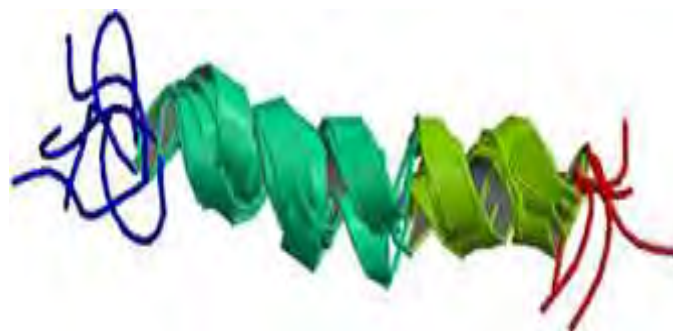


**Εικόνα 5 :** Συνοπτική παρουσίαση των αποκρίσεων των διαφορετικών τύπων κυτάρων στην α) αύξηση και β) μείωση της πλάσματικής συγκέντρωσης της ινσουλίνης [Vanderetal'sHumanPhysiology, 9thedition]

#### 1.4.4 Αντίσταση στην ινσουλίνη

Αντίσταση στην ινσουλίνη θεωρείται η μεταβολική διαταραχή στην οποία παρατηρείται ποσοτικά μειωμένη βιολογική απάντηση σε δεδομένη συγκέντρωση ινσουλίνης. Μπορεί ένα άτομο να έχει αναπτύξει αντίσταση στην ινσουλίνη για χρόνια και να μην το έχει αντιληφθεί εάν δεν έχει κάνει εξετάσεις για τον έλεγχο των επιπέδων του σακχάρου [ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΔΙΑΒΗΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ, 3(2), 073-80, 1990].

#### 1.5 Γλυκαγόνη



**Εικόνα 6:** Μόριο γλυκαγόνης (απεικόνιση μορίου γλυκαγόνης σε τρισδιάστατη δομή, 3D)

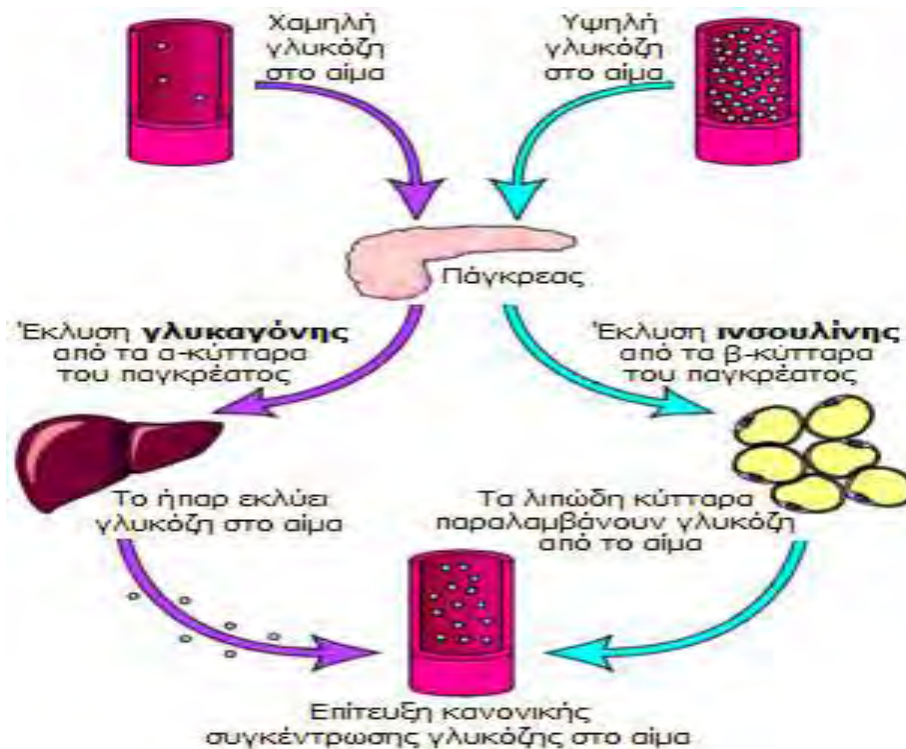
Η γλυκαγόνη (glucagon) είναι ένα πολυπεπτιδίο, που παράγεται στα α-κύτταρα των νησιδίων του Langerhans. Η δομή της γλυκαγόνης είναι η ίδια στα βοοειδή, το χοίρο, στο κόνικλο και στον άνθρωπο. Η γλυκαγόνη δεν απαντάται μόνο στο πάγκρεας, αλλά και σε άλλους ιστούς (βλεννογόνο του στομάχου και του δωδεκαδακτύλου, σιελογόνοι αδένες) καθώς κυκλοφορεί και ελεύθερη στο αίμα (δεν είναι δηλαδή, ενωμένη με πρωτεΐνες). Ο χρόνος ημιζωής της είναι 3-4 λεπτά.

### 1.5.1 Φυσιολογικός ρόλος της γλυκαγόνης

Η γλυκαγόνη αυξάνει τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Η δράση της ασκείται κυρίως στο ήπαρ, όπου αυξάνει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου σε γλυκόζη (γλυκογονόλυση) καθώς και τη γλυκονεογένεση. Επίσης, αυξάνει τη διαπερατότητα της μεμβράνης των ηπατικών κυττάρων στα αμινοξέα και επιταχύνει το μεταβολισμό για παραγωγή γλυκόζης (γλυκονεογένεση). Έτσι, οι επιδράσεις της γλυκαγόνης και της ινσουλίνης στο ήπαρ είναι αντίθετες. Η γλυκαγόνη αυξάνει τη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων στο αίμα (προκαλεί λιπόλυση), με αποτέλεσμα αυτή η αύξηση να έχει αρνητική επίδραση (παλίνδρομη) στην έκκριση της. Εξωγενής χορήγηση γλυκαγόνης σε μεγάλες δόσεις αυξάνει τη λειτουργία της καρδιάς καθώς και τη ροή του αίματος κυρίως στους νεφρούς, αυξάνει την έκκριση της χολής, την παραγωγή καλσιτονίνης, την έκκριση της ινσουλίνης [Φυσιολογία Σκομοβήτη, 2014], [Kirk M. Habegger, NatRevEndocrinol. 2010].

### 1.5.2 Έκκριση γλυκαγόνης

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



**Εικόνα 7 :** Μηχανισμός δράσης ινσουλίνης και γλυκαγόνης στον έλεγχο επιπέδων γλυκόζης του αίματος

### 1.6 Μηχανισμός δράσης ινσουλίνης και γλυκαγόνης

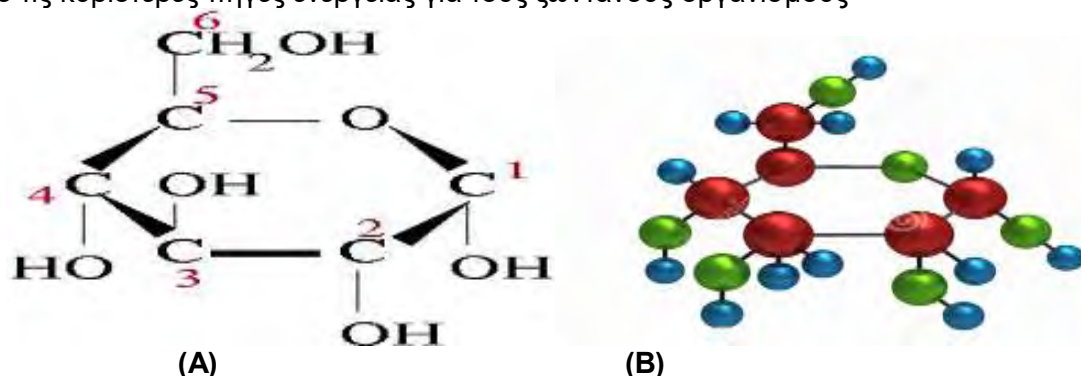
Η γλυκαγόνη έχει αντίθετα αποτελέσματα δράσης και αντίθετη έκκριση από της ινσουλίνης. Η έκκριση της γλυκαγόνης διεγείρεται από την πτώση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος (υπογλυκαιμία). Αντίθετα, η έκκριση της γλυκαγόνης αναστέλλεται, όταν το σάκχαρο του αίματος είναι αυξημένο. Επίσης, την έκκριση γλυκαγόνης ενισχύουν ορισμένα αμινοξέα της τροφής και η μυϊκή δραστηριότητα. Το αποτέλεσμα της έκκρισης της γλυκαγόνης είναι η αύξηση της γλυκόζης του αίματος. Η συσσώρευση της γλυκόζης στο αίμα από την λήψη των τροφών, δεν παραμένει στο σύνολό της κυκλοφορούσα στο αίμα, αλλά αποθηκεύεται υπό την μορφή συννεομένων μορίων γλυκόζης, σε ένα μεγάλο μόριο, το οποίο ονομάζεται γλυκογόνο. Αυτό το μακρομόριο, αποθηκεύεται στο ήπαρ και τους μυς. Χρησιμεύει ως αποθηκευμένο καύσιμο υλικό για να καταναλωθεί σταδιακά, αποδομούμενο ως μόριο γλυκογόνου. Το μεγάλο μόριο του γλυκογόνου αποδεσμεύει τα πρωταρχικά μόρια γλυκόζης, απελευθερώνοντάς τα στο αίμα και διαθέτοντάς τα ως καύσιμο υλικό, έως την επόμενη λήψη τροφής. Τέλος, έχει χρόνο ζωής η οποία οριοθετείται από την στιγμή της σύνθεσής του, έως την αποδόμησή του σε μόρια γλυκόζης, ήτοι από την λήψη της τροφής κατά την διάρκεια της νηστείας, έως το επόμενο γεύμα, για χρόνο περίπου 8-12 ώρες [GUYTON&HALL 2008], [Theimportantrolesofinsulinandglucagon: DiabetesandHypoglycemia].

## 2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

### 2.1 Γλυκόζη (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)

#### 2.1.1 Γενικά

Είναι ένα απλό σάκχαρο ή μονοσακχαρίτης, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, το οποίο αποτελεί το τελικό προϊόν του καταβολισμού των υδατανθράκων. Το δεξιόστροφο ισομερές του (D-γλυκόζη) αποτελεί μια από τις κυριότερες πηγές ενέργειας για τους ζωντανούς οργανισμούς



**Εικόνα 8 :** Δομή γλυκόζης Α) Η δομή του μορίου της γλυκόζης Β) Τρισδιάστατη δομή ενός μορίου γλυκόζης [Stryer L,1997]

#### 2.1.2 Μεταβολισμός γλυκόζης

Η γλυκόζη ανήκει στην ομάδα των υδατανθράκων αποτελώντας έναν πολυσακχαρίτη. Χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας από τα βακτήρια ως τον άνθρωπο και είναι προϊόν φωτοσύνθεσης στα φυτά . Σε φυσιολογικές συνθήκες αποτελεί την μοναδική πηγή ενέργειας για τα εγκεφαλικά κύτταρα, ενώ καταναλώνεται από τους μύες κατά τα πρώτα στάδια της μυϊκής άσκησης. Τα κύτταρα του οργανισμού χρησιμοποιούν τη γλυκόζη μέσω αερόβιας, είτε μέσω αναερόβιας μεταβολικής οδού. Η ποσότητα της γλυκόζης που βρίσκεται στο εξωκυττάριο διαμέρισμα είναι μικρή και υπολογίζεται σε περίπου 20g. Για να έχουμε συνεχή γλυκόζη στους ιστούς γίνεται αποθήκευσή της ως γλυκογόνο, το οποίο σε περιόδους ανάγκης καταβολίζεται σε γλυκόζη μέσω της διαδικασίας της γλυκογονόλυσης [Ελληνική Νεφρολογία, 2012].

#### 2.1.3 Ρόλος της γλυκόζης

Η γλυκόζη αποτελεί το φυσιολογικό ρυθμιστή του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο ήπαρ, εφόσον αδρανοποιεί την φωσφορυλάση του γλυκογόνου και δρα σε συνεργασία με την ινσουλίνη. Η γλυκόζη σταθεροποιεί την T διαμόρφωση της φωσφορυλάσηςβ (λιγότερο δραστηκής) [Stalmans,1974]. Η γλυκόζη οξειδώνεται μέσω της γλυκόλυσης και αργότερα στις

αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCAC), για να σχηματίσει τελικά διοξείδιο του άνθρακα και νερό, αποδίδοντας ενέργεια, κυρίως με τη μορφή ATP. Η αντίδραση της ινσουλίνης, καθώς και άλλοι μηχανισμοί, ρυθμίζουν τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα. Η γλυκόζη ως αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου μαζί με το υπόστρωμα, με παράλληλη σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης που είναι λιγότερο ενεργή, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο [Οίκονομακος, 1987].

#### 2.1.4 Ομοίωση Γλυκόζης-Ρόλος Ινσουλίνης

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 είναι μια περίπλοκη διαδικασία που ελέγχεται από το ρυθμιστικό σύστημα γλυκόζης-ινσουλίνης [Βιολογία συστημάτων, Δασκαλάκη Ε., 2009].

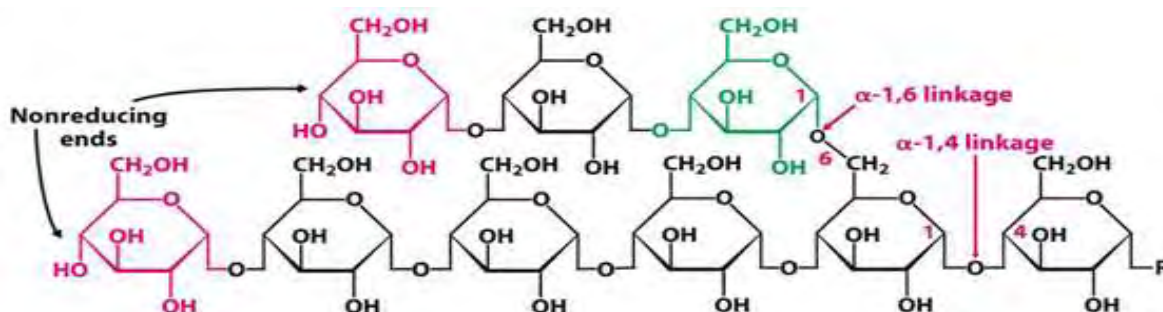
#### 2.1.5 Η γλυκόζη διεγείρει την έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, που σηματοδοτεί τη κατάσταση επάρκειας και διεγείρει την αποθήκευση καυσίμων με ποικίλους τρόπους:

- I. Επάγει τη πρόσληψη γλυκόζης στους μύες, στο λιπώδη ιστό και στο ήπαρ
- II. Επιταχύνει τη γλυκόλυση και την παραγωγή Ac-CoA στο ήπαρ και τους μύες
- III. Ενεργοποιεί τη σύνθεση γλυκογόνου στους μύες και το ήπαρ
- IV. Αναστέλλει την υδρόλυση γλυκογόνου
- V. Καταστέλλει τη γλυκονογένεση στο ήπαρ
- VI. Αυξάνει τη σύνθεση λιπαρών οξέων στο ήπαρ και τη σύνθεση TAG στο λιπώδη ιστό [Βιολογία συστημάτων, Δασκαλάκη Ε., 2009]

### 2.2 Γλυκογόνο

#### Γενικά 2.2.1

Το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές το οποίο αποτελείται από μόρια α-D-γλυκόζης και αποτελεί την κύρια πηγή αποθήκευσης της γλυκόζης στα θηλαστικά. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης [Stryer, 1997].



Εικόνα 9 : Δομή του γλυκογόνου [StryerLetal., 2012]

Για διάφορους λόγους το γλυκογόνο είναι ένα σημαντικό απόθεμα καυσίμων μορίων. Ο ελεγχόμενος καταβολισμός του και η απελευθέρωση γλυκόζης αυξάνουν την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Έτσι με αυτό τον τρόπο βλέπουμε ο μεταβολισμός του γλυκογόνου να είναι υπεύθυνος για την ρύθμιση της διατήρησης των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται



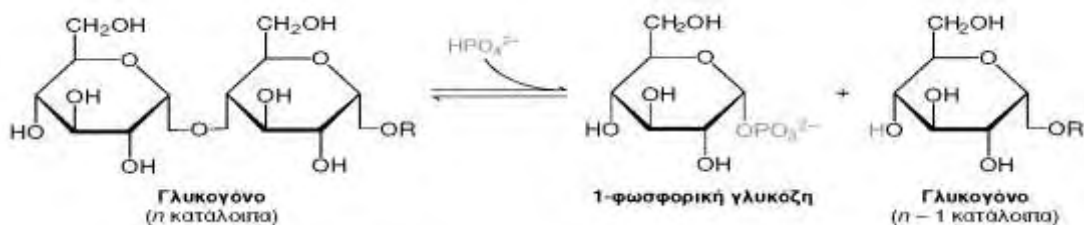
άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Οι δύο κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ παρά στους μύς (10% έναντι 2% κατά βάρος), αλλά περισσότερο γλυκογόνο αποθηκεύεται στους σκελετικούς μύς συνολικά, λόγω της πολύ μεγαλύτερης μάζας τους. Το γλυκογόνο βρίσκεται στο κυτοσόλιο με τη μορφή κοκκίων με διάμετρο από 10 έως 40 nm. Στο ήπαρ, η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως συνόλου. Αντίθετα, στους μύες οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για τη κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των μυών μόνο [Stryer, 2012].

## 2.2.2 Σύνθεση του γλυκογόνου

Η σύνθεση και αποικοδόμηση του γλυκογόνου αποτελούν δυο διαφορετικές πορείες. Για τη σύνθεση του γλυκογόνου είναι απαραίτητο ένα εναρκτήριο μόριο(τουλάχιστον τεσσάρων καταλοίπων), πάνω στο οποίο προστίθενται αλυσίδες ολιγοσακχαριτών με την δράση της GS (συνθάση του γλυκογόνου). Αυτή η εναρκτήρια λειτουργία εξασφαλίζεται από μια πρωτεΐνη που περιλαμβάνει έναν ολιγοσακχαρίτη, αποτελούμενο από α-1,4-γλυκόζες, συνδεδεμένο με το φαινολικό άτομο οξυγόνου ενός καταλοίπου τυροσίνης. Αυτός είναι ο λόγος που πάντα όταν απομονώνεται γλυκογόνο αυτό περιέχει και πρωτεΐνες [Stryer, 1997] ΗGS μεταφέρει μόρια γλυκόζης από την ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDP) σε μια αλυσίδα α-1,4-πολυγλυκόζης, με ελάχιστο αριθμό μορίων ίσο με 4, δημιουργώντας α-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η γλυκανο-1,6-τρανσφεράση θα δημιουργήσει α-1,6- γλυκοζιτικούς δεσμούς. Μεταφέρει μια αλυσίδα μήκους 6-7 μονάδων γλυκόζης από τον α-1,4 δεσμό στο 6-υδροξύλιο μιας γλυκοζυλικής ομάδας που βρίσκεται κυρίως προς το εσωτερικό του μορίου. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται αμέσως μια μακρύτερη διακλάδωση, την οποία η GS μπορεί να επιμηκύνει ακόμη περισσότερο. Η διακλάδωση είναι σημαντική καθώς αυξάνει τη διαλυτότητα του γλυκογόνου [Stryer, 1997]

## 2.2.3 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

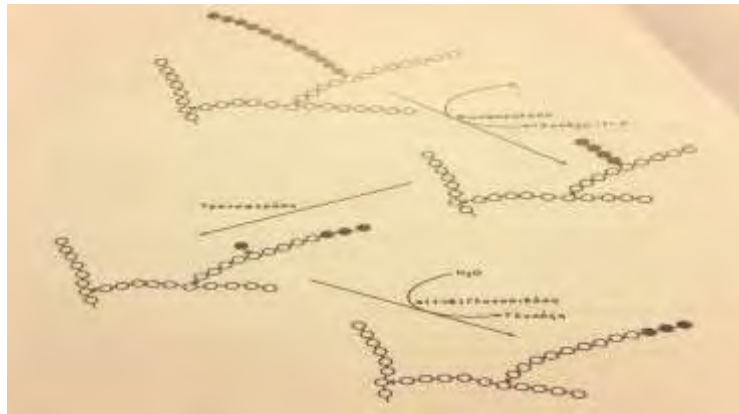
Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά από τους Carl&GertyCori γύρω στο 1936. Το ζεύγος Cori απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το οποίο καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου και την παραγωγή γλυκόζης στην διαδικασία της γλυκογονόλυσης [StryerLetal., 2012]. Η αποικοδόμηση του λαμβάνει χώρα σε τρία βήματα την απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης, την ανακατασκευή του υποστρώματος και την μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη [ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, ΤΟΜΟΣ Ι – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ].



**Εικόνα 10 :** Αποικοδόμηση του γλυκογόνου [Stryer, (1997)]

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) καταλύει τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου προς απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης (G1P). Η GP το καθοριστικό ένζυμο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου, διασπά το υποστρώμα της με την προσθήκη ενός ορθοφωσφορικού ιόντος (Pi), προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός

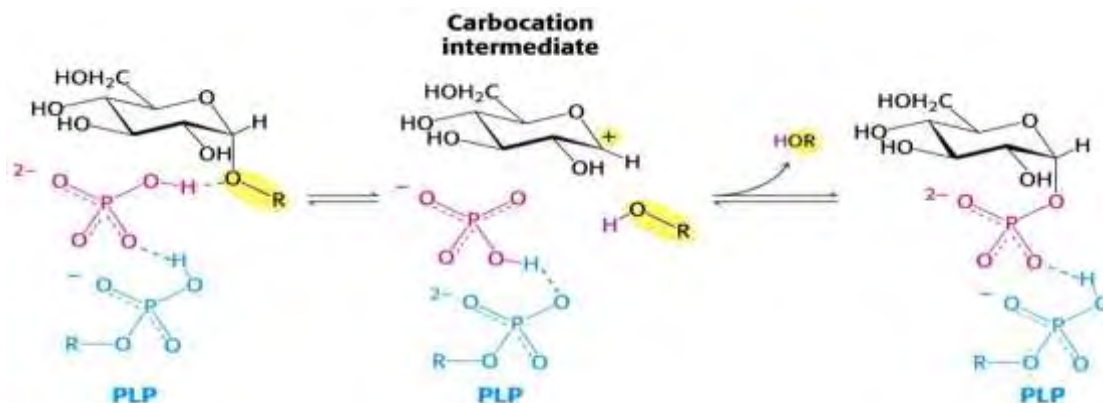
δεσμού με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού αναφέρεται ως φωσφορόλυση [StryerLetal., 2012]. Όταν όμως το ένζυμο φτάσει σε απόσταση τεσσάρων γλυκοσυλ-μονάδων από μια διακλάδωση που υπάρχει α(1-6) δεσμός η φωσφορυλάση δεν μπορεί να δράσει. Κατ'αυτὸν τον τρόπο δημιουργούνται, ὅπως και μετά από δράση β-αμυλάσης, οριακές δεξτρίνες. Η αντίδραση όμως προχωράει γιατί παρεμβαίνει ένα ακόμα ένζυμο που όμως έχει δύο δράσεις, με τη μία(δράση τρανσφεράσης) μεταφέρει ένα μπλοκ από τρεις γλυκόζες στην άκρη ενός άλλου κλάδου στο ίδιο ή διαφορετικό μόριο γλυκογόνου. Η μόνη γλυκόζη τώρα που παραμένει και είναι συνδεδεμένη με α(1-6) δεσμό, υδρολύεται από την άλλη δράση του ίδιου ενζύμου που λειτουργεί ως α(1-6) γλυκοσιδάση. Έτσι η φωσφορυλάση μπορεί να προχωράει και να φωσφορολύει αλυσίδες που έχουν επιμηκυνθεί από τρανσφεράση (εικόνα 11). Η φωσφορυλάση προκειμένου να δράσει, χρησιμοποιεί ως συνένζυμο τη φωσφορική πυριδοξάλη που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη μέσω μιας λυσίνης σε κάθε μια από τις υπομονάδες του ενζύμου. Για τον μεταβολικό και ορμονικό έλεγχο της αποικοδόμησης του γλυκογόνου βλέπουμε πως η γλυκολυτική οδός, δηλ. η σειρά των αντιδράσεων που οδηγούν στην αξιοποίηση της γλυκόζης, αρχίζει ουσιαστικά από την 6-φωσφορική γλυκόζη που μία από τις πηγές της είναι και η 1-φωσφορική γλυκόζη, το προϊόν της δράσης της φωσφορυλάσης, μετά από ισομερίωση [Γεωργάτσος,2001]



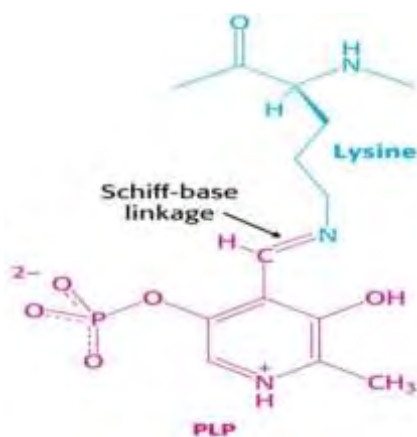
**Εικόνα 11:** Μηχανισμός φωσφορολυτικής αποικοδόμησης γλυκογόνου. Οι δράσεις τρανσφεράσης και α(1,6)γλυκοσιδάσης εδρεύουν στο ίδιο ένζυμο[Γεωργάτσος, 2001].

#### 2.2.4 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης

Όπως ξέρουμε η φωσφορυλάση του γλυκογόνου διασπά το γλυκογόνο φωσφορολυτικά έτσι ώστε να εξοικονομείται ATP το οποίο απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της ελεύθερης γλυκόζης. Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και η παραγόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη (το προϊόν), έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια προσβολή της φωσφορικής ομάδας στον C-1 ενός σακχάρου θα αναστρέψει τη διαμόρφωση στον άνθρακα αυτό. Αφού η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων. Πιθανότερα να σχηματίζεται ενδιάμεσο καρβοκατιόν, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων που καταλύεται από την λυσοζύμη. Η ένδειξη PLP αφορά την φωσφορική πυριδοξάλη συνδεδεμένη με μια βάση του Schiff στην λυσίνη 680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α-D-γλυκόζη και η R-OH, καθώς και η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο. 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 [Stryer, 1997] Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B6). Η αλδεϋδική ομάδα του συνενζύμου αυτού σχηματίζει μια βάση Schiff με την πλευρική αλυσίδα μιας συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου



**Εικόνα 12 :** Προτεινόμενος μηχανισμός φωσφορυλίωσης του γλυκογόνου από την GP [Stryer,1997].



**Εικόνα 13 :** Δεσμός βάσης Schiff της PLP. Η PLP (κόκκινο) σχηματίζει μια βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (μπλε) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης [Stryer,1997]

Τα αποτελέσματα δομικών μελετών υποδηλώνουν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα καταλαμβάνει μια θέση μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα της PLP δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό λειτουργώντας ως δότης πρωτονίων και στη συνέχεια ως δέκτης πρωτονίων (δηλαδή, ως ένας γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό (με τη μορφή  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο που είναι συνδεδεμένο στον άνθρακα 4 της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου, και συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν, που σχηματίζεται στο βήμα αυτό, προσβάλλεται στη συνέχεια από το ορθοφωσφορικό ανιόν προς σχηματισμό φωσφορικής γλυκόζης δεσμού α-1, με την επακόλουθη επιστροφή ενός ατόμου υδρογόνου στη φωσφορική πυριδοξάλη. Η απαίτηση να αποκλείεται το νερό από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης του γλυκογόνου. [Stryer, 1997]

### 3. ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

#### 3.1 Γενικά

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο και αποτελεί το κυριότερο ένζυμο κινητοποίησης του γλυκογόνου καταλύοντας τη φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου προς απελευθέρωση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η GP παίζει καθοριστικό

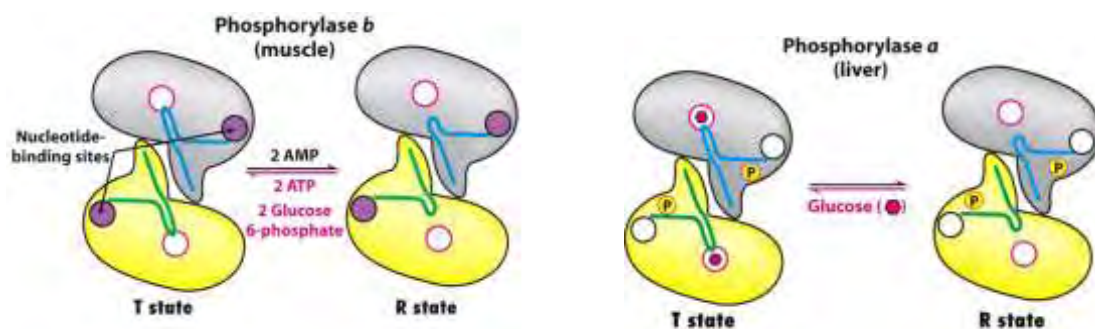
ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου [Johnson L.N., 1992]. Εντοπίζεται στο σαρκοπλασματικό δίκτυο όπου καταλύει το πρώτο βήμα της γλυκογονόλυσης ενώ εντοπίζεται και σε άλλους ιστούς και ταξινομείται σε τρεις ισομορφές [Lillropp L., 1992]:

1. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του εγκεφάλου όπου εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στον ιστό του εγκεφάλου.
2. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου των μυών όπου υπάρχει στους σκελετικούς μύες και στην καρδιά.
3. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου του ήπατος: Αρχικά βρέθηκε στο ήπαρ αλλά βρίσκεται παντού εκτός από τον εγκέφαλο, τους σκελετικούς μύες, τα μυοκύτταρα της καρδιάς και τον εγκέφαλο. Αυτή η ισομορφή της φωσφορυλάσης έχει ομοιοστατικό ρόλο καθώς ρυθμίζει την απελευθέρωση της γλυκόζης [Stryer, 2012].

Στους μύες και στο ήπαρ η φωσφορυλάση του γλυκογόνου υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές:

- 1) Η αποφωσφορυλιωμένη χαμηλής δραστηριότητας και χαμηλής συγγένειας υποστρώματος μορφή (GPb)
- 2) Η φωσφορυλιωμένη στη Ser14 υψηλής δραστηριότητας και υψηλής συγγένειας υποστρώματος μορφή (GPa)

Και στις δύο μορφές τροποποιητές μπορούν να προωθήσουν την ισορροπία μεταξύ μιας λιγότερο ενεργού κατάστασης T (Tense) και μιας πιο ενεργού κατάστασης R (Relax). Η μετατροπή της GPb σε GPa έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ενζύμου που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPa επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη) αλλά μικρότερη συγγένεια για το ATP, ADP και την G6P [Johnson, 1989]. Η δραστηριότητα της GPb στους μύς ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό αλλοστερικά από το ενεργειακό φορτίο (AMP, ATP) αλλά και από την 6-φωσφορική γλυκόζη, αντίθετα στο ήπαρ βρίσκεται κυρίως υπό μορφή GPa [Stryer, 1997].



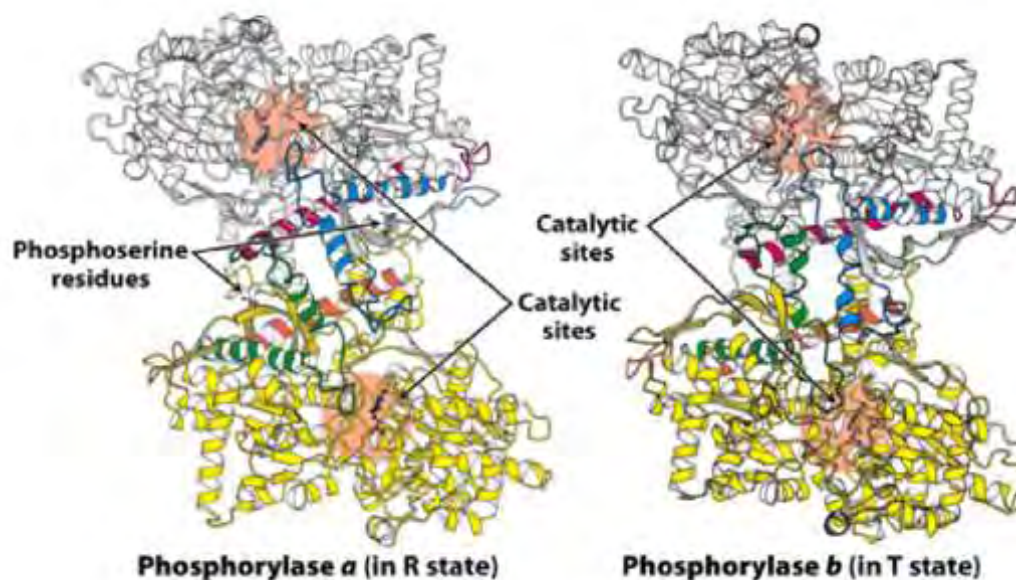
**Εικόνα 14** :Αναπαράσταση του ελέγχου δραστηριότητας της GP

Η GP ρυθμίζεται με αντιστρεπτή φωσφορυλίωση ως απόκριση σε ορμονικά σήματα ινσουλίνης, γλυκαγόνης και επινεφρίνης όπως επίσης και με διάφορους αλλοστερικούς τροποποιητές οι οποίοι σηματοδοτούν την ενεργή κατάσταση στο κύτταρο. Η GP υπακούει στο μοντέλο αλλοστερικών ενζύμων των Monod, Wyman και Changeux. Έτσι μία από τις δύο μορφές της a και b βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργού χαλαρής κατάστασης R και μίας πολύ ενεργού τεταμένης κατάστασης, όμως η ισορροπία για την φωσφορυλάση a ευνοεί την κατάσταση R, ενώ η ισορροπία για την φωσφορυλάση b ευνοεί την κατάσταση T. Η μετάβαση από την κατάσταση T στην κατάσταση R συνδέεται με τη διαμορφωτική μεταβολή α-ελικών οι οποίες μετακινούν ένα βρόχο έξω από το ενεργό κέντρο της καθεμίας

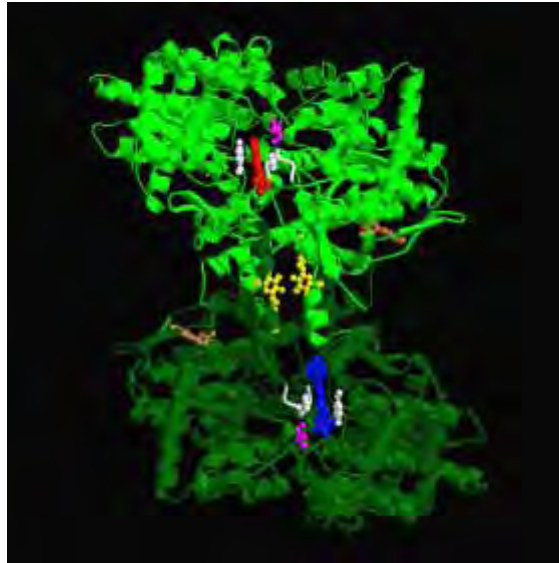
υπομονάδας. Έτσι η κατάσταση T είναι λιγότερο ενεργή διότι το καταλυτικό κέντρο είναι μερικώς παρεμποδισμένο. Στην κατάσταση R το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προσβάσιμο και η θέση δέσμευσης για το φωσφορικό είναι καλά οργανωμένη [Stryer, 2012].

### 3.2 Δομή της φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Δομικά, η GP είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο πανομοιότυπες υπομονάδες των 97kDa (842 αμινοξέα). Κάθε υπομονάδα είναι συμπαγώς αναδιπλωμένη σε μια αμινο-τελική δομική περιοχή (480 κατάλοιπα) και μια καρβοξυτελική 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. 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. Η κάθε υπομονάδα περιέχει χαρακτηριστικές λειτουργικές περιοχές όπως η καταλυτική, οι αλλοστερικές περιοχές (καρβοξυ-τελική και αμινο-τελική δομική περιοχή) αλλά και η θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου. [Οϊκονομακος,1992].



**Εικόνα 15 :** Δομή της φωσφορυλάσης a και της φωσφορυλάσης b. Η φωσφορυλάση a φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 14 κάθε υπομονάδας. Η τροποποίηση αυτή ευνοεί τη δομή της πλέον ενεργού κατάστασης R. Η μία υπομονάδα δείχνεται με λευκό, ενώ οι έλικες και οι θηλιές, που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση, με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα δείχνεται με κίτρινο και οι ρυθμιστικές δομές με πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση b δεν φωσφορυλιώνεται και υπάρχει κυρίως στην κατάσταση T [Stryer, 2012].



**Εικόνα 16 :** Απεικόνιση της δομής της φωσφορυλάσης γλυκογόνου, που αποτελεί στόχο για το σχεδιασμό αντι-υπογλυκαιμικών φαρμάκων, ως προς τον άξονα συμμετρίας 2ης τάξης. Η μία υπομονάδα απεικονίζεται με χρώμα ανοιχτό πράσινο και η άλλη με σκούρο πράσινο. Σημειώνονται οι θέσεις των επί μέρους κέντρων σύνδεσης του ενζύμου (καταλυτικού, αλλοστερικού, ανασταλτικού και νέου αλλοστερικού). Το καταλυτικό κέντρο, στο οποίο συνδέεται το υποστρώματα 1-φωσφορική γλυκόζη, το γλυκογόνο και τα φωσφορικά ιόντα ή ο αναστολέας γλυκόζη (χρώμα μωβ) βρίσκεται στο κέντρο της κάθε υπομονάδας. Στην ανενεργό διαμόρφωση του ενζύμου (Τ-διαμόρφωση) η πρόσβαση του υποστρώματος γλυκογόνου, από τον περιβάλλοντα διαλύτη, προς το καταλυτικό κέντρο γίνεται μέσω ενός καναλιού πλάτους ~5 Å και μήκους περίπου ~15 Å, αλλά η πρόσβαση περιορίζεται (κυρίως) από το βρόχο 280s (αμινοξικής αλληλουχίας 282-286) (χρώμα άσπρο). Το αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης του ενεργοποιητή AMP-χρώμα καφέ ή του αναστολέα *aventis#21*), εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομοναδών και απέχει από το καταλυτικό κέντρο περίπου 30 Å. Το ανασταλτικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης είτε ενός παραγώγου της ινδουβίνης (χρώμα κόκκινο) στη μια υπομονάδα είτε ενός παραγώγου του ινδικού (χρώμα μπλε) εντοπίζεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου και σχηματίζεται από δυο αρωματικά αμινοξέα (Phe285-χρώμα άσπρο και Tyr613-χρώμα άσπρο). Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς και συνδέει ενώσεις όπως τα indole-2-carboxamides και η benzoyl-N'-β-D-glucopyranosylurea (χρώμα κίτρινο) (Oikonomakosetal., 2006).

### 3.3 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

Σε πολλά ολιγομερή ένζυμα παρατηρείται το φαινόμενο της συνέργιας, κατά το οποίο η δέσμευση ενός μορίου-προσδέτη σε μια περιοχή δεσμεύσεως επηρεάζει τη συγγένεια κάποιας άλλης θέσης δεσμεύσεως του ενζύμου για τον προσδέτη, κάτι το οποίο προϋποθέτει την δυνατότητα επικοινωνίας μεταξύ των περιοχών δέσμευσης. Η δραστηριότητα των ενζύμων μπορεί να ελεγχθεί από διάφορους μεταβολίτες οι οποίοι δεν έχουν κάποια άμεση αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα ή τα προϊόντα των αντιδράσεων που καταλύονται από τα αντίστοιχα ένζυμα. Η επίδραση αυτών των μεταβολιτών στην λειτουργία του ενζύμου φαίνεται να προκύπτει από μια αλλοστερική μετάπτωση (διαμορφωτική μεταβολή) η οποία επάγεται όταν δεσμευτεί στην πρωτεΐνη ο κατάλληλος παράγοντας. Πιθανότατα η φωσφορυλάση *b* του γλυκογόνου αποτελεί το πρώτο αλλοστερικό ένζυμο του οποίου ανακαλύφθηκε ο μηχανισμός με λεπτομέρεια. Η φωσφορυλάση *b* είναι ανενεργή απουσία 5'-AMP και ενεργοποιείται παρουσία του. Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε ομότροπες και ετερότροπες [MonodJ, 1963].

### 3.4 Βιολογικός ρόλος της GP

Ο ρόλος της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι η παραγωγή γλυκόζης για εξαγωγή στους άλλους ιστούς, όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλά. Επομένως, αν η ελεύθερη γλυκόζη προέρχεται από άλλες πηγές, όπως η τροφή, δεν υπάρχει ανάγκη κινητοποίησης γλυκογόνου. Εν αντιθέσει με το μυϊκό ένζυμο, η ηπατική φωσφορυλάση δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από AMP, καθώς το ήπαρ δεν υφίσταται μεγάλες αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο [Παναγιώτης Κατινάκης, 2004].

### **3.5 Κέντρα σύνδεσης της Φωσφορυλάσης του γλυκογόνου**

#### **3.5.1 Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14**

Το κέντρο φωσφορυλίωσης είναι η σερίνη 14 που είναι υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP από τη μορφή α στη μορφή β, η οποία βρίσκεται σε στρατηγική θέση στη διαφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η φωσφορυλίωση της σερίνης αυτής, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων στο C-τελικό άκρο. Στην GPb, τα αμινοξέα αυτά είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη δομή, ενώ στην GPα έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των δύο υπομονάδων [Stryer, 1997].

#### **3.5.2 Το αλλοστερικό κέντρο**

Το αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων 32 Å περίπου από το καταλυτικό κέντρο και 12 Å περίπου από τη Ser14. Η τρισδιάστατη δομή του συγκεκριμένου κέντρου έχει αναλυθεί και στις δύο διαμορφώσεις, T και R, της GPα και της GPb. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι το κέντρο αυτό αποτελείται από τρία υποκέντρα:

- Υποκέντρο σύνδεσης της φωσφορικής ομάδας
- Υποκέντρο σύνδεσης σακχάρων (ριβόζης)
- Υποκέντρο σύνδεσης των νουκλεοτιδικών βάσεων (πουρίνης)

Οι ενώσεις που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, G1P, Pi,  $SO_4^{2-}$ ), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Το AMP όταν συνδέεται εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων [Οικονομακός, 1992].

#### **3.5.3 Το καταλυτικό κέντρο**

Το καταλυτικό κέντρο ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (G1P, Pi) και αναλόγων τους (UDP-Glc). Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε απόσταση 15 Å από τη επιφάνεια περίπου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται ο συμπαραγόντας PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται κυρίως από τον βρόχο αμινοξικής ακολουθίας 282-285. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση T σε R, ο βρόχος 282-285 (βρόχος 280s) εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από την βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 συμβάλλει στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας [Οικονομακός, 2002].

#### **3.5.4 Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών**

Το αποθηκευτικό κέντρο εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου ινίνο. Η περιοχή αυτή βρίσκεται σε ένα αβαθές αυλάκι που σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας. Το κέντρο αποθήκευσης λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης [Οικονομακός, 2001].

### 3.5.5 Το κέντρο αναστολής

Το κέντρο αναστολής (νουκλεοζιτικό κέντρο) είναι ένα υδρόφοβο κέντρο σύνδεσης που εντοπίζεται πολύ κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου και σε απόσταση 12 Å περίπου από την είσοδο του καταλυτικού κέντρου. Το κέντρο αναστολής περιλαμβάνει ένα μέρος της περιοχής 1 (αμινοξέα 13-484) καθώς επίσης και ολόκληρη την περιοχή 2 (αμινοξέα 485-842). Στην T διαμόρφωση του ενζύμου, το κέντρο αναστολής φράσσει την είσοδο του καναλιού που οδηγεί στο καταλυτικό κέντρο. Έχει αποδειχτεί πως οι πουρίνες (όπως η αδενίνη και η καφεΐνη), τα νουκλεοσίδια (όπως η αδενοσίνη και η ινωσησίνη), τα νουκλεοτίδια (όπως το AMP, το IMP και το ATP), το NADH καθώς επίσης και συγκεκριμένα ετεροκυκλικά σώματα (όπως η ριβοφλαβίνη) δένονται στο κέντρο αναστολής της μυϊκής GP<sub>a</sub> και GP<sub>b</sub>, όχι όμως και στην ηπατική GP<sub>a</sub>, η οποία παρουσιάζει συγκεκριμένη εκλεκτικότητα [JohnsonL.N., 1992] [Oikonomakos, 2002].

Στην T διαμόρφωση της GP, η Phe 285 του βρόχου 280s εντοπίζεται κοντά στην Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας (αμινοξέα 613-631) και μαζί, αυτά τα δυο υδροφοβικά μόρια, συνεργικά, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η κατάληψη αυτού του κέντρου από ένα μόριο έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου καθώς επίσης και τη φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP. Η σύνδεση των αναστολέων με την πρωτεΐνη δεν πραγματοποιείται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξης των δακτυλίων των αρωματικών αμινοξέων [JohnsonL. N., 1992, Oikonomakos, 2002].

### 3.5.6 Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GP<sub>b</sub>. Σε αυτό συνδέεται η ένωση ινδιουβίνη, η3-αμινοξυ-οξική ινδιουβίνη (E243), το CP320626, η ένωση ινδολο-2-καρβοξαμίδιο, καθώς επίσης και η βενζοϋλο-N-β-D-γλυκοπυρανοζυλουρία (Bzurea), δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις με την T διαμόρφωση της GP<sub>b</sub>. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές μειώνονται κατά πολύ κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης στην R διαμόρφωση της GP<sub>a</sub> [Oikonomakos, 2002].

### 3.6 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως στόχος υπογλυκαιμικών φαρμάκων

Η αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) έχει προταθεί ως μια θεραπευτική στρατηγική για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 ενώ βιολογικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι αποτελεί μοριακό στόχο για την ανάπτυξη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η φωσφορυλάση είναι ένας ισχυρός υποψήφιος στόχος για τον έλεγχο της υπεργλυκαιμίας στο ΣΔ2. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης (HLGP), καθώς αυτή είναι ένα ένζυμο κλειδί στον ανθρώπινο μεταβολισμό, λόγω του κεντρικού ρόλου της στον μεταβολισμό του γλυκογόνου και στην αποθήκευση και στην απελευθέρωση της γλυκόζης. Ακριβώς για το ρόλο που διαδραματίζει στον έλεγχο του μεταβολισμού του γλυκογόνου και τον έλεγχο της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ, η HLGP αξιοποιείται ως ένα μοντέλο για το σχεδιασμό ισχυρών αναστολέων της GP (GPIs), ως πιθανοί νέοι αντιυπεργλυκαιμικοί παράγοντες, οι οποίοι θα μπορούν να εμποδίσουν την ενδογενή ανεπιθύμητη γλυκογονόλυση κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες [KristiansenM., 2004]. Αρκετές ρυθμιστικές θέσεις πρόσδεσης που έχουν ταυτοποιηθεί στηGP, όπως η καταλυτική, η αλλοστερική, και οι θέσεις σύνδεσης αναστολέα αποτελούν στόχους σχεδιασμού αναστολέων. Η μελέτη της αναστολής της GP αποτελεί μια συνεχή πρόκληση για τις επιστήμες της φυσικής, της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας και της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας [Oikonomakos, 2002, Aiston, 2001].

Ωστόσο η ύπαρξη των τριών ισομορφών (της ηπατικής, της μυϊκής και του εγκεφάλου) της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, θέτει το ζήτημα της επιλεκτικότητας των φαρμάκων για αναστολή. Συγκεκριμένα για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, οι αναστολείς θα πρέπει να στοχεύουν στο ισοένζυμο του ήπατος χωρίς να επηρεάζουν τις δυο



άλλες ισομορφές . Λόγω της ομολογίας των τριών ισομορφών της GP, μπορεί να μην είναι δυνατή η ακριβής στόχευση μόνο της ηπατικής ισομορφής. Παρόλα αυτά, επειδή το ήπαρ είναι το κύριο όργανο έκθεσης σε φάρμακα τα οποία λαμβάνονται δια στόματος, θα πρέπει να είναι δυνατόν να επιτευχθεί η κατάλληλη δόση φαρμάκου που θα στοχεύει κυρίως στο ήπαρ [Oikonomakos, 2008].

Ισχυροί αναστολείς του ενζύμου GP είναι πιθανό να έχουν κλινικό ενδιαφέρον στη θεραπεία του διαβήτη. Η τρισδιάστατη δομή της T διαμόρφωσης της μυϊκής GPb από κονίκλους έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτει 80% ομολογία στην ακολουθία των αμινοξέων με την ανθρώπινη ηπατική GP. Το σύμπλοκο του ενζύμου σε αυτή τη διαμόρφωση με γλυκόζη (που αποτελεί ένα φυσιολογικό ρυθμιστή), έχει επίσης προσδιοριστεί. Η δομή του παραπάνω συμπλόκου έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για τη σύνθεση παραγώγων γλυκόζης υποκατεστημένων στη θέση του πρώτου άνθρακα (C-1). Έτσι, έχει συντεθεί ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων ενώσεων για τις οποίες αναμένονταν να καταλαμβάνουν διαμορφώσεις με χαμηλή ενέργεια σύνδεσης και στη συνέχεια εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη GP. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης αναλύσεις με ακτίνες X για να διαπιστωθεί κατά πόσο οι ενώσεις αυτές αλληλεπιδρούν με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Οι παρατηρούμενοι τρόποι σύνδεσης των ενώσεων ήταν γενικά κοντά σε αυτούς που είχαν προβλεφθεί, αλλά η συγγένεια σύνδεσης δεν ήταν καλύτερη απ' αυτή που μετρήθηκε για τη γλυκόζη. Ωστόσο, τα αποτελέσματα παρείχαν κατευθυντήριες γραμμές για το σχεδιασμό περισσότερο ισχυρών αναστολέων [Blundelle 2002]. [RathV. L., 1987]

Η διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα είναι ζωτικής σημασίας για την ελαχιστοποίηση των επιπτώσεων του διαβήτη, καθιστώντας την ηπατική φωσφορυλάση δυνητικό θεραπευτικό στόχο. Μια νέα θέση πρόσδεσης στην ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (HLGP) για την κατηγορία των πολλά υποσχόμενων αντιδιαβητικών παραγόντων, εντοπίστηκε κρυσταλλογραφικώς με τη σύνδεση του CP-403,700, και λειτουργεί αλλοστερικά σταθεροποιώντας την ανενεργό διαμόρφωση της HLGP. Η κρυσταλλική δομή αποκάλυψε τις λεπτομέρειες του αναστολέα δέσμευσης, και οδήγησε στο σχεδιασμό μιας νέας κατηγορίας ενώσεων.

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται είναι η εύρεση ενός αναστολέα, ο οποίος θα μιμείται την δράση της γλυκόζης και θα δρα σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' αυτή (για να είναι αποδεκτός ως φαρμακευτικό προϊόν), χωρίς να προκαλεί πλήρη αδρανοποίηση της GP. Εάν θεωρηθεί ότι η δόση για ένα μέσο ενήλικα είναι 300 mg, τότε απαιτείται ένας αναστολέας με  $K_i \approx 1 \mu M$ , ώστε να μπορεί να μιμηθεί τη δράση 30-50 mM γλυκόζης στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Ο υπολογισμός υποθέτει πως το σύνολο του φαρμάκου φτάνει στο στόχο του. Αν όμως ληφθεί υπ' όψη η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου τότε απαιτείται αναστολέας με  $K_i \approx 0.1 \mu M$  [Witters&Avruch, 1978].

#### 4. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

##### 4.1 Αρχές Ενζυμικής κινητικής

###### 4.1.1 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
- μεγάλη ικανότητα ρύθμισης.

Όλα τα ένζυμα συνδέουν αντιστρεπτά το υπόστρωμά τους σε μια ειδική περιοχή δέσμευσης γνωστής 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 συμπαραγόντες 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, 2001].

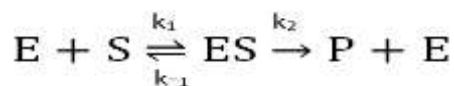
#### 4.1.2 Σχέση της ταχύτητας της αντίδρασης προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων διατυπώθηκε από τους Michaelis-Menten, ασχολείται με την μέτρηση χαρακτηριστικών σταθερών του κάθε ενζύμου,  $V_{max}$  και  $K_M$  και με την μέτρηση των παραγόντων που επηρεάζουν τη ενζυμική αντίδραση.

Οι κυριότεροι παράγοντες είναι:

- Η συγκέντρωση του ενζύμου
- Η συγκέντρωση του υποστρώματος και άλλων ουσιών που μπορούν να συνδεθούν το με το ένζυμο (προϊόντα αντιδράσεων, συνένζυμα, ενεργοποιητές, αναστολείς )
- Το pH
- Η θερμοκρασία
- Η ιοντική ισχύς

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 [Γεωργάτσος, 2001].

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

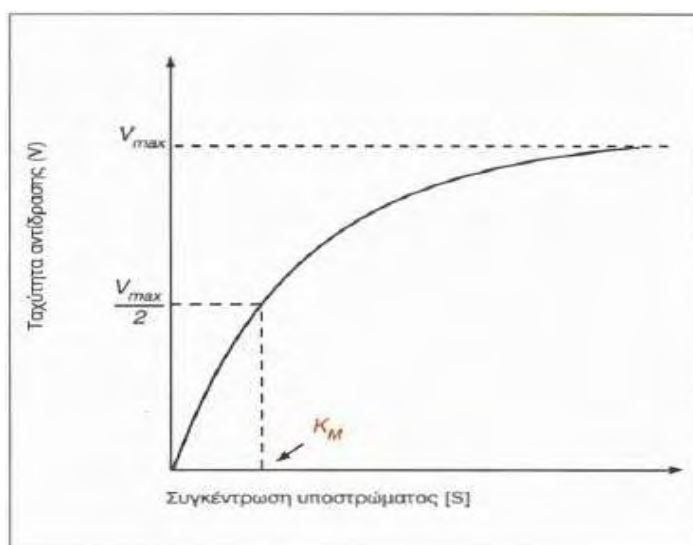
$$V_0 = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Όπου  $V_0$  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 : [Γεωργάτσος, Εκδόσεις Ζήτη, 2001]

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

#### 4.1.3 Κινητική Michaelis-Menten

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 34). 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 , 2012].



**Εικόνα 17 :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  $V_{max}/2$

#### 4.1.4 Η σταθερά $IC_{50}$

Ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του  $IC_{50}$  και για συγκεκριμένη συγκέντρωση G1P (1-φωσφορικής γλυκόζης). Αυτό το ποσοτικό μέτρο δείχνει την ποσότητα ενός συγκεκριμένου φαρμάκου ή άλλης ουσίας (αναστολέας) που είναι απαραίτητη για να αναστείλει μια δεδομένη βιολογική διεργασία (ή συστατικό μιας διαδικασίας, δηλαδή ένα ένζυμο, κύτταρο, κυτταρικό υποδοχέα ή μικροοργανισμού) κατά το ήμισυ. Οι τιμές συνήθως εκφράζονται ως μοριακή συγκέντρωση. [Παπαπολυμέρου,2010]



Εικόνα 18 :Σχηματική αναπαράσταση της IC50

#### 4.1.5 Οι καταλυτικές σταθερές $K_M$ και $V_{max}$

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, 2012].

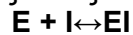
Μια άλλη πολύ χρήσιμη σταθερά είναι ο αριθμός ανακύκλωσης ή  $k_{cat}$ , ο οποίος ορίζεται ως  $k_{cat} = V_{max} / [E]_T$ , όπου  $[E]_T$  είναι η ολική συγκέντρωση του ενζύμου. Η  $k_{cat}$  αντιστοιχεί στον μέγιστο αριθμό moles υποστρώματος που μπορούν να μετατραπούν σε προϊόν ανά mole ενζύμου ανά μονάδα χρόνου σε συνθήκες ενζυμικού κορεσμού, αντιπροσωπεύει δηλαδή τη μοριακή ενεργότητα του ενζύμου και εκφράζεται σε  $\text{sec}^{-1}$ . 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, 2012].

## 4.2 Αναστολείς ενζυμικών αντιδράσεων

### 4.2.1 Αναστολείς

Αναστολέας ονομάζεται μια ουσία που προκαλεί παρεμπόδιση της ενζυμικής αντίδρασης. Μπορεί να είναι αντιστρεπτός ή μη αντιστρεπτός. Αντιστρεπτός είναι ο αναστολέας που μπορεί να αφαιρεθεί από το περιβάλλον του ενζυμικού συστήματος σχετικά εύκολα και όταν αφαιρεθεί, το ένζυμο επανακτά τη δραστηριότητά του. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας αντιδρά χημικά με κάποιο στοιχείο του ενεργού κέντρου, είτε παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος, είτε και εξουδετερώνει κάποια πλάγια αλυσίδα ενός αμινοξέος που συμμετέχει στην καταλυτική διεργασία. Ο αναστολέας στην περίπτωση αυτή δεσμεύεται συνήθως με ομοιοπολικό δεσμό και δεν μπορεί ν' απομακρυνθεί με ήπια μέσα όπως και η διαπίδυση. Τέτοιου είδους αναστολέας είναι η οργανοφωσφορική ένωση διίσοπροπυλφθοριοφωσφορικό οξύ που παρεμποδίζει τη δράση υδρολυτικών και άλλων ενζύμων, γιατί δημιουργεί εστερικό δεσμό με την υδροξυλομάδα σερίνης του ενεργού κέντρου. Πολλές φορές οι συνέπειες ενός μη αντιστρεπτού αναστολέα μπορεί να

αντιστραφούν με χημικά μέσα και το ένζυμο να δρα και πάλι. Οι αντιστρεπτοι αναστολείς από την άλλη μεριά δεσμεύονται αμφίδρομα μη ομοιοπολικά με το ένζυμο, έτσι ώστε ν' αποκαθίσταται μια κατάσταση ισορροπίας όπως :



Όπου I είναι ο αναστολέας και EI το σύμπλοκο ενζύμου αναστολέα

Η σταθερά δημιουργίας του συμπλόκου EI δίνεται από τη σχέση

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

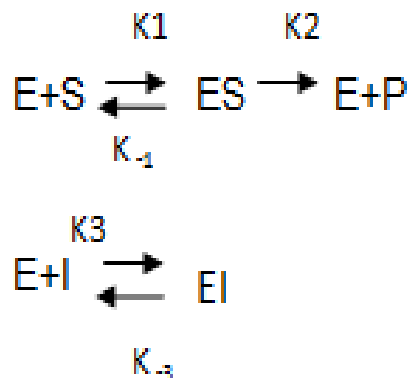
η οποία αφορά τη διάσταση του συμπλόκου EI και επηρεάζει την  $K_M$  ή την  $V_{max}$  του ενζύμου με τον όρο  $1+[I]/K_i$  [Γεωργάτσος, Εκδόσεις Ζήτη, 2001].

#### 4.2.2 Τύποι ενζυμικής αναστολής

Διακρίνονται τέσσερις τύποι ενζυμικής αναστολής:

- I. Η συναγωνιστική αναστολή
- II. Η μη συναγωνιστική αναστολή
- III. Η μικτή αναστολή και
- IV. Η ανταγωνιστική αναστολή

- 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. Το σχήμα των αντιδράσεων στο σύστημα θα έχει ως εξής :



#### Εικόνα 19 : Τρόποι δράσης αναστολέων

A) Σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος απουσία αναστολέα B) Συναγωνιστικός αναστολέας συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το υπόστρωμα δεν συνδέεται. Γ) Μη ανταγωνιστικός αναστολέας συνδέεται σε σημείο διαφορετικό με το ενεργό κέντρο. Το

υπόστρωμα συνεχίζει να συνδέεται, αλλά το ένζυμο δεν καταλύει την αντίδραση λόγω της παρουσίας του αναστολέα .

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:

### 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:

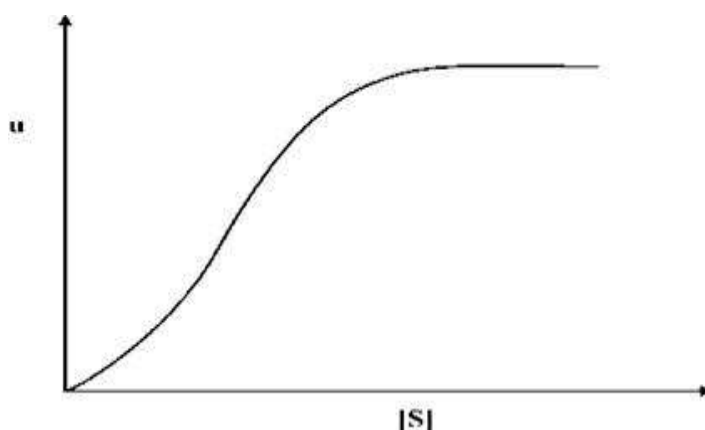
$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M(1 + [I]/K_i)}$$

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 αγκιστεία 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, 2001].

- Στη **μη-συναγωνιστική αναστολή**, Αν αντί ο αναστολέας I να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα S για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ενζύμου, δηλαδή το ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή, τότε αναφερόμαστε σε μη συναγωνιστική αναστολή. Ενώ λοιπόν συναγωνιστική αναστολή η ταυτόχρονη δέσμευση αναστολέα και υποστρώματος στο ένζυμο αποκλείεται, στη μη συναγωνιστική αναστολή δεν αποκλείεται και μπορεί να δημιουργηθεί ένα τριπλό σύμπλοκο του να τύπου EIS. Έτσι, το σχήμα των αντιδράσεων σ' αυτήν την περίπτωση θα είναι η εξής: [Γεωργάτσος, Εκδόσεις Ζήτη, 2001]

Έχουμε περιπτώσεις της πλήρους συναγωνιστικής και μη συναγωνιστικής αναστολής. Ο αναγνώστης όμως πρέπει έχει υπόψη του ότι υπάρχουν περιπτώσεις μερικής συναγωνιστικής (όπου ο αναστολέας ελαττώνει την αγκιστεία του ενζύμου για το υπόστρωμα του, χωρίς ν' αποκλείει τελείως τη δημιουργία συμπλόκου EIS) καθώς και μερικής μη συναγωνιστικής αναστολής (όπου το σύμπλοκο EIS μπορεί να δώσει προϊόντα).

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 ( $V_0$ ) και στη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ . 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 δραστηριότητα των άλλων υπομονάδων για τη σύνδεση άλλων μορίων υποστρώματος. Επιπλέον, η δραστηριότητα των αλλοστερικών ενζύμων μπορεί να μεταβληθεί από ρυθμιστικά μόρια που προσδένονται 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 KM δεν χρησιμοποιείται με αλλοστερικά ένζυμα [Stryer, 2012].



**Εικόνα 20 :** Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου. Τα αλλοστερικά ένζυμα εμφανίζουν σιγμοειδή εξάρτηση της ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος [Stryer, 2012].

## 5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Υλικά Μέθοδοι

#### 5.1 Απομόνωση φωσφορυλάσης γλυκογόνου b από σκελετικούς μυς κουνελιού:

Η απομόνωση της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από σκελετικούς μυς κουνελιού γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Fischer&Krebs (1962), με μικρές μόνο τροποποιήσεις (αντί L-κυστεΐνης χρησιμοποιείται 2-μερκαπτοαιθανόλη ως αναγωγικός παράγοντα) [Μελιρίδου&Οικονομακος, 1983].

##### 5.1.1 Υλικά:

- Κουνέλια *Oryctolacus cunicullus* (3 αρσενικά μετρίου μεγέθους)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50 mM β-φωσφογλυκερόλης, HCl, 50 mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA)
- Κεκορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού καλίου ( $\text{KHCO}_3$ )
- Διάλυμα οξικού οξέος  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1N
- Διάλυμα θειϊκού αμμωνίου 3.6M

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris [τρεις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθανίου]/HCl 0.001M] (pH 7.5)
- Διάλυμα Tris 2.0M
- Διάλυμα β-μερκαπτοαιθανόλης 0.3M (pH 7.0)
- Διάλυμα EDTA (αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικού οξέος) 0.1M (pH 7.0)
- Διάλυμα AMP (5'-φωσφορικής αδενοσίνης) 0.1M, pH7.0
- Διάλυμα (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 1.0M
- Γλυκερόλη
- Μεμβράνες διαπίδυσης (οι οποίες έχουν υποστεί κατεργασία με 1% NaCO<sub>3</sub> και 10mMEDTA στους 100°C, συνεχείς εκπλύσεις με απιονισμένο ύδωρ πριν από τη χρήση τους και αποθήκευση σε 100% αιθανόλη στους 4°C )

### **5.1.2 Όργανα:**

- Φυγόκεντρος
- Πεχάμετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Χρονόμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

### **5.1.3 Πορεία:**

#### **Βήμα 1<sup>ο</sup>: Παραλαβή μυϊκού ιστού και εκχύλιση του ενζύμου από αυτόν.**

Αρχικά αφαιρούνται οι σκελετικοί μυς από 3 κουνέλια. Οι μυς αλέθονται με μηχανή κιμά και ζυγίζονται. Πραγματοποιούνται 3 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 αριθμητικά ίσο με το μισό του βάρους των μυών. Κάθε φορά το εκχύλισμα διηθείται μέσω γάζας. Η συνολική διάρκεια των εκχυλίσεων δεν πρέπει να ξεπερνάει τα **30 λεπτά**. Το εκχύλισμα που συλλέγεται φιλτράρεται μέσω υαλοβάμβακα για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών και των αιωρούμενων σωματιδίων.

#### **Βήμα 2<sup>ο</sup>: Όξινη καταβύθιση άλλων ενζύμων**

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.1-5.2 με προσθήκη διαλύματος CH<sub>3</sub>COOH 1N υπό ελαφρά ανάδευση. Το εκχύλισμα αφήνεται για 5 min σε πάγο. Λόγω της κατακρήμνισης των πρωτεϊνών, η θολρότητα του εκχυλίσματος αυξάνεται. Οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (4225rcf) για 30min σε θερμοκρασία 0-4°C. Το υπερκείμενο διηθείται με αντλία κενού Buchner εν ψυχρώ, για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιωρούμενου υλικού. Ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 6.8 με κορεσμένο KHCO<sub>3</sub> και ογκομέτρηση του διαλύματος.

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

Το ένζυμο καταβυθίζεται με θειϊκό αμμώνιο κορεσμού 41%, με προσθήκη όγκου διαλύματος θειϊκού αμμωνίου κορεσμού 90% ίσο ως προς 0.837 για κάθε L ενζυμικού διαλύματος. Το διάλυμα παραμένει στους 4 °C για τουλάχιστον 16 ώρες. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αποχύνεται με χρήση αντλίας και το ίζημα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 5110rcf για 40min 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<sup>ο</sup>: Θερμική κατεργασία σε υψηλό pH**

Το διάλυμα συλλέγεται και διαυγάζεται με φυγοκέντρηση στις 34540rcf για 30min στους 0-4°C. Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος 0.3M 2-μερκαπτοαιθανόλης pH 7.0 όγκου ίσο με το 3/27 του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος, διαλύματος 0.1M EDTA pH 7.0 ίσο με το 5/1000 του πρωτεϊνικού διαλύματος και της προστιθέμενης μερκαπτοαιθανόλης. Επίσης, προστίθεται 2M Tris ώστε το pH του πρωτεϊνικού διαλύματος να γίνει 8.8 (Η προσθήκη γίνεται αργά και υπό ανάδευση και το pH μετράται με πεχάμετρο). Μετά από επώαση του



μίγματος στους 37°C για μια ώρα με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα και ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται διάλυμα CH<sub>3</sub>COOH 1N, για ρύθμιση του pH στο 7.0. Στη συνέχεια, το μίγμα φυγοκεντρείται στις 34540rcf για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C και το υπερκείμενο (ενζυμικό διάλυμα) ογκομετρείται.

#### Βήμα 5<sup>ο</sup>: Κρυστάλλωση και ανακρυστάλλωση

Η κρυστάλλωση πραγματοποιείται με την προσθήκη AMP 0.1M (pH 7.0) και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg 1M (pH 7.0) ανά 100mL υπερκείμενου διαλύματος, εντός των σωλήνων φυγοκέντρωσης, (το AMP και το (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg διευκολύνουν την κρυστάλλωση). Το μίγμα αφήνεται στους 0°C για τουλάχιστον 6 ώρες όπου και ολοκληρώνεται η κρυστάλλωση της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι συλλέγονται με φυγοκέντρωση στις 28710rcf για 10min σε θερμοκρασία 0-4°C και διαλυτοποιούνται στους 30°C με όσο το δυνατό μικρότερο όγκο διαλύματος αραίωσης (β-GP/Merc/EDTA, 50:50:1, pH 6.8).

Το εναιώρημα επαναφυγοκεντρείται στις 28710rcf για 10min σε θερμοκρασία 25-30°C για την απομάκρυνση αδιάλυτων σωματιδίων (συσσωματωμάτων). Ακολουθεί η πρώτη ανακρυστάλλωση με την προσθήκη AMP και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg, όπως ακριβώς στην κρυστάλλωση. Το μίγμα αφήνεται για κρυστάλλωση στους 0-4°C για χρονικό διάστημα 6h. Τα στάδια της συλλογής, αναδιαλυτοποίησης και ανακρυστάλλωσης, γίνονται τουλάχιστον 4 φορές ενώ η τελευταία ανακρυστάλλωση γίνεται απουσία AMP και (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg.

#### Βήμα 6<sup>ο</sup>: Συλλογή και αποθήκευση ενζύμου

Οι κρύσταλλοι της φωσφορυλάσης b γλυκογόνου μετά την τελευταία ανακρυστάλλωση και συλλογή διαλυτοποιούνται με επώαση στους 30°C. Προσδιορίζεται η ενζυμική συγκέντρωση με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280 nm και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης. Το διάλυμα ενζύμου-γλυκερόλης αποθηκεύεται στους -20°C.

## 5.2 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ:

### 5.2.1 Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας GP<sub>a</sub>

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, μmolmin<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος), ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου Glycogen<sub>(n)</sub>, προς Glycogen<sub>(n-1)</sub> και την απελευθέρωση 1 φωσφορικής γλυκόζης glucose-1-P.



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

### 5.2.2 Πορεία:

Δείγμα από το ενζυμικό παρασκεύασμα αραιώνεται και λαμβάνεται το εναιώρημα ένζυμου περιεκτικότητας ~500μg/mL. Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται το ενζυμικό μίγμα που περιέχει 25μg ενζύμου ανά mL, γλυκογόνο 0.2% (w/v) και ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ένζυμου 5% (v/v). Σε δοκιμαστικό σωλήνα παρασκευάζεται επίσης το υπόστρωμα για α-D-Glc-1-P σε συγκεντρώσεις 2.0-4.0-6.0-10-20mM με προσθήκη 40μL υποστρώματος και 104μL H<sub>2</sub>O (κατάλληλο για τέσσερα δείγματα).

Τοποθετείται το ενζυμικό μίγμα για επώαση στους 30°C επί 15 λεπτά, ενώ το υπόστρωμα επί περίπου 3 λεπτά. Μετά την επώαση 36μL από το ενζυμικό μείγμα

προστίθενται στον σωλήνα του υποστρώματος για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στις συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αντίδραση έχουμε: 3μg ένζυμο ανά mL, 0.2 % w/v γλυκογόνο, υπόστρωμα α-D- Glc-1-P στις διάφορες συγκεντρώσεις, 50mM υδροχλωρικής τριαιθανολαμίνης, 100mMKCl και 1mMDTT. Επίσης η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6.8. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (ενός λεπτού) λαμβάνονται δείγματα των 40μL από το μίγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 10μLSDS 1.0% (παρουσία απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται). Στα δείγματα γίνεται φωτομετρικός 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 παρουσίας φωσφορικών).

### 5.3 Παρασκευή διαλυμάτων υποστρωμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις 1-φωσφορικής γλυκόζης

- Ρυθμιστικό Διάλυμα 1 : Ιμιδαζόλιο 200mM, KCl 400mM, DTT 4mM, EDTA 4mM σε pH 6.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα 2 : Ιμιδαζόλιο 135mM, KCl 270mM, DTT 2,7mM, EDTA 2.7mM σε pH 6.8 (με αραιώση του P.Δ 1 )

Αφού παρασκευαστούν τα ρυθμιστικά διαλύματα φυλάσσονται στους 4 °C.

Κατόπιν παρασκευάζεται η συγκέντρωση της G-1-P 90mM χρησιμοποιώντας, 225μL απο το πυκνό διάλυμα της G-1-P[400]. 675 μL ρυθμιστικό διάλυμα 1 και 100μLH<sub>2</sub>O. Για την παρασκευή των υπόλοιπων συγκεντρώσεων της G1P, δηλαδή 9mM, 18mM, 27mM, 45mM χρησιμοποιούμε αντίστοιχα :

9mM : 100μLG1P[90] και 900μL ρυθμιστικό διάλυμα 2  
18mM : 200μLG1P[90] και 800μL ρυθμιστικό διάλυμα 2  
27mM : 300μLG1P[90] και 700μL ρυθμιστικό διάλυμα 2  
45mM : 500μLG1P[90] και 500μL ρυθμιστικό διάλυμα 2

Αφού παρασκευαστούν τα παραπάνω διαλύματα φυλάσσονται στους -20 °C για να αποφευχθεί η υδρόλυση της G1P

### 5.4 Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ ) της GPα:

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

#### 5.4.1 Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

- Υδατόλουτρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Ζυγός
- Vortex
- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο
- Πιπέτες
- Χρονόμετρο
- Δοκιμαστικοί σωλήνες

### 5.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ IC<sub>50</sub> ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ:

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας σύνθεσης του γλυκογόνου και της απελευθέρωσης των ορθοφωσφορικών ιόντων.

Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής. Η σταθερά  $IC_{50}$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του  $IC_{50}$  και για συγκεκριμένη συγκέντρωση G1P (1-φωσφορικής γλυκόζης). Μελετήθηκαν οι TFC2\_54\_G1, TFC2\_43\_G2, TFC2\_43\_G3.

### 5.5.1 Υλικά:

- Απιονισμένο νερό
- Διάλυμα ενζύμου
- Διάλυμα 1-φωσφορικής γλυκόζης ( $\alpha$ -D- Glc-1-P) 18mM
- Διάλυμα 5' μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) 50mM
- Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου, 50:50:1, pH 6.8 (50mM  $\beta$ -φωσφογλυκερόλης ( $\beta$ -GP), 50mM  $\beta$ -μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA)
  - Γλυκογόνο 1 % (w/v)
  - Διάλυμα SDS 1% (w/v)
  - Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8
  - Διάλυμα του αναστολέα

### 5.5.2 Όργανα:

- Υδατόλουτρο ( ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία πάντα στους 30° C.)
- Φασματοφωτόμετρο (ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 850nm)
- Δοκιμαστικούς σωλήνες
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Συσκευή vortex
- Συσκευή μέτρησης pH (pHμετρο)
- Χρονόμετρο

### 5.5.3 Πορεία :

#### **Παρασκευή διαλύματος GPb-γλυκογόνου:**

Από το εναιώρημα του ενζύμου που φυλάσσεται σε γλυκερόλη παίρνουμε 10μl 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  $b=1\text{cm}$  (ξέρουμε προς ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης του ενζύμου είναι 1.32).

Εν συνεχεία παρασκευάζεται ενζυμικό διάλυμα σε δοκιμαστικό σωλήνα το οποίο περιέχει 25μg/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 μg/mL, AMP 1.0 mM, γλυκογόνο 0.2 % w/v και υπόστρωμα  $\alpha$ -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.

#### **Εκτέλεση του Πειράματος:**

Μετά την επώαση του ενζυμικού διαλύματος, μεταφέρονται 36μl από το ενζυμικό μίγμα στον χρόνο 0 σε κάθε διάλυμα υποστρώματος όγκου 144 μL, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ακολουθως, ανά 1 λεπτό (σε χρόνους 1', 2', 3', 4'), λαμβάνονται από 40 μL και μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 10μL SDS 1% (w/v). Έτσι σταματά η ενζυμική αντίδραση, αφού παρουσία απορρυπαντικού

τοένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε μία διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα.

Στα δείγματα που έχουν ληφθεί προστίθενται 0.7 ml διαλύματος ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15min και ακολουθεί φωτομέτρηση τους σε μήκος κύματος 850nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των Ρi που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit, προκειμένου να προσδιοριστεί η IC<sub>50</sub>. Εκτός από τα δείγματα, γίνεται προσδιορισμός και σε τυφλά α-D- Glc-1-P, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της, αλλά και του ενζυμικού διαλύματος, λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.

## 5.6 Προσδιορισμός φωσφόρου

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην βιοχημεία, κυρίως στον προσδιορισμό δραστικότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η ελευθέρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων κατά την πορεία σχηματισμού του γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου. Η χρησιμότητα του προσδιορισμού του ανόργανου φωσφόρου οδήγησε σε μια συνεχή τροποποίηση και βελτιστοποίηση της αρχικής μεθόδου που προτάθηκε από τους Fiske και Subbarow (1925).

## 5.7 Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος προσδιορισμού της IC<sub>50</sub> βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του γλυκογόνου που καταλύεται από την GPb. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να διορθωθούν οι απορροφήσεις λόγω της παρουσίας ορθοφωσφορικών ιόντων τα οποία δεν προκύπτουν από την δράση του ενζύμου. Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά:

- Τυφλό νερού για τον μηδενισμό του φωτομέτρου.
- Τυφλό με την συγκέντρωση της α-D- Glc-1-P που χρησιμοποιείται, λόγω της φυσικής υδρόλυσης της.
- Τυφλό γλυκογόνου (ενζυμικού διαλύματος) λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών.
- Παρασκευάζονται από δυο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός του νερού, και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεων τους. Επίσης, παρασκευάζεται γνωστό πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων από την οπτική απορρόφηση του όποιου, εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε μολPi.

## 5.8 Μέθοδος ασκορβικού οξέος –μολυβδαινικού αμμωνίου

Η μέθοδος 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.

### 5.8.1 Υλικά

(Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάζονται την ίδια μέρα που θα εκτελεστεί το πείραμα):

- Διάλυμα μολυβδαινικού και ρύθμιση σε τελικό pH 5.0 . Επειδή πρόκειται για φωτοευαίσθητο διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο γιάλυνο δοχείο Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM και οξικό ψευδάργυρο 100 mM. Η ρύθμιση του pH γίνεται με HCl 10N
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v) και ρύθμιση σε τελικό pH 5.0. Η ρύθμιση του pH γίνεται προσθέτοντας σταδιακά NaOH 10N
- Αναμειγνύουμε σε αναλογία 4:1 όγκου αντιδραστήριου μολυβδαινικού προς ασκορβικού οξέος. Το νέο διάλυμα φυλάσσεται μακριά από το φώς αφήνεται για

επώαση τουλάχιστον 15 λεπτά. Κατόπιν αυτού του χρόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί αλλά όχι μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα(>3hrs)

### **5.8.2 Πορεία:**

Στα δείγματα που λαμβάνονται από το κινητικό πείραμα προστίθενται 0.7 mL από το αντιδραστήριο μέτρησης. Μετά από ισχυρή ανάμιξη με Vortex οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30° C για 15min. Ακολουθεί φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 850nm. Επίσης γίνεται προσδιορισμός σε πρότυπο δείγμα φωσφορικών. Στην μέθοδο ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού παρουσία όξινου περιβάλλοντος το ορθοφωσφορικό αντιδρά με το μολυβδαινικό και σχηματίζει φωσφομολυβδαινικό οξύ, το οποίο μειώνεται από το ασκορβικό οξύ για να σχηματιστεί ένα μπλε σύμπλοκο. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με την παρουσία του υπάρχοντος φωσφόρου, έτσι ώστε να μπορέσει να προσδιοριστεί η συγκέντρωση. Η φωτομέτρηση γίνεται στα 850nm.

### **5.9 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ-ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ GRAFIT:**

Αρχικά οι απορροφήσεις των δειγμάτων (ως προς την απορρόφηση λόγω της φυσικής υδρόλυσης της α-D- Glc-1-P και της παρουσίας φωσφορικών στο ενζυμικό μείγμα) μετατρέπονται σε μολι φωσφορικών σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη φωσφορικών. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου παρουσία ή απουσία αναστολέα.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_M$ , mM) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten,

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

V: ταχύτητα

$V_{max}$ : μέγιστη ταχύτητα

[S]: συγκέντρωση υποστρώματος

$K_M$ : σταθερά Michaelis-Menten.

Τέλος, γίνεται η καμπύλη  $V=f([S])$ , η οποία έχει μορφή κινητικής κορεσμού, και υπολογίζεται η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο ήμισυ της  $V_{max}$ . Στον προσδιορισμό της σταθεράς  $IC_{50}$ , οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα.

### **6. ΣΚΟΠΟΣ**

Η αύξηση του αριθμού των ασθενών που πάσχουν από ΣΔ2 έχει οδηγήσει στην ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα με στόχο το σχεδιασμό νέων εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων, τα οποία έχουν στόχο ένζυμα και υποδοχείς που συμμετέχουν στον έλεγχο των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και αποσκοπούν σε μία πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του ΣΔ2. Το ήπαρ είναι ένα όργανο που έχει ως σκοπό να αποκαθιστά της ενεργειακές ανάγκες των άλλων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP), ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, αποτελεί έναν ισχυρό υποψήφιο μοριακό στόχο για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τον έλεγχο της υπεργλυκαιμίας στο ΣΔ2. Υπάρχει μια συνεχής έρευνα για ενώσεις που μπορούν να επιτύχουν τη ρύθμιση της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ ώστε να βελτιώσουν τη θεραπεία του ΣΔ2. Οι προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών σκευασμάτων έχουν ως στόχο την αναστολή της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης (HLGP), 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.

Η παρούσα διπλωματική εργασία διεξήχθη στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η

έρευνα αυτή έχει ως στόχο τη μελέτη ενζύμων του μεταβολισμού του γλυκογόνου, όπως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, για τη κατανόηση της μοριακής βάσης της αναγνώρισης αναστολέων από το ένζυμο και το σχεδιασμό πιθανών υπογλυκαιμικών ενώσεων. Ο βασικός στόχος της έρευνας αυτή είναι η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων για την παραγωγή βιολειτουργικών τροφίμων, κατάλληλα για διαβητικούς, που θα βοηθούν, ίσως και σε μεγάλο βαθμό, στη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα σε φυσιολογικά επίπεδα. 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 ΣΔ2. 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.

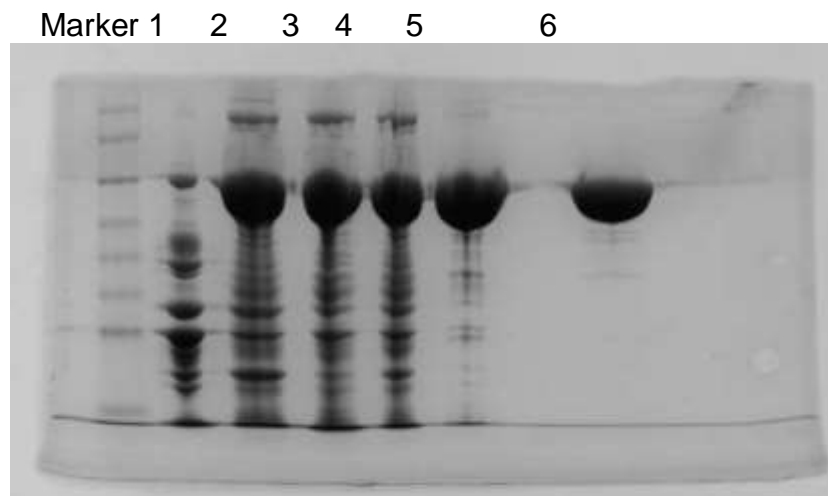
Παρόλο που ο πρωταρχικός στόχος είναι η ηπατική GP, το κρυσταλλογραφικό πρότυπο στο οποίο στηρίζεται ο σχεδιασμός ενώσεων στην παρούσα διατριβή είναι η μυϊκή GP. Η ηπατική GP είναι 80 % ομόλογη ως προς την αμινοξική ακολουθία με την μυϊκή GP, όμως η ομολογία μεταξύ των δυο ενζύμων είναι 100% στην περιοχή του ενεργού κέντρου.

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε τριτερπένια για τον προσδιορισμό της  $IC_{50}$  έναντι της μυϊκής φωσφορυλάσης  $\alpha$  του γλυκογόνου από μύες κονίκλου (RMGP $\alpha$ ).

## 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 7.1 .Απομόνωση φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου

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



**Εικόνα 21** . 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 θερμική κατεργασία σε υψηλό pH. Στην τέταρτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά την πρώτη ανακρυστάλλωση. Στην πέμπτη διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα κατά την τέταρτη ανακρυστάλλωση. Στην έκτη και τελευταία διαδρομή εμφανίζεται το δείγμα μετά το τέλος της διαδικασίας, όπου πλέον έχει απομονωθεί η πρωτεΐνη (GPb).

### 7.2 Μετατροπή της μυϊκής φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου σε $\alpha$

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b ακολουθεί η μετατροπή στην ενεργό μορφή του ενζύμου, την φωσφορυλάση του γλυκογόνου  $\alpha$ . Στο διάλυμα η φωσφορυλάση b έχει πολύ μικρή δραστικότητα και είναι απαραίτητη η παρουσία ενός ενεργοποιητή, που σταθεροποιεί την R διαμόρφωση (π.χ. AMP). Η κινάση

της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι το ένζυμο που καταλύει την ομοιοπολική αυτή μετατροπή, απουσία AMP, της ανενεργού μορφής της φωσφορυλάσης b (GPb) στην ενεργή μορφή α (GPα), απουσία AMP, σε ένα κατάλοιπο σερίνης, Ser14. Η ενεργή μορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου καταλύει τη φωσφορυλίωση του γλυκογόνου για να απελευθερωθεί 1-φωσφορικής γλυκόζη.



Η φωσφορυλίωση είναι μία αναστρέψιμη ομοιοπολική τροποποίηση αμινοξικών καταλοίπων ενζύμων με φωσφορικές ομάδες, μεταφορά της γ φωσφορικής ομάδας του ATP στην σερίνη 14, της GPb. Η παρασκευή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου βασίζεται στη μέθοδο Cohen (Cohen, 1973).

#### Υλικά:

- Διάλυμα μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου 0.5 mg/ml
- Διάλυμα κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Phk) 10 ng/ml
- Διάλυμα ATP 2 mM
- Διάλυμα αραίωσης της Phk (50 mM HEPES, 5 mg/ml BSA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης HEPES 200 mM (4x), pH 8.2
- Απιονισμένο ύδωρ

Η αντίδραση φωσφορυλίωσης πραγματοποιείται σε υδατόλουτρο όπου η θερμοκρασία διατηρείται στους 30 °C για 3 ώρες. Μετά την επώαση ελέγχεται η δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία και απουσία AMP παρουσία υποστρώματος α-D-Glc-1-P. Αύξηση της δραστηριότητας κατά 10-20 % παρουσία AMP θεωρείται ένδειξη της μετατροπής της GPb σε GPα.

#### **7.3 Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης α του γλυκογόνου:**

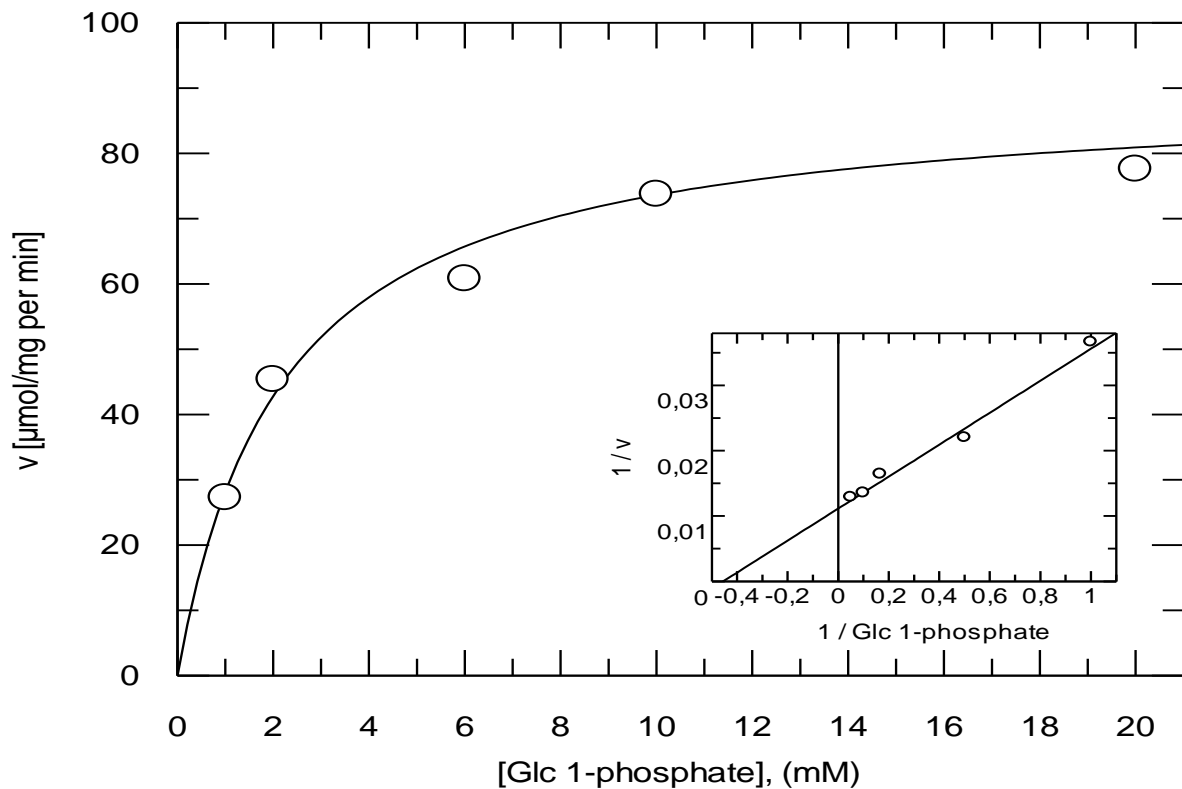
Η σταθερά  $K_M$  (σταθερά Michaelis-Menten) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα (Glc-1-P για το ένζυμο GPα) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η  $K_M$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας ( $V_{max}$ ). Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της  $K_M$ .

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι:

$K_M$ :  $2,2 \pm 0,16$  mM και

$V_{max}$ :  $89,78 \pm 2,42$  μmol/min/mg.

Η μέγιστη ταχύτητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου και δεν αποτελεί σταθερά όπως η  $K_M$ . Η γραφική παράσταση *Michaelis-Menten*, της ταχύτητας ( $v$ ) συναρτήσει της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων  $[S]$  οδηγεί σε ορθογώνια υπερβολή:



**Εικόνα 22 :** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης b του γλυκογόνου (GPb), σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος της Glc-1-P [2, 4, 6, 10, 20 mM], στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, και γλυκογόνου 0.2% w/v . Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

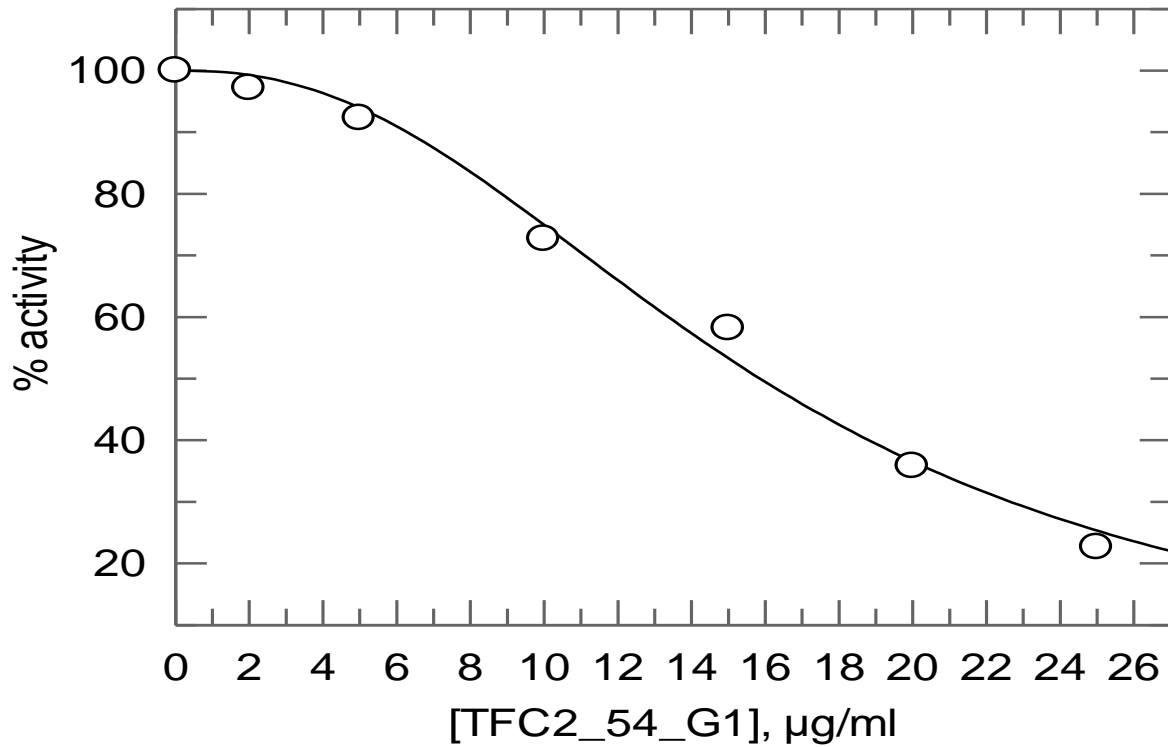
#### 7.4 Προσδιορισμός των σταθερών $IC_{50}$

Μελετήθηκε η παραγωγή προϊόντος της αντίδρασης σε συνάρτηση με το χρόνο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου στις διάφορες συγκεντρώσεις αναστολέα κάθε φορά

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα που προέκυψαν κατά τον προσδιορισμό των  $IC_{50}$

##### 7.4.1 $IC_{50}$ (TFC2\_54\_G1): $15,86 \pm 0,45 \mu\text{g}/\text{ml}$



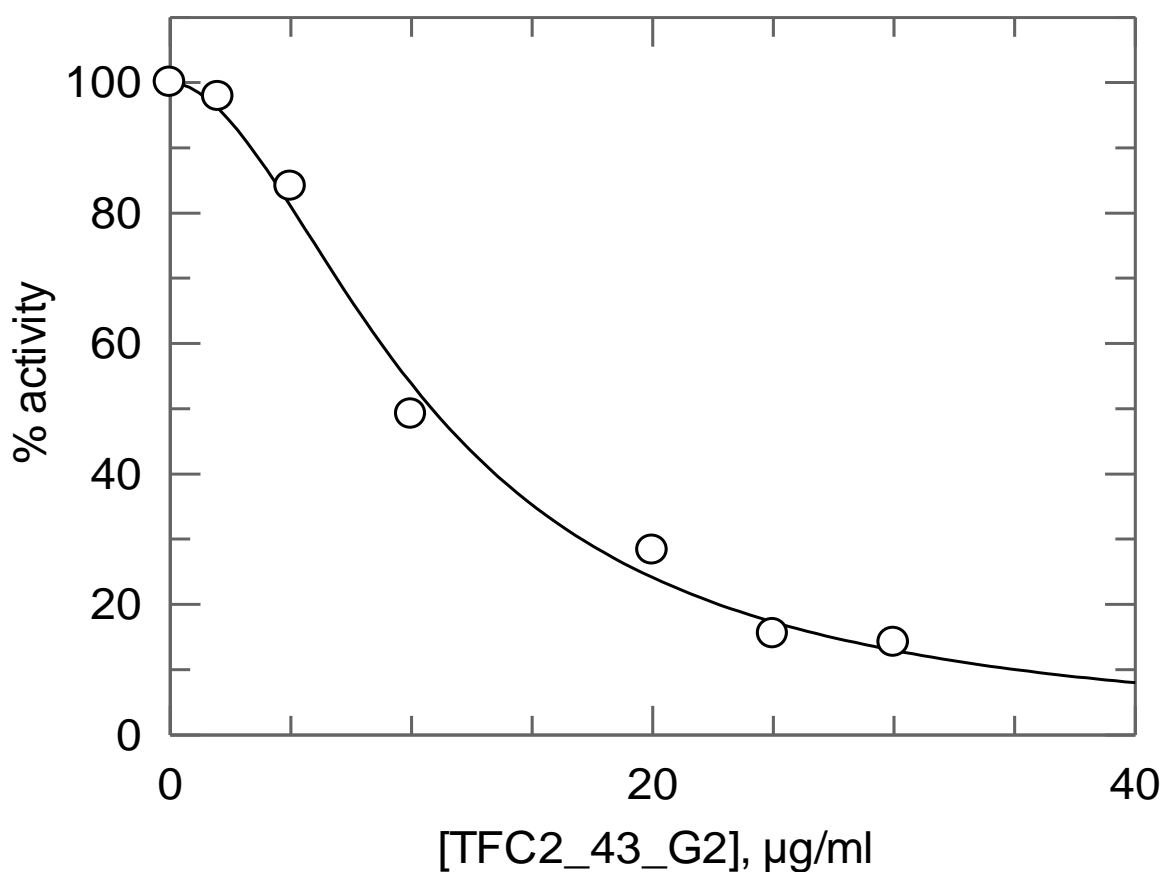


**Εικόνα 23 :** Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης TFC2\_54\_G1 και υπολογισμός της IC<sub>50</sub>.

**Πίνακας 1:** Συγκέντρωση επί τοις εκατό της δραστηκότητας του αναστολέα

C (µg/ml)	% Activity
2	97.18
5	92.27
10	72.69
15	58.16
20	35.82
25	22.64

**7.4.2 IC<sub>50</sub> (TFC2\_43\_G2):** 10,85 ± 0,51 µg/ml

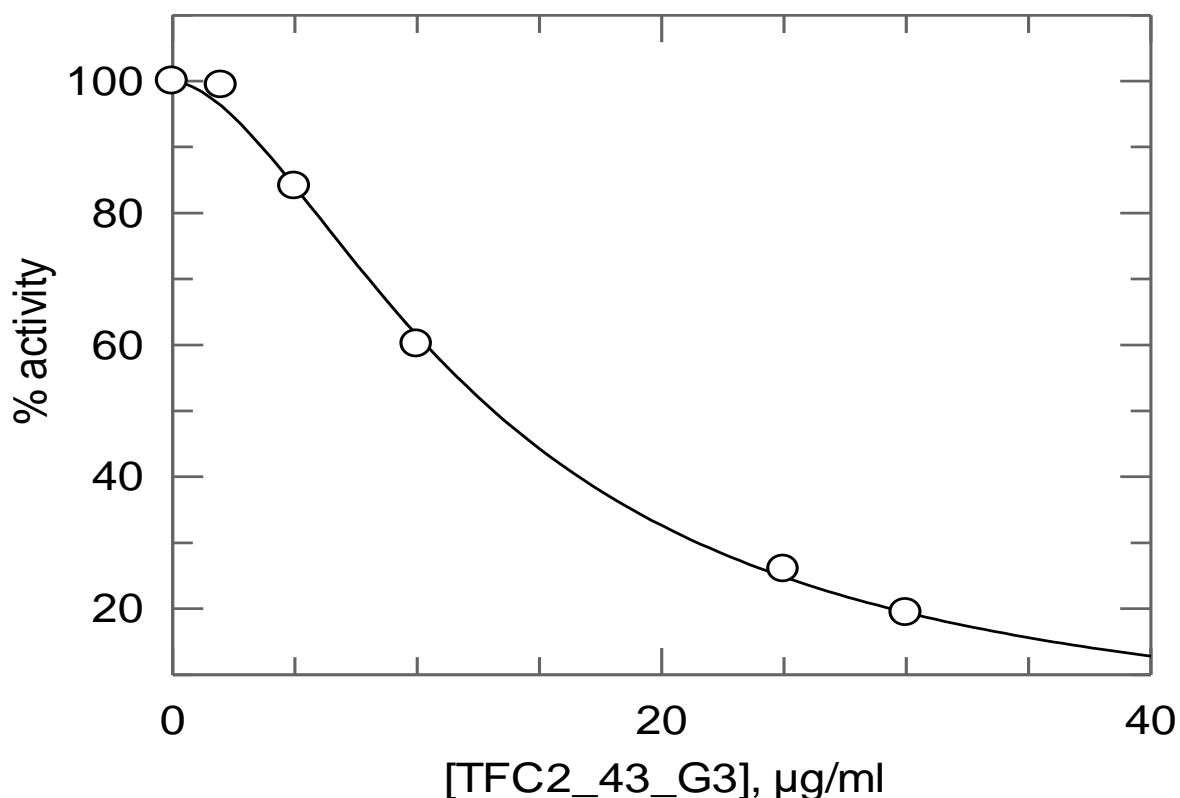


**Εικόνα 24:** Καμπύλη της δραστικότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης TFC2\_43\_G2 και υπολογισμός της IC<sub>50</sub>.

**Πίνακας 2:** Συγκέντρωση επί τοις εκατό της δραστικότητας του αναστολέα

C (µg/ml)	% Activity
2	97.83
5	84.04
10	49.15
20	28.28
25	15.48
30	14.12

**7.4.3 IC<sub>50</sub> (TFC2\_43\_G3): 13,12 ± 0,38 µg/ml**



**Εικόνα 25** : Καμπύλη της δραστηκότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης TFC2\_43\_G3 και υπολογισμός της IC<sub>50</sub>.

**Πίνακας 3:** Συγκέντρωση επί τοις εκατό της δραστηκότητας του αναστολέα

C (µg/ml)	% Activity
2	99.36
5	84.04
10	60.13
25	25.95
30	19.38

### 7.5 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 ΣΔ2.

Για να εκτιμηθεί η ανασταλτική ικανότητα των εκχυλισμάτων προσδιορίστηκαν οι σταθερές IC<sub>50</sub> τριών εκχυλισμάτων (TFC2\_54\_G1, TFC2\_43\_G2, TFC2\_43\_G3) προς τη κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου. Η κινητική μελέτη έδειξε ότι τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν μείωση της δραστηκότητας του ενζύμου κατά 50% (IC<sub>50</sub>), σε σημαντικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι αναστολείς βρέθηκαν να έχει IC<sub>50</sub> κοντά στα 10 µg/mL, γεγονός που υποδηλώνει ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) σε σημαντικά χαμηλή συγκέντρωση [Kantsadi A.L. et al., 2014].

Η μετέπειτα εφαρμογή μεθόδου της κρυσταλλογραφίας συγγένειας με τα παραπάνω εκχυλίσματα, 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 ΣΔ2, όμως απαιτούνται και περαιτέρω μελέτες *in vivo* για επιβεβαίωση.

## Βιβλιογραφία

- Γ. ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ , ΙΑΤΡΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΕΚΔΟΣΗ 11<sup>η</sup> έκδοση GUYTON & HALL ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ,2008 , ΑΘΗΝΑ
- Δασκαλάκη Α. Ελένη. (2009). Σχεδίαση, Ανάπτυξη και *Insilico* Συγκριτική Αξιολόγηση Ελεγκτών Κλειστού Βρόχου για Άτομα με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1
- Δρ.ΠΑΠΑΠΟΛΥΜΕΡΟΥ,Δ.Ξ.ΣΠΗΛΙΩΤΗΣ Εργατηριακές Σημειώσεις Γενικής Χημείας, ,Πρώτη Έκδοση,Λάρισα,2010
- ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΔΙΑΒΗΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ, 3(2), 073-80, 1990
- Η ολοκλήρωση του μεταβολισμού, ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ- κεφ.30
- Ι.Γ.Γεωργάτσου Εισαγωγή στη Βιοχημεία Πέμπτη Έκδοση, ,2001
- Ι.Γ. Γεωργάτσος – Τ.Α. Γιουψάνης – Δ.Α. Κυριακίδης, Εκδόσεις Ζήτη, Νοέμβριος 2001, Θεσσαλονίκη
- Ι.Γ.ΓΕΩΡΓΑΤΣΟΥ , Εισαγωγή στη Βιοχημεία ,Πέμπτη Έκδοση,.2001.ISBN:960-7425-02-2
- Ιδεώδες Ασκληπιακό Πάρκο Ιατρικής Σχολής (ΙΑΣΠΙΣ): "Γλυκαγόνη".
- Κανακά - Gantenbein Χ: "Εισπνεόμενη ινσουλίνη στο Διαβήτη" Παιδιατρική Θεραπευτική Ενημέρωση, 193-196, 2006
- Λεπουρας Αντωνιος -Σακχαρώδης Διαβήτης -Προδιαβήτη
- Μελέτη, Ελληνίδα Κατιρτζόγλου Πτυχιακή εργασία Υπολογισμός δείκτη κυνδίνου για αναπτηξη του Σ.Δ
- Ξ.Θ. Ζήκου, Κ.Π.Καταπώδης , Ελληνική Νεφρολογία 2012 .24 (1):47-55
- Οικονομάκος Ν. Γ. (2001). Σχεδιασμός νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, *Χημικά Χρονικά*. Vol 63
- Παναγιώτης Κατινάκης , Βιοχημεία,2004, Πρώτη Έκδοση
- Πετρωτός Κωνσταντίνος “Δοκιμές βιο-δραστικότητας των παραγόμενων πολυφαινολών (εγκλωβισμένων σε φορείς ή μη) σε ιατρικές εφαρμογές”, Λάρισα, 2015
- Σπύρος ΚαρράςΣακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 Συγγραφέας , Νοεμβριο 2014
- Φυσιολογία Αθανάσιου Σκομοβήτη,8<sup>η</sup> έκδοση,ISBN 978-618-5105-25-9, 2014,(σελ.427-430)

- Χριστίνα Πιπέρη , Βιολογική Χημεία , Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου στα ζώα , , Αναπλ. Καθηγήτρια Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας Ιατρική Σχολή, Παν/ου Αθηνών
- Stryer Lubert, Berg Jeremy, Tymoczko John (2012). *Βιοχημεία*. Ενιαίος Τόμος. Έκδοση 1<sup>η</sup>. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. Ηράκλειο
- Stryer, (1997). *Βιοχημεία*, Τόμος Δεύτερος, σελ.1120-1144. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
- American Diabetes Association 2451 Crystal Drive, Suite 900, Arlington, VA 22202 1-800-DIABETES (800-342-2383 - <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/type-1/#sthash.BJgQRvW5.dpuf> Type 1 Diabetes
- Am J Cardiol. 2012 Nov 1;110(9):1225-30. doi: 10.1016/j.amjcard.2012.06.020. Epub 2012 Jul 18. Prognostic information of glycogen phosphorylase isoenzyme BB in patients with suspected acute coronary syndrome. Lillpopp L<sup>1</sup>, Tzikas S, Ojeda F, Zeller T, Baldus S, Bickel C, Sinning CR, Wild PS, Genth-Zotz S, Warnholtz A, Lackner KJ, Münzel T, Blankenberg S, Keller T
- Aiston S., Hampson L., Gómez-Foix A.M., Guinovart J.J., and Agius L. (2001). Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity. *J. Biol. Chem.* Vol 276: 23858–23866.
- Assoc Prof Christopher J Nolan, FRACP, Prof Peter Damm, DMSc , Prof Marc Prentki, PhD Published: 25 June 2011 - Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management
- Apollo Sugar. Type 2 Diabetes Causes & Risk Factors , 2016
- Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design Nikos G Oikonomakos<sup>1\*</sup> & László Somsák<sup>2\*</sup>, *Current Opinion in Investigational Drugs* 2008 9(4):379-395
- Blundell T.L., Jhoti H., Abell C. (2002). High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nature Reviews. Drug Discovery*. Vol 1.
- *Christian Weyer, Clifton Bogardus, David M. Mott, and Richard E. Pratley* First published September 15, 1999, The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus
- Diplock A.T., Aggett P.J., Ashwell M., Bornet F., Fern E.B., Roberfroid M.B. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document. *British Journal of Nutrition*. Vol 81 (Suppl. 1).
- Dodson GG, Whittingham JL: "3.5 Insulin Structure and Diabetes Treatment" (York Structural Biology Laboratory). (β) Turkenburg-van Diepen MGW: "Crystallographic studies of modified insulin: Chapter 6, Metal binding in insulin", (PhD Thesis, York University). (γ) PetDiabetes.org: "Aminoacids sequence of insulin

- Diabetes. 2016 Dec 2. pii: db160779. [Epub ahead of print] Metabolite Profiling of LADA Challenges the View of a Metabolically Distinct Subtype. Al-Majdoub M, Ali A, Storm P, Rosengren A, Groop L, Spégel P.
- Diabetologia. 1989 Aug;32(8):625. The first recorded case of diabetic pregnancy (Bennewitz HG, 1824, University of Berlin) Hadden DR, Hillebrand B. PMID: 2673895
- Diabetes Mellitus (1995-2004). The Merck Manual of Medical Information-Second Home Edition [On-line information]. Available FTP: <http://www.merck.com/mmhe/sec13/ch165/ch165a.html?qt=Diabetes&alt=sh>
- Diabetes Care 2004 May; 27(5): 1047-1053. Sarah Wild, MB BCHIR, PHD1,Gojka Roglic, MD2,Anders Green, MD, PHD, DR MED SCI3, Richard Sicree, MBBS, MPH4 and Hilary King, MD, DSC2
- DIABETES CARE, VOLUME 28, NUMBER 9, SEPTEMBER 2005 The Burden of Mortality Attributable to Diabetes ,GOJKA ROGLIC, MD/ NIGEL UNWIN, DM, MFPH /PETER H. BENNETT, MB, FRCP/ COLIN MATHERS, BSC, PHD / JAAKKO TUOMILEHTO, MD, PHD /SATYAJIT NAG, MRCP /VINCENT CONNOLLY, MD, FRCP /HILARY KING, MD, DSC
- Diabetes Care Publish Ahead of Print, published online June 16, 2014, Jane L. Chiang,<sup>1</sup> M. Sue Kirkman,<sup>2</sup> Lori M.B. Laffel,<sup>3</sup> and Anne L. Peters,<sup>4</sup> on behalf of the Type 1 Diabetes Sourcebook Authors\* DOI: 10.2337/dc14-1140
- EndocrineWeb.com: "The important roles of insulin and glucagon: Diabetes and Hypoglycemia".
- Effects of Glucagon-Like Peptide 1 on Counterregulatory Hormone Responses, Cognitive Functions, and Insulin Secretion during Hyperinsulinemic, Stepped Hypoglycemic Clamp Experiments in Healthy Volunteers Michael A. Nauck, Markus M. Heimesaat, Kai Behle, Jens J. Holst, Markus S. Nauck, Robert Ritzel, Michael Hüfner, and Wolff H. Schmiegel
- EMBO J. 1987 Feb; 6(2): 539–546. Catalysis in the crystal: synchrotron radiation studies with glycogen phosphorylase b. J Hajdu, K R Acharya, D I Stuart, P J McLaughlin, D Barford, N G Oikonomakos, H Klein, and L N Johnson
- FASEB J. 1992 Mar;6(6):2274-82. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. Johnson LN
- Fonseca V.A. (2003). Management of diabetes mellitus and insulin resistance in patients with cardiovascular disease. Am J Cardiol. Vol 92: (Suppl. 50J-60J).

- Gale, E.A.M.. Thomas Willis [internet]. 2014 Aug 13; Diapedia 1104693411 rev. no. 18.
- Gonzalez-Franquesa A., 2012. Alba Gonzalez-Franquesa, Valeria De Nigris, Carles Lerin and Pablo M. Garcia-Roves Skeletal Muscle Mitochondrial Function/Dysfunction and Type 2 Diabetes
- Iminosugars as Potential Inhibitors of Glycogenolysis: Structural Insights into the Molecular Basis of Glycogen Phosphorylase Inhibition Nikos G. Oikonomakos ,\*†‡ Costas Tiraidis ,† Demetres D. Leonidas ,† Spyros E. Zographos ,† Marit Kristiansen,§ Claus U. Jessen ,§ Leif Nørskov-Lauritsen ,§ and Lorraine Agius II Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry and Institute of Biological Research and Biotechnology, The National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Avenue, Athens 11635, Greece, Novo Nordisk A/S, Novo Nordisk Park, DK-2760, Måløv, Denmark, and School of Clinical Medical Sciences, Division of Diabetes, The Medical School, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, United Kingdom J. Med. Chem., 2006, 49 (19), pp 5687–5701
- 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.
- Kolatkar N (YoutTotalHealth.com): "Insulin Administration: Types and differences".
- Kantsadi AL, Parmenopoulou V, Bakalov DN, Snelgrove L, Stravodimos GA, Chatzileontiadou DS, Manta S, Panagiotopoulou A, Hayes JM, Komiotis D<sup>1</sup>, Leonidas DD.2014 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.
- K R Acharya,D I Stuart,K M Varvill,L N Johnson 1989 , Glycogen Phosphorylase B: Description of the Protein Structure
- Medical– Surgical Nursing Critical Thinking in Patient Care , 5<sup>th</sup> EDITION , Prscilla Lemone/ Karen Burke/ Gerene Bauldoff pg 620-659
- Monod J., Changeux J-P., and Jacob F., Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, J. Mol. Biol. (1963), (6, 306-329)
- Michael Dansinger WebMD Medical Reference Reviewed on April 20, 2015
- Nat Rev Endocrinol. 2010 Dec; 6(12): 689–697.: 10.1038/nrendo.2010.187, Kirk M. Habegger, Kristy M. Heppner, Nori Geary, Timothy J. Bartness, Richard DiMarchi, and Matthias H. Tschöp

- 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., 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: 34566-34573.
- 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., 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. (2002). Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* Vol 3: 561–586.
- Oikonomakos N.G., Somsak L., Opin C. (2008). *Invest. Drugs.* Vol 9: 379.
- onmed.gr Διαβήτης τύπου 1,2013
- Pugliese A., The multiple origins of Type 1 diabetes, *Diabetic Medicine* (2012), DOI:10.1111/dme.12081 (135-146)
- 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.
- 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.
- Stryer L. *Biochemistry.* In W. H. Freeman and Company 1997 New York:W. H. Freeman and Company
- Saudi Med J 2002; Vol. 23 (4): 373-378 History of diabetes mellitus.
- Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs Volume 5 of the series Pharmaceutical Biotechnology pp 315-350 Insulin Structure and Stability Jens Brange , Lotte Langkjær
- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1901 Emil von Behring
- The 8 Most Common Type 2 Diabetes Symptoms, Diabetes Diet Cures
- by Corporate Communications Dept. , Type 2 Diabetes
- The Interaction of Liver Phosphorylase a with Glucose and AMP Author Willy STALMANS, Monique LALOUX, Henri-Géry HERS First published: November 1974
- Vander et al's Human Physiology: The Mechanisms of Body Functions, 9th edition



- Witters L. A., Avruch J. (1978). Insulin regulation of hepatic glycogen synthase and phosphorylase. *Biochemistry*. Vol 17: 406–410.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά το χρονικό διάστημα Μάιου 2016 - Δεκεμβρίου 2016, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Δημήτριου Λεωνίδα. Χωρίς την υποστήριξη και την παρουσία κάποιων ανθρώπων δεν θα ήταν δυνατή η υλοποίηση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής.

Καταρχήν, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο, καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου. Υπήρξε πολύτιμη η επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας. Ειδικότερα, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Στραβοδήμο Γεώργιο, 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 και σε πολλά άλλα .

Επίσης , θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου, για τη διαρκή πίστη τους στις δυνατότητές μου αλλά και για την οικονομική και ηθική στήριξη που μου παρείχαν στη ζωή μου. Τα πεθερικά μου που επίσης με στήριζαν ηθικά και οικονομικά. Καθώς επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την αρραβωνιαστικιά μου Χρυστάλλα Χατζηπιερη που ήταν δίπλα μου κάθε στιγμή σε όλη την διάρκεια του προγράμματος που με στήριζε και που με ενθάρρυνε. Και όλους τους φίλους που ήταν δίπλα μου.

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