

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΑΝΑΤΟΛΙΩΤΑΚΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2025

**« Μελέτη επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση
του γλυκογόνου σε κύτταρα HepG2 »**

**« Study of the expression levels of proteins involved in glycogen degradation
in HepG2 cells »**

Εργαστήριο: Η διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (TBB), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Σκαμνάκη Βασιλική

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Σκαμνάκη Βασιλική: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Κοντού Μαρία: Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Ψαρρά Άννα-Μαρία: Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Ευχαριστίες

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας και Μεταβολισμού του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Βασιλική Σκαμνάκη, για την ευκαιρία να συμμετάσχω στην έρευνα της παρούσας εργασίας και για την πολύτιμη καθοδήγησή της. Θερμές ευχαριστίες απευθύνω επίσης στα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Επίκουρη Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας Μαρία Κοντού και την Καθηγήτρια Βιοχημείας Άννα-Μαρία Ψαρρά. Επιπλέον, εκφράζω τις ευχαριστίες μου προς τη Δρ. Μαρτίνα Σαμιωτάκη (BSRC "Alexander Fleming") για την επιστημονική καθοδήγηση, την πραγματοποίηση των πειραμάτων πρωτεωμικής και την καθοριστική της συμβολή. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τον Καθηγητή Δημήτρη Λεωνίδα, Διευθυντή του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, για την υποστήριξη και τη φιλοξενία στο εργαστήριο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Σεραφείμ Αλεξόπουλο για την αδιάκοπη βοήθεια, τις εύστοχες συμβουλές και τη στήριξη σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου. Ευχαριστώ, ακόμη, τη διδάκτορα Κατερίνα Δισέρη για τις συμβουλές της και την ευχάριστη παρέα εντός και εκτός εργαστηρίου. Ευγνώμων είμαι και προς όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το άριστο κλίμα και τη συνεργασία μας, ιδίως τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σταυρούλα Σουϊλεμέζη και τη φοιτήτρια Ευανθία Μπακή, που περάσαμε περισσότερο χρόνο μαζί στο εργαστηριακό χώρο.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στους φίλους μου για τη διαρκή συμπαράσταση και δύναμη που μου προσέφεραν, ώστε να ολοκληρώσω τη διπλωματική μου εργασία και να πετύχω τους στόχους μου.

Περίληψη

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου πραγματοποιείται μέσω δύο οδών. Η πρώτη είναι η καλά μελετημένη κυτταροπλασματική αποικοδόμηση, δηλαδή η γλυκογονόλυση, με κύρια ένζυμο τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και το ένζυμο αποδιακλάδωσης. Η δεύτερη είναι η γλυκοφαγία, υποκατηγορία της αυτοφαγίας. Κεντρικό ρόλο σε αυτήν διαδραματίζει η Starch-Binding Domain-Containing Protein 1 (STBD1), η οποία συνεργάζεται με την GABA Type A Receptor–Associated Protein-Like 1 (GABARAPL1) για τη μεταφορά του γλυκογόνου στα λυσοσώματα, όπου αποικοδομείται από την Acid α -Glucosidase (GAA). Η γλυκαγόνη σε υπογλυκαιμία ενεργοποιεί σηματοδοτικά τη γλυκογονόλυση, ενώ η ινσουλίνη σε υπεργλυκαιμία επάγει τη σύνθεση γλυκογόνου. Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης και ρύθμισης της γλυκοφαγίας δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε πώς μεταβάλλονται τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών των δύο οδών αποικοδόμησης του γλυκογόνου ανάλογα με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου (συνθήκες νηστείας/σίτισης ή fasting/fed state) και πώς επηρεάζονται από ορμονικά σήματα της γλυκαγόνης. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε καφεΐνη ως γνωστός αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, προκειμένου να διερευνηθεί αν η αναστολή της γλυκογονόλυσης μεταβάλλει τα επίπεδα της STBD1. Δοκιμάστηκε, επίσης το 7-O-Methylmangiferin ως αναστολέας της κυτταροπλασματικής γλυκογονόλυσης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στην ανθρώπινη ηπατική κυτταρική σειρά HepG2 με συνδυασμό βιοχημικών τεχνικών: Western Blot, ex vivo κινητικές μελέτες και φασματομετρία μάζας για ανάλυση πρωτεϊνικού προφίλ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 7-O-methylmangiferin μπορεί να αναστείλει τη γλυκογονόλυση χωρίς να εμφανίζει συνεργιστική δράση με την καφεΐνη. Επιπλέον, καταγράφηκαν μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα παρουσία γλυκαγόνης σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη γλυκογένεση, στη γλυκογονική αποικοδόμηση και στη γλυκόλυση. Παρατηρήθηκε ότι προσθήκη γλυκαγόνης για επώαση 6 ωρών δεν συνοδεύεται από σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των πρωτεϊνών της γλυκογονόλυσης ενώ φαίνεται ότι μειώνονται τα επίπεδα των πρωτεϊνών της γλυκογονικής σύνθεσης, της γλυκόλυσης και της γλυκοφαγίας. Η ανεύρεση αποτελεσματικών αναστολέων της γλυκογονόλυσης και η κατανόηση του μηχανισμού ελέγχου των δύο οδών μπορούν να αποτελέσουν βάση για θεραπευτικές προσεγγίσεις σε νόσους αποθήκευσης γλυκογόνου (γλυκογονιάσεις), καθώς και στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

Λέξεις κλειδιά: γλυκογόνο, γλυκαγόνη, γλυκόλυση, γλυκοφαγία, φωσφορυλάση του γλυκογόνου, STBD1, καφεΐνη, 7OMF, HepG2

Abstract

Glycogen degradation occurs via two pathways: the well-characterized cytoplasmic glycogenolysis, whose key enzymes are glycogen phosphorylase and the debranching enzyme, and glycophagy, a subtype of autophagy. In this pathway, Starch-Binding Domain-Containing Protein 1 (STBD1) cooperates with GABA Type A Receptor–Associated Protein-Like 1 (GABARAPL1) to transport glycogen to lysosomes for degradation by Acid α -Glucosidase (GAA). Under hypoglycemia, glucagon activates glycogenolysis, whereas insulin induces glycogen synthesis. The mechanisms that orchestrate glycophagy activation and regulation remain unclear. In this study, we examined how the protein expression levels in both glycogen degradation pathways change with the cell's energetic state (fasting/fed) and how they are influenced by glucagon signaling. We also used caffeine, a known inhibitor of glycogen phosphorylase, to investigate whether inhibiting glycogenolysis affects STBD1 levels, and tested 7-O-methylmangiferin as an inhibitor of cytoplasmic glycogenolysis. For experimental purposes, the human hepatic cell line HepG2 is used as well as a combination of biochemical techniques such as Western blotting, ex vivo kinetic assays and mass spectrometry for proteomic profiling. We found that 7-O-methylmangiferin can inhibit glycogenolysis but does not synergize with caffeine. Moreover, the exposure of cells to glucagon was associated with changes in proteins levels involved in glycogenesis, glycogen degradation and glycolysis. We found that a 6-hour incubation of glucagon did not produce significant changes in glycogenolysis proteins, whereas the levels of the proteins involved in glycogen synthesis, glycolysis and glycophagy appeared decreased. Identifying effective glycogenolysis inhibitors and understanding how control of this pathway is achieved, could support therapeutic strategies for glycogen storage diseases and type 2 diabetes mellitus.

Keywords: glycogen, glucagon, glycolysis, glycophagy, glycogen phosphorylase, STBD1, caffeine, 7-O-methylmangiferin (7-OMF), HepG2

Συντομογραφίες

GSDs: Glycogen Storage Diseases	Akt or PKB: Protein Kinase B
GS: Glycogen Synthase	mTORC1: Mammalian Target of Rapamycin Complex 1
GBE: Glycogen Branching Enzyme	PP2A: Protein Phosphatase 2A
PP1: Protein Phosphatase 1	AGL: Amylo-1,6-glucosidase, 4- α -glucotransferase, gene
cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate	PYGL: Glycogen Phosphorylase, Liver form, gene
PKA: Protein Kinase A	EGCG: Epigallocatechin-3-gallate
ATP: Adenosine Triphosphate	EGC: Epigallocatechin
AMP: Adenosine Monophosphate	7OMF: 7-O-methylmangiferin
PLP: Pyridoxal 5'-Phosphate	HepG2: Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line
GP: Glycogen Phosphorylase	MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
GDE: Glycogen Debranching Enzyme	DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
G6PHASE: Glucose 6-Phosphatase	BSA: Bovine Serum Albumin
GLUT1: Glucose Transporter Type 1	FBS: Fetal Bovine Serum
GLUT2: Glucose Transporter Type 2	DMSO: Dimethyl Sulfoxide
GLUT3: Glucose Transporter Type 3	G1P: Glucose-1-Phosphate
PHK: Phosphorylase Kinase	GAA: Acid Alpha-Glucosidase
STBD1: STarch Binding Domain Containing Protein 1	PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase
CBM20: Carbohydrate-Binding Module 20	LC3: Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3
AIM: Atg8 family interacting motif	
GABARAPL1: Gaba Type A Receptor Associated Protein Like 1	

Πίνακας περιεχομένων

1) Εισαγωγή.....	11
1.1) Γλυκογόνο : Ρόλος και φυσιολογική σημασία στον οργανισμό	11
1.1.1) Δομή του γλυκογόνου.....	11
1.2) Σύνθεση του γλυκογόνου	12
1.3) Αποικοδόμηση του γλυκογόνου	13
1.3.1) Κυτταροπλασματική αποικοδόμηση γλυκογόνου: Ο ρόλος της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και του ενζύμου αποδιακλάδωσης γλυκογόνου	14
1.3.2) Κυτταροπλασματική αποικοδόμηση γλυκογόνου: Επισκόπηση της φωσφογλυκομουτάσης και της 6-φωσφατάσης της γλυκόζης	15
1.3.3) Ορμονική ρύθμιση της κυτταροπλασματικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου : Ρόλος της γλυκαγόνης	16
1.3.4) Ορμονική ρύθμιση της κυτταροπλασματικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου : Ρόλος της ινσουλίνης	16
1.4) Γλυκοφαγία: εξειδικευμένη μορφή αυτοφαγίας.....	17
1.4.1) Αποικοδόμηση του γλυκογόνου μέσω αυτοφαγίας και σημαντικά ένζυμα	18
1.4.2) Ορμονική ρύθμιση της γλυκοφαγίας	18
1.5) Ασθένειες αποθήκευσης γλυκογόνου	19
1.5.1) Νόσος Cori/Forbes (GSD τύπου III)	20
1.5.2) Νόσος Hers (GSD τύπου VI).....	21
1.5.3) Νόσος Pompe (GSD τύπου II)	21
1.5.4) Σακχαρώδης διαβήτης	22
1.6) Αναστολείς.....	22
1.6.1) Αναστολή της γλυκογονόλυσης μέσω της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	22
1.6.2) Η επίδραση της mangiferin στη γλυκογονόλυση και τη γλυκοφαγία	24
1.6.3) Αναστολή της γλυκοφαγίας.....	24
2) Σκοπός	25
3) Υλικά και Μέθοδοι	26
3.1) Οργανολογία	26
3.2) Αναλώσιμα.....	26
3.3) Διαλύματα	27
3.4) Υλικά	28
3.5) Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα για Western Blot	29
3.6) Κυτταρική σειρά HepG2.....	29
3.7) Διαχείριση κυτταροκαλλιιεργειών	30
3.7.1) Απόψυξη κυττάρων	30
3.7.2) Ψύξη κυττάρων	30
3.7.3) Θρυψινοποίηση	30
3.7.4) Μέτρηση κυττάρων	31
3.7.5) Συγκομιδή κυττάρων (Cell harvesting)	31
3.7.6) Λύση κυττάρων	31
3.8) Κυτταρικές μελέτες	32
3.8.1) Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT.....	32

3.9) Αναλυτικές τεχνικές.....	33
3.9.1) Χρωματομετρικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	33
3.9.2) Προετοιμασία δειγμάτων για SDS-PAGE, για κινητική μελέτη με αναστολείς και για το Glucose-Glo Assay.....	33
3.9.3) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	34
3.9.4) Ανοσοαπότυπωση πρωτεϊνών (Western Blot).....	35
3.9.4.1) Αποκλεισμός μη ειδικής πρόσδεσης (Blocking)	35
3.9.4.2) Ανίχνευση πρωτεϊνών με αντισώματα	35
3.9.4.3) Απεικόνιση σήματος	36
3.9.4.4) Επεξεργασία αποτελεσμάτων	36
3.9.5) Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε εκχυλίσματα HepG2....	36
3.9.5.1) Στατιστική και υπολογιστική επεξεργασία κινητικών μετρήσεων	37
3.9.6) Ποσοτικός προσδιορισμός γλυκόζης με το kit Glucose-Glo™ Assay (Promega) 37	
3.9.6.1) Δημιουργία καμπύλης αναφοράς γλυκόζης	38
3.9.6.2) Προετοιμασία δειγμάτων για το Glucose-Glo™ Assay	39
3.10) Πρωτεωμική ανάλυση με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/MS).....	39
3.10.1) Προετοιμασία δειγμάτων για LC-MS/MS	40
3.10.2) Ανάλυση και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	40
4) Αποτελέσματα	41
4.1) Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT	41
4.2) Αναστολή της γλυκογονόλυσης από την καφεΐνη και την 7OMF σε κύτταρα HepG2..	42
4.3) Διερεύνηση της επίδρασης της καφεΐνης και της 7OMF στα πρωτεϊνικά επίπεδα των PYGL, STBD1 και AGL σε κύτταρα HepG2 με Western Blot.....	44
4.4) Πρωτεωμική ανάλυση με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/MS)	47
5) Συζήτηση - Συμπεράσματα	52
6) Βιβλιογραφία.....	55

Πίνακας περιεχομένων εικόνων

Εικόνα 1.....	12
Εικόνα 2.....	13
Εικόνα 3.....	14
Εικόνα 4.....	15
Εικόνα 5.....	15
Εικόνα 6.....	16
Εικόνα 7.....	17
Εικόνα 8.....	18
Εικόνα 9.....	19
Εικόνα 10.....	20
Εικόνα 11.....	21
Εικόνα 12.....	23
Εικόνα 13.....	24
Εικόνα 14.....	24

Εικόνα 15.....	25
Εικόνα 16.....	29
Εικόνα 17.....	32
Εικόνα 18.....	36
Εικόνα 19.....	38
Εικόνα 20.....	44
Εικόνα 21.....	49
Εικόνα 22.....	51

Πίνακας περιεχομένων πινάκων

Πίνακας 1.....	26
Πίνακας 2.....	27
Πίνακας 3.....	27
Πίνακας 4.....	28
Πίνακας 5.....	29
Πίνακας 6.....	32
Πίνακας 7.....	34
Πίνακας 8.....	34
Πίνακας 9.....	37
Πίνακας 10.....	38
Πίνακας 11.....	48

Πίνακας περιεχομένων σχημάτων

Σχήμα 1.....	39
Σχήμα 2.....	41
Σχήμα 3.....	41
Σχήμα 4.....	42
Σχήμα 5.....	43
Σχήμα 6.....	45
Σχήμα 7.....	45
Σχήμα 8.....	46
Σχήμα 9.....	47
Σχήμα 10.....	54

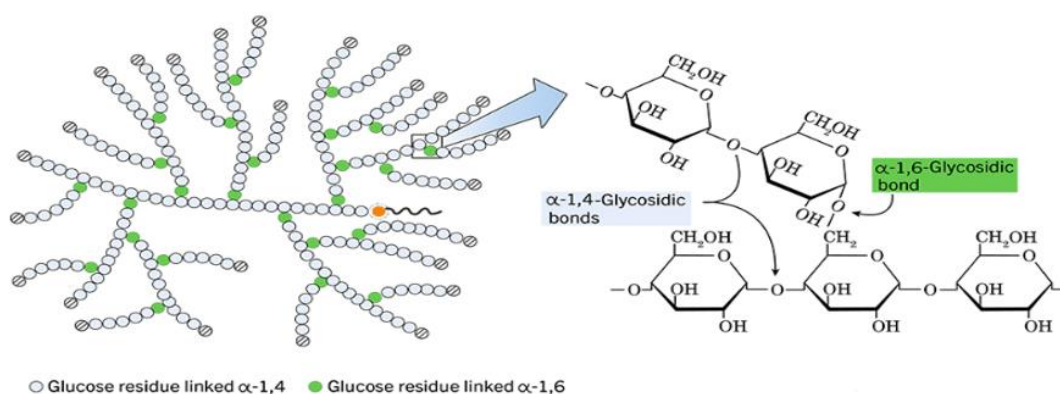
1) Εισαγωγή

1.1) Γλυκογόνο : Ρόλος και φυσιολογική σημασία στον οργανισμό

Το γλυκογόνο είναι ένας πολυσακχαρίτης με εκτεταμένες διακλαδώσεις που λειτουργεί ως η κύρια αποθήκη γλυκόζης στον ανθρώπινο οργανισμό και σε άλλους ζωικούς οργανισμούς. Απαντάται κυρίως στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες, ενώ μικρότερες ποσότητες υπάρχουν και σε άλλα όργανα, όπως στον εγκέφαλο και στους νεφρούς. Ο ρόλος του είναι καθοριστικός για τη ρύθμιση της γλυκόζης στο αίμα και την παροχή ενέργειας σε περιόδους νηστείας ή αυξημένων ενεργειακών αναγκών, όπως η σωματική άσκηση. Όταν τα επίπεδα γλυκόζης είναι υψηλά, το γλυκογόνο συντίθεται και αποθηκεύεται στους μυϊκούς ιστούς και στο ήπαρ. Αντίθετα, όταν υπάρχει έλλειψη ενέργειας, διασπάται ώστε να απελευθερωθεί γλυκόζη (Patino S.et al.,2024). Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται κυρίως από τις ορμόνες ινσουλίνη, γλυκαγόνη και επινεφρίνη, οι οποίες ενεργοποιούν τα κατάλληλα ένζυμα ανάλογα με τη μεταβολική κατάσταση του οργανισμού (Daghlis S.et al.,2025). Αξίζει να σημειωθεί πως, δυσλειτουργίες στη σύνθεση ή την αποικοδόμηση του γλυκογόνου σχετίζονται με διάφορες κληρονομικές ή μεταβολικές ασθένειες, γνωστές ως γλυκογονιάσεις (Glycogen Storage Diseases – GSDs), οι οποίες επηρεάζουν ζωτικά όργανα όπως το ήπαρ, τους μύες και το νευρικό σύστημα (Ellingwood S.et al.,2018).

1.1.1) Δομή του γλυκογόνου

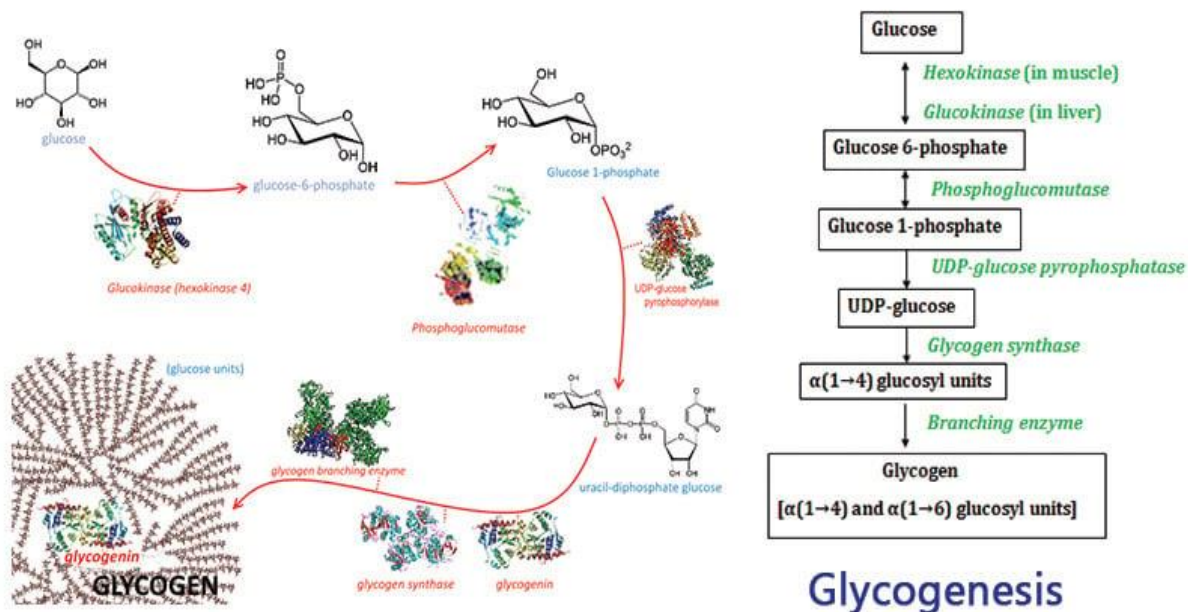
Η δομή του γλυκογόνου είναι εξαιρετικά οργανωμένη και επιτρέπει την αποδοτική αποθήκευση και τη γρήγορη απελευθέρωση γλυκόζης. Αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες γλυκόζης που ενώνονται με γλυκοζιτικούς δεσμούς τύπου $\alpha(1\rightarrow4)$, ενώ τα σημεία διακλάδωσης σχηματίζονται μέσω δεσμών τύπου $\alpha(1\rightarrow6)$ κάθε 8-12 υπολείμματα γλυκόζης (Patino S.et al.,2024). Η διακλαδισμένη αυτή διάταξη αυξάνει τον αριθμό των μη αναγωγικών άκρων, επιτρέποντας την ταυτόχρονη δράση πολλών ενζύμων πάνω στο ίδιο μόριο και διευκολύνοντας έτσι την ταχύτατη κινητοποίηση ενέργειας. Το γλυκογόνο σχηματίζει σωματίδια β με διάμετρο 20-40 nm, τα οποία σε ορισμένους ιστούς, όπως το ήπαρ, συνενώνονται σε μεγαλύτερα σωματίδια α με διάμετρο έως 300 nm (Liu X.et al.,2024). Η εσωτερική του πυκνότητα είναι μεγαλύτερη κοντά στο κέντρο και μειώνεται προς την περιφέρεια, γεγονός που αυξάνει τη σταθερότητα και τη λειτουργικότητά του ως ενεργειακή δεξαμενή. Επιπλέον, η οργάνωση αυτή επιτρέπει την αποτελεσματική πρόσδεση πρωτεϊνών-ρυθμιστών, όπως της γλυκογενίνης στον πυρήνα, η οποία δρα ως εκκινητής για τη σύνθεση του μορίου (Neoh G.et al.,2024).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της δομής του γλυκογόνου, όπου παρουσιάζονται οι γραμμικές αλυσίδες μέσω α-1,4 δεσμών με λευκό χρώμα και οι διακλαδώσεις μέσω δεσμών α-1,6 με πράσινο χρώμα. Δεξιά φαίνεται η χημική αναπαράσταση των δεσμών (Ezzel O.et al.,2024).

1.2) Σύνθεση του γλυκογόνου

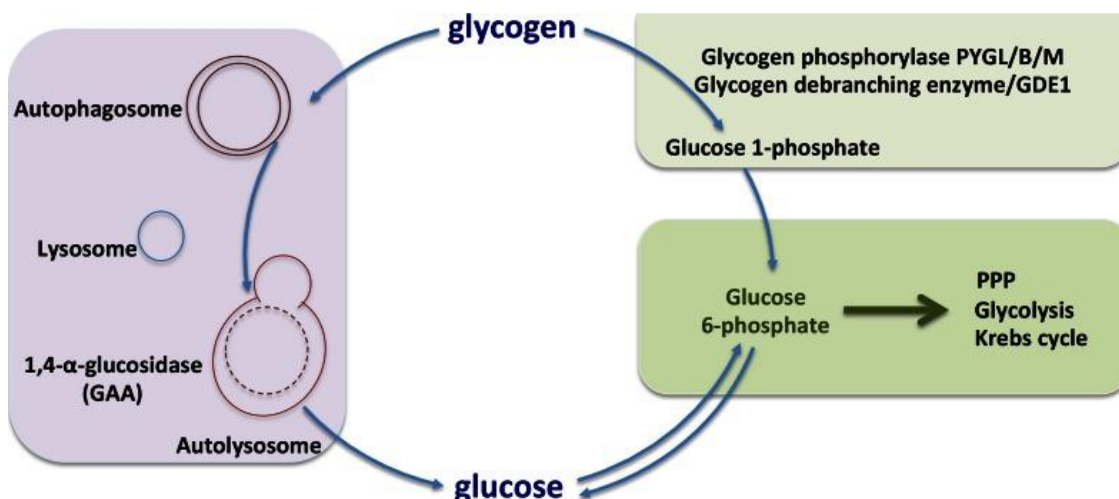
Η σύνθεση του γλυκογόνου, γνωστή ως γλυκογένεση, είναι μια καλά συντονισμένη διαδικασία που περιλαμβάνει τη συμμετοχή πολλών ενζύμων σε διαδοχικά στάδια. Η διαδικασία ξεκινά με τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης από την εξοκινάση ή τη γλυκοκινάση (στο ήπαρ), προς σχηματισμό 6-φωσφορικής γλυκόζης. Ακολουθεί η δράση της φωσφογλυκομουτάσης, η οποία μετατρέπει την 6-φωσφορική γλυκόζη σε 1-φωσφορική γλυκόζη. Η τελευταία ενεργοποιείται με τη μορφή UDP-γλυκόζης μέσω της πυροφωσφορυλάσης της UDP-γλυκόζης, με την υδρόλυση του πυροφωσφορικού να καθιστά τη διαδικασία μη αναστρέψιμη (Adeva-Andany M.et al.,2016). Η σύνθεση απαιτεί έναν εκκινητή, την πρωτεΐνη γλυκογενίνη, η οποία αυτογλυκοζυλιώνεται σχηματίζοντας έναν μικρό αρχικό ολιγοσακχαρίτη 8-10 υπολειμμάτων γλυκόζης. Επάνω σε αυτόν προστίθενται μόρια γλυκόζης από την UDP-γλυκόζη μέσω της συνθάσης του γλυκογόνου (GS), δημιουργώντας γραμμικές αλυσίδες με δεσμούς α(1→4). Η δομή αποκτά διακλαδισμένη μορφή με τη δράση του ενζύμου διακλάδωσης του γλυκογόνου (GBE), το οποίο μεταφέρει τμήματα 6–8 υπολειμμάτων και τα ενσωματώνει με δεσμούς α(1→6), αυξάνοντας τον αριθμό των μη αναγωγικών άκρων και επιταχύνοντας την ικανότητα σύνθεσης και διάσπασης (Ellingwood S.et al.,2018). Η γλυκογένεση ρυθμίζεται με ακρίβεια από ορμονικά σήματα: η ινσουλίνη ενεργοποιεί τη GS μέσω της πρωτεϊνικής φωσφατάσης-1 (PP1), προάγοντας την αποθήκευση γλυκόζης, ενώ η γλυκαγόνη και η επινεφρίνη, μέσω της οδού cAMP/PKA, φωσφορυλιώνουν και αναστέλλουν τη δράση της GS. Οι ρυθμιστικοί αυτοί μηχανισμοί εντάσσουν τη γλυκογένεση στην ευρύτερη προσπάθεια του οργανισμού για τη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης, επιτρέποντας την προσαρμογή της ανάλογα με τις ενεργειακές απαιτήσεις και τη θρεπτική κατάσταση (Zois C.et al.,2016).



Εικόνα 2. Οδός βιοσύνθεσης γλυκογόνου. Η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη, από την εξοκινάση, μετατρέπεται από την φωσφογλυκομουτάση σε 1-φωσφορική γλυκόζη, ενεργοποιείται σε UDP-γλυκόζη από την πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης, ενσωματώνεται από την συνθάση του γλυκογόνου σε α(1→4) δεσμό στον εκκινήτη γλυκογενίνη και τέλος το ένζυμο αποδιακλάδωσης εισάγει α(1→6) δεσμούς (Dewangan, et al., 2025).

1.3) Αποικοδόμηση του γλυκογόνου

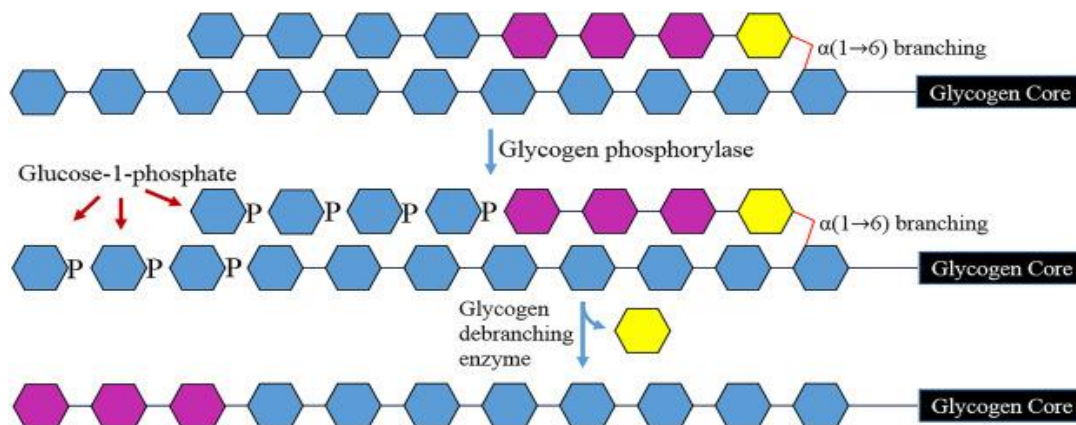
Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου αποτελεί μια θεμελιώδη μεταβολική διαδικασία που διασφαλίζει την παροχή γλυκόζης στους ιστούς όταν οι άμεσες πηγές ενέργειας είναι περιορισμένες. Η διαδικασία πραγματοποιείται μέσω δύο κύριων οδών: της κυτταροπλασματικής και της λυσοσωμικής, η οποία ονομάζεται γλυκοφαγία. Στην κυτταροπλασματική οδό, το γλυκογόνο υφίσταται ενζυματική διάσπαση για την παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη και τροφοδοτεί βασικές μεταβολικές οδούς όπως η γλυκόλυση και η γλυκονεογένεση (Adeva-Andany M. et al., 2016). Στη λυσοσωμική οδό, η διάσπαση επιτελείται από εξειδικευμένα ένζυμα, συμβάλλοντας κυρίως στην ανακύκλωση του γλυκογόνου που βρίσκεται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια. Ο συντονισμός των δύο μηχανισμών εξασφαλίζει την ισορροπία μεταξύ αποθήκευσης και απελευθέρωσης ενέργειας ανάλογα με τις ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού (James S. et al., 2024).



Εικόνα 3. Οδοί αποικοδόμησης γλυκογόνου. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου πραγματοποιείται είτε κυτταροπλασματικά μέσω της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και του ενζύμου αποδιακλάδωσης είτε λυσοσωμικά μέσω της όξινης α-γλυκοσιδάσης GAA (Zois S,et al.,2016).

1.3.1) Κυτταροπλασματική αποικοδόμηση γλυκογόνου: Ο ρόλος της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και του ενζύμου αποδιακλάδωσης γλυκογόνου

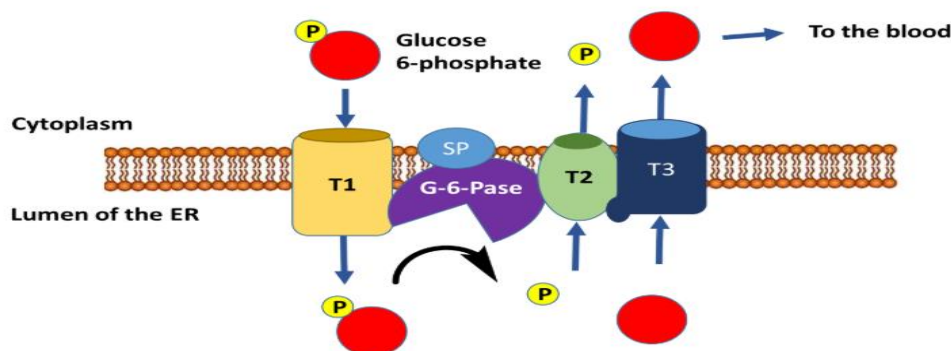
Η κυτταροπλασματική αποικοδόμηση του γλυκογόνου ξεκινά με τη δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP). Η GP υπάρχει σε τρεις ισομορφές, οι οποίες είναι η ισομορφή PYGL στο ήπαρ, η PYGM στους μύες και η PYGB στον εγκέφαλο (Zois C.et al.,2016). Πιο συγκεκριμένα, καταλύει τη διάσπαση των δεσμών α(1→4) στα μη αναγωγικά άκρα των πολυσακχαρικών αλυσίδων (Adeva-Andany M.et al.,2016). Κατά τη διαδικασία, η ανώτερη ενεργειακά φωσφορική ομάδα αντικαθιστά το γλυκοζιτικό οξυγόνο, απελευθερώνοντας 1-φωσφορική γλυκόζη χωρίς κατανάλωση ATP. Η GP απαιτεί την παρουσία της 5'-φωσφορική-πυριδοξάλης (PLP) ως συνένζυμο, το οποίο λειτουργεί ως δέκτης και δότης πρωτονίων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Μάλιστα, το ένζυμο εμφανίζεται σε δύο μορφές, την ενεργή φωσφορυλιωμένη μορφή (φωσφορυλάση α) και την ανενεργή αποφωσφορυλιωμένη μορφή (φωσφορυλάση β). Η δραστηριότητά του ρυθμίζεται τόσο μέσω φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης όσο και αλλοστερικά από μόρια όπως το AMP, το ATP και την 6-φωσφορική γλυκόζη (Zois C.et al.,2016). Αξίζει να σημειωθεί πως, η ενζυμική δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου είναι περιορισμένη όταν πλησιάζει ένα σημείο διακλάδωσης, σταματώντας τέσσερα υπολείμματα πριν από τον δεσμό α(1→6) (Neoh G.et al.,2024). Σε αυτό το σημείο, αναλαμβάνει δράση το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου (GDE), το οποίο διαθέτει δύο καταλυτικές λειτουργίες: μεταφορά τριών υπολειμμάτων γλυκόζης σε άλλη αλυσίδα μέσω της δραστηριότητας της 4-α-γλυκοτρανσφεράσης, δημιουργώντας χώρο για περαιτέρω δράση της φωσφορυλάσης και υδρόλυση του τελικού υπολείμματος γλυκόζης στο σημείο διακλάδωσης μέσω της α(1→6)-γλυκοσιδάσης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελεύθερης γλυκόζης. Το GDE λειτουργεί με υψηλή εξειδίκευση για τους δεσμούς α(1→6) και εξασφαλίζει την πλήρη διάσπαση του γλυκογόνου σε μονοσακχαρίτες που μπορούν να εισέλθουν άμεσα στις επόμενες μεταβολικές οδούς (Patino S.et al.,2024). Η παραπάνω διαδικασία παρουσιάζεται στην Εικόνα 4 που ακολουθεί.



Εικόνα 4. Διάσπαση του γλυκογόνου από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και το ένζυμο αποδιακλάδωσης (Habtemariam S.et al.,2019)

1.3.2) Κυτταροπλασματική αποικοδόμηση γλυκογόνου: Επισκόπηση της φωσφογλυκομουτάσης και της 6-φωσφατάσης της γλυκόζης

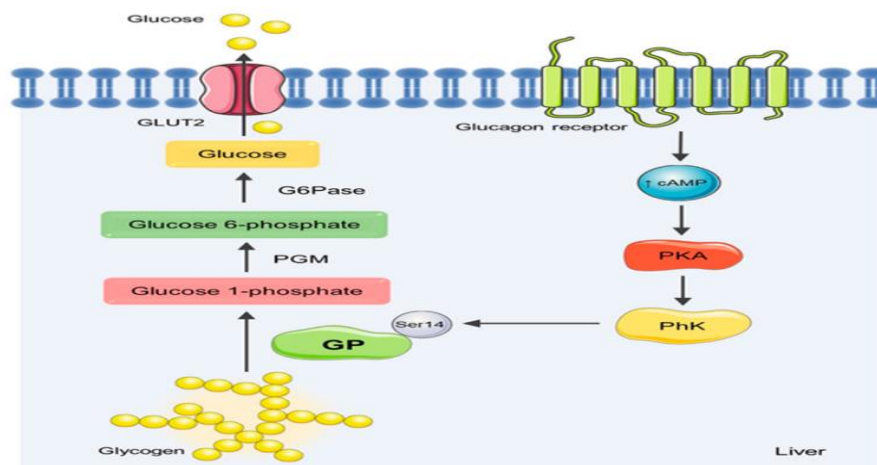
Η 1-φωσφορική γλυκόζη που παράγεται κατά την αποικοδόμηση του γλυκογόνου μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη μέσω της φωσφογλυκομουτάσης (Neoh G.et al.,2024). Στο ήπαρ, η 6-φωσφορική γλυκόζη μπορεί να εισέλθει στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου μέσω του μεταφορέα T1 (GLUT1), όπου η 6-φωσφατάση της γλυκόζης (G-6-Pase) την αποφωσφορυλιώνει σε ελεύθερη γλυκόζη. Η γλυκόζη μεταφέρεται στη συνέχεια πίσω στο κυτταρόπλασμα μέσω του μεταφορέα T2 (GLUT2) και εξέρχεται στην κυκλοφορία μέσω του μεταφορέα T3 (GLUT3), συμβάλλοντας στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Μπορεί κανείς να δει σχηματικά την μεταφορά της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος στην Εικόνα 5 που ακολουθεί (Libretexts,2025). Στους σκελετικούς μύες, η 6-φωσφορική γλυκόζη δεν υφίσταται αποφωσφορυλίωση, αλλά κατευθύνεται κυρίως προς γλυκόλυση για την παραγωγή ATP, υποστηρίζοντας άμεσα τη μυϊκή σύσπαση (Adeva-Andany M.et al.,2016). Ο ακριβής συντονισμός των ενζύμων και των μεταφορέων αυτών εξασφαλίζει την αποτελεσματική κινητοποίηση και αξιοποίηση των αποθεμάτων γλυκογόνου.



Εικόνα 5. Μεταφορά και υδρόλυση της 6-φωσφορικής γλυκόζης στο ενδοπλασματικό δίκτυο στα ηπατικά κύτταρα (Libretexts,2025).

1.3.3) Ορμονική ρύθμιση της κυτταροπλασματικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου : Ρόλος της γλυκαγόνης

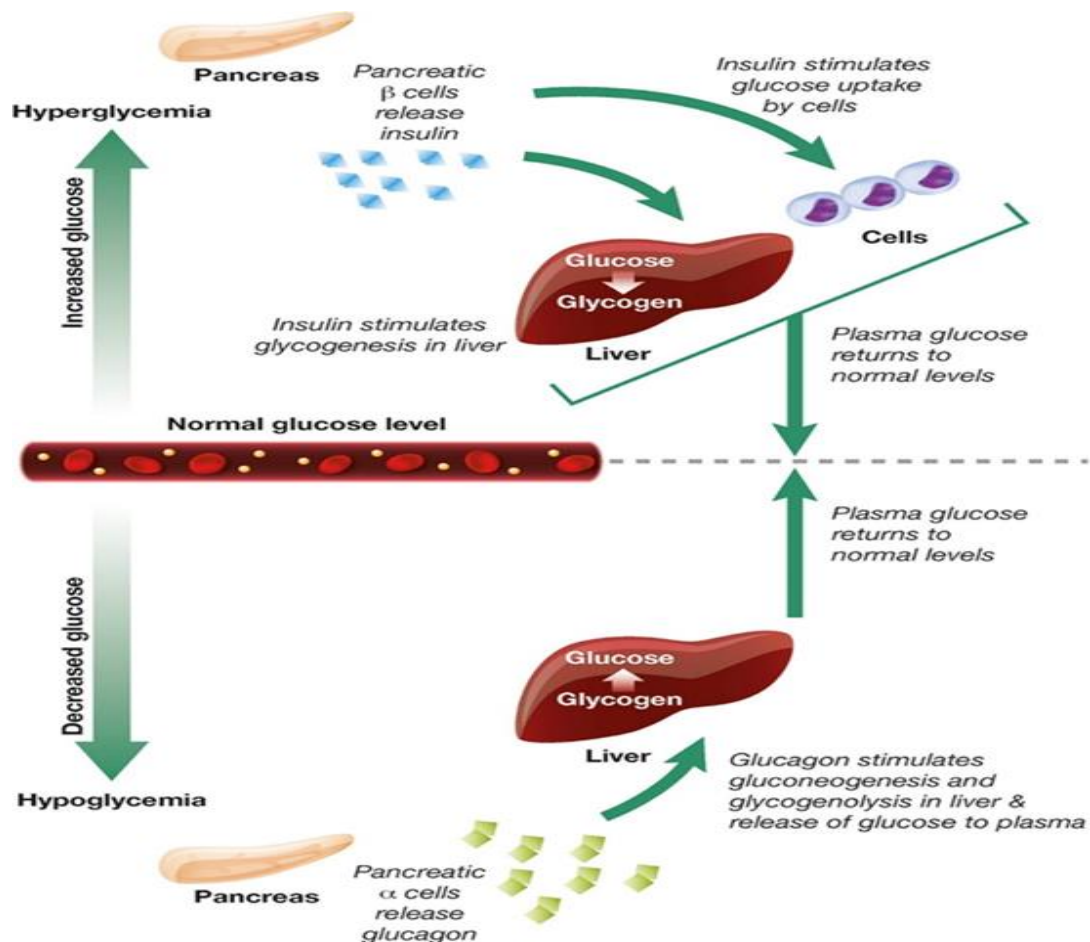
Η ενεργοποίηση και η αναστολή της αποικοδόμησης του γλυκογόνου ελέγχονται μέσω μιας πληθώρας ορμονικών και αλλοστερικών μηχανισμών, που αντανakλούν τις μεταβολικές απαιτήσεις του οργανισμού. Η γλυκαγόνη, που εκκρίνεται από τα παγκρεατικά α-κύτταρα και η επινεφρίνη, που εκκρίνεται από τα επινεφρίδια, ενεργοποιούν υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνη G, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης και την αύξηση των επιπέδων του cAMP (Han H-S.et al.,2016). Το μόριο αυτό ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την κινάση της φωσφορυλάσης (PHK). Η PHK ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου μέσω φωσφορυλίωσης, επιτρέποντας την ταχεία διάσπαση του γλυκογόνου. Η ίδια η PHK μπορεί να ενεργοποιηθεί και από αυξημένα επίπεδα ασβεστίου, ιδιαίτερα στους μύες κατά τη διάρκεια της σύσπασης, προσφέροντας έναν άμεσο μηχανισμό απόκρισης (Zois C.et al.,2016). Το μονοπάτι που ρυθμίζει η γλυκαγόνη παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της οδού σηματοδότησης της γλυκαγόνης σε ηπατοκύτταρα (Rocha S.et al.,2022).

1.3.4) Ορμονική ρύθμιση της κυτταροπλασματικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου : Ρόλος της ινσουλίνης

Από την άλλη πλευρά, η ινσουλίνη που εκκρίνεται από τα παγκρεατικά β-κύτταρα σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας, προκαλεί την αναστολή της γλυκογονόλυσης, διεγείροντας φωσφατάσες που αποφωσφορυλιώνουν την PHK και την GP. Ταυτόχρονα, ενισχύει τη δραστηριότητα της GS, προάγοντας την αποθήκευση γλυκόζης στο ήπαρ και στους μύες (Adeva-Andany M.et al.,2016). Η αντίθετη δράση ινσουλίνης και γλυκαγόνης διασφαλίζει τη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης, με την πρώτη να μειώνει τα επίπεδα της στο αίμα και τη δεύτερη να τα αυξάνει, όπως απεικονίζεται παρακάτω. Σε επίπεδο αλλοστερικής ρύθμισης, η 6-φωσφορική γλυκόζη και το ATP λειτουργούν ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ενώ το AMP την ενεργοποιεί σε συνθήκες χαμηλής ενέργειας, προσφέροντας έναν επιπλέον μηχανισμό άμεσης προσαρμογής της διάσπασης του γλυκογόνου στις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου (Libretexts,2025).



Εικόνα 7. Ρύθμιση γλυκόζης στο αίμα από ινσουλίνη και γλυκαγόνη. Σε υπεργλυκαιμία, τα παγκρεατικά β-κύτταρα εκκρίνουν ινσουλίνη, η οποία προάγει την πρόσληψη γλυκόζης από τους ιστούς και τη γλυκογένεση στο ήπαρ, επαναφέροντας τη γλυκόζη του πλάσματος σε φυσιολογικά επίπεδα. Σε υπογλυκαιμία, τα α-κύτταρα εκκρίνουν γλυκαγόνη, που διεγείρει τη γλυκογονόλυση και τη γλυκονεογένεση στο ήπαρ και απελευθέρωση γλυκόζης στο αίμα. (Hædersdal S.et al.,2018).

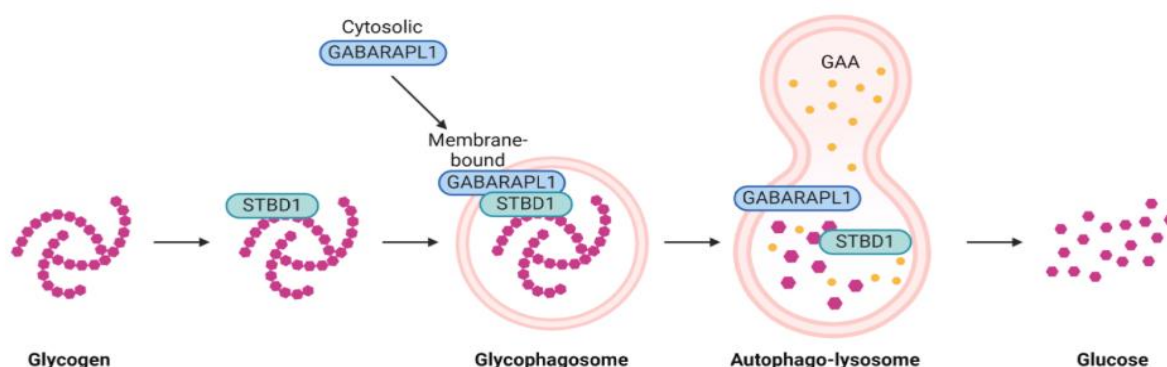
1.4) Γλυκοφαγία: εξειδικευμένη μορφή αυτοφαγίας

Η αυτοφαγία αποτελεί θεμελιώδη μηχανισμό κυτταρικής ανακύκλωσης, μέσω του οποίου αποδομούνται και ανακυκλώνονται ενδογενή μακρομόρια και οργάνιδια, εξασφαλίζοντας την επιβίωση σε συνθήκες στρες ή έλλειψης θρεπτικών ουσιών. Η γλυκοφαγία, ως εξειδικευμένη μορφή αυτοφαγίας, στοχεύει επιλεκτικά το γλυκογόνο για λυσοσωμική αποικοδόμηση. Σε σχέση με την κυτταροπλασματική οδό, η οποία βασίζεται κυρίως στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και παρέχει άμεση παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης, η γλυκοφαγία φαίνεται να εξυπηρετεί ειδικότερους ρόλους, όπως η ανακύκλωση παλαιότερων ή αλλοιωμένων αποθεμάτων γλυκογόνου (Zhang Y.et al.,2024). Ειδικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι το γλυκογόνο στους ευκαρυωτικούς ιστούς οργανώνεται σε κόκκους δύο μορφών: τους μεγάλους α-κόκκους, με πυκνή και συχνά λιγότερο διακλαδισμένη δομή και τους μικρότερους β-κόκκους, με υψηλότερο βαθμό διακλάδωσης. Η κυτταροπλασματική αποικοδόμηση φαίνεται να προτιμά τους β-κόκκους, οι οποίοι είναι περισσότερο προσβάσιμοι στη φωσφορυλάση, ενώ η γλυκοφαγία επιλέγεται συχνότερα για την απομάκρυνση των α-κόκκων, που λόγω χαμηλότερης διακλάδωσης και μεγαλύτερου μεγέθους είναι δυσκολότερο να υποστούν άμεση κυτταροπλασματική διάσπαση. Έτσι, η επιλογή οδού αποικοδόμησης πιθανόν να εξαρτάται

όχι μόνο από την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου, αλλά και από τη φυσικοχημική δομή του ίδιου του γλυκογόνου (Koutsifeli P.et al.,2022).

1.4.1) Αποικοδόμηση του γλυκογόνου μέσω αυτοφαγίας και σημαντικά ένζυμα

Κατά τη γλυκοφαγία, κεντρικό ρόλο στη στοχευμένη αναγνώριση του γλυκογόνου διαδραματίζει η πρωτεΐνη STBD1 (Starch-Binding Domain-containing Protein 1) (Koutsifeli P.et al.,2022). Η STBD1 διαθέτει διακριτούς δομικούς τομείς: έναν υδατανθρακικό δεσμευτικό τομέα τύπου CBM20 (Carbohydrate-Binding Module 20) στο C-τελικό άκρο, ο οποίος αναγνωρίζει και συνδέεται ειδικά με τις αλυσίδες γλυκογόνου και μια ακολουθία τύπου AIM (Atg8-Interacting Motif) στο N-τελικό άκρο, η οποία μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες της οικογένειας ATG8, όπως η GABARAPL1. Μέσω αυτού του διπλού ρόλου, η STBD1 δρα ως υποδοχέας-γέφυρα μεταξύ των κόκκων γλυκογόνου και του αυτοφαγοσώματος (Mancini M.et al.,2023). Εργαστηριακά ευρήματα έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της STBD1 αυξάνει τη συγκέντρωση γλυκογόνου σε αυτοφαγικά κυστίδια, ενώ η έλλειψή της μειώνει δραστικά τη ροή της γλυκοφαγίας, οδηγώντας σε συσσώρευση γλυκογόνου στο κυτταρόπλασμα (James S.et al.,2024). Η GABARAPL1, μέλος της οικογένειας LC3/GABARAP, είναι απαραίτητη για τον σχηματισμό και τη σταθεροποίηση της μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος και συνεργάζεται στενά με την STBD1, αναγνωρίζοντας την AIM ακολουθία. Μετά την ενσωμάτωση του γλυκογόνου σε αυτοφαγόσωμα, ακολουθεί η σύντηξή του με λυσόσωμα, όπου η όξινη α-γλυκοσιδάση (GAA) διασπά τους $\alpha(1\rightarrow4)$ και $\alpha(1\rightarrow6)$ δεσμούς, απελευθερώνοντας ελεύθερη γλυκόζη (Koutsifeli P.et al.,2022). Η GAA είναι απαραίτητη για την πλήρη αποικοδόμηση του γλυκογόνου στο λυσόσωμα και η δυσλειτουργία της, όπως συμβαίνει στη νόσο Pompe, οδηγεί σε παθολογική συσσώρευση λυσοσωμικού γλυκογόνου με σοβαρές συνέπειες για τη λειτουργία των ιστών (James S.et al.,2024).

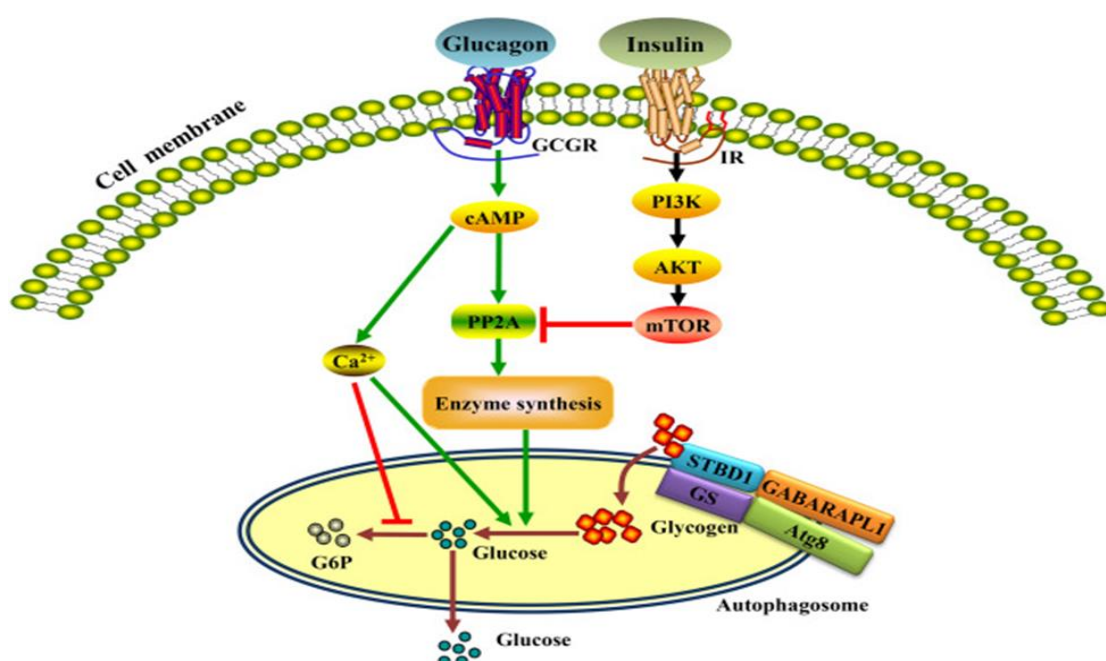


Εικόνα 8. Διαδικασία γλυκοφαγίας: Η STBD1 δεσμεύει το γλυκογόνο, συνδέεται με την GABARAPL1 και σχηματίζεται το αυτοφαγόσωμα. Μεταφέρεται στο λυσόσωμα και γίνεται η αποικοδόμηση μέσω της GAA και ελευθερώνεται γλυκόζη (James S.et al.,2024).

1.4.2) Ορμονική ρύθμιση της γλυκοφαγίας

Η ορμονική ρύθμιση της γλυκοφαγίας, αν και λιγότερο μελετημένη σε σύγκριση με την άλλη οδό, φαίνεται να επηρεάζεται από ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια και μεταβολικούς παράγοντες. Κεντρικό ρόλο διαδραματίζει η οδός cAMP/πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), η οποία ενεργοποιείται κυρίως από τη γλυκαγόνη και την επινεφρίνη σε συνθήκες νηστείας ή

υπογλυκαιμίας (Daghlal S. et al., 2025). Η αύξηση των επιπέδων cAMP προάγει τον σχηματισμό αυτοφαγικών κυστιδίων και διευκολύνει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου εντός των λυσοσωμάτων, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και διεγείρει την ηπατική 6-φωσφατάση γλυκόζης. Αντίθετα, η ινσουλίνη φαίνεται να καταστέλλει τη γλυκοφαγία μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K-Akt και επακόλουθης ενεργοποίησης της mTORC1, αρνητικού ρυθμιστή της αυτοφαγικής ροής (Mancini M. et al., 2023). Η πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A), κοινός στόχος ινσουλίνης, γλυκαγόνης και cAMP, παίζει επίσης ρόλο, καθώς επηρεάζει τη σύνθεση της GAA. Σημαντική συμβολή έχει και το ασβέστιο, του οποίου η ενδολυσosomalική αύξηση ενεργοποιεί την GAA διευκολύνοντας την υδρόλυση και την απελευθέρωση της γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα (Zhao H. et al., 2018). Όλο το μονοπάτι της ορμονικής ρύθμισης παρουσιάζεται στην Εικόνα 9 που ακολουθεί. Παρά τη συσσώρευση αυτών των ευρημάτων, οι ακριβείς μηχανισμοί που συνδέουν τα ορμονικά σήματα με τη ρύθμιση της γλυκοφαγίας παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι και ασαφείς, καθιστώντας το πεδίο αυτό ένα από τα πιο ανοιχτά και υποσχόμενα για μελλοντική έρευνα.

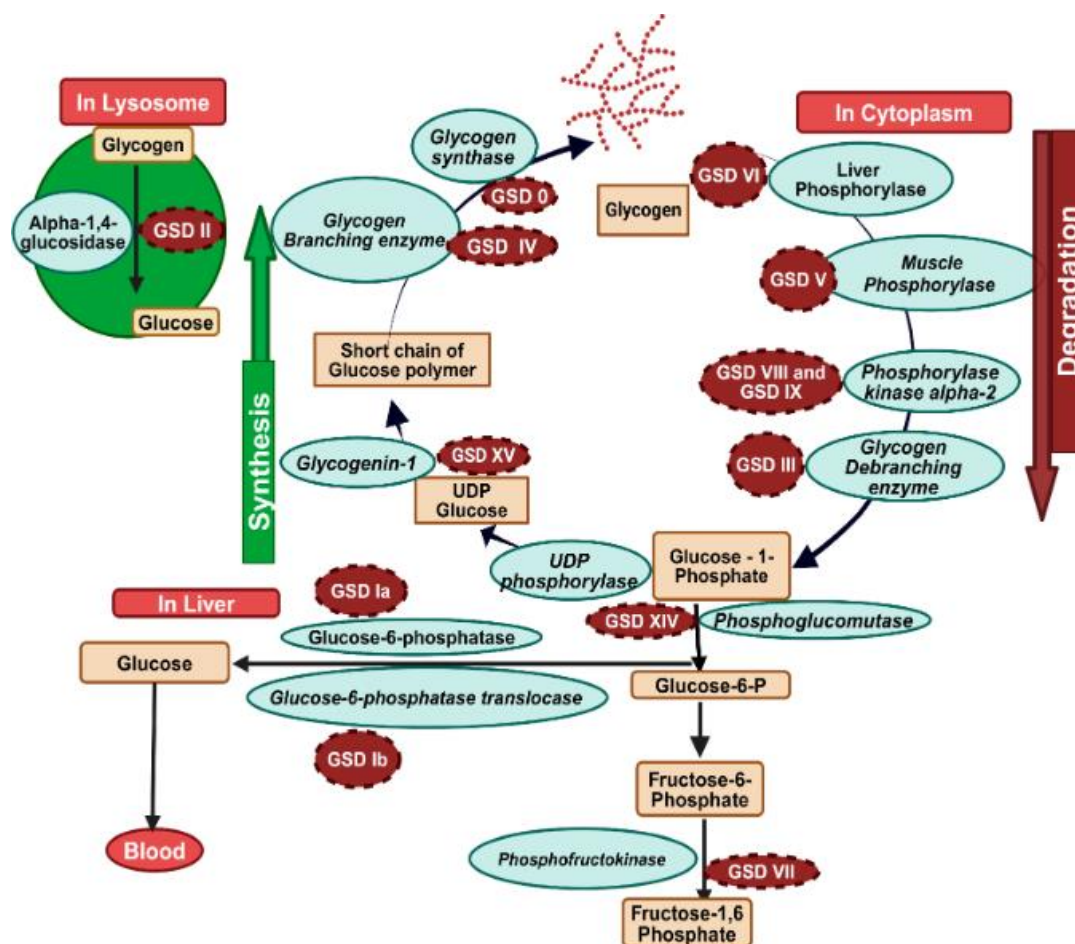


Εικόνα 9. Ρύθμιση της γλυκοφαγίας από ορμονικά και σηματοδοτικά μονοπάτια (Zhao H. et al., 2018).

1.5) Ασθένειες αποθήκευσης γλυκογόνου

Οι ασθένειες αποθήκευσης γλυκογόνου (GSDs) είναι κληρονομικές διαταραχές του μεταβολισμού στις οποίες βλάβες ενζύμων ή μεταφορέων της σύνθεσης/διάσπασης του γλυκογόνου διαταράσσουν την ισορροπία ανάμεσα στη γλυκογένεση, την κυτταροπλασματική γλυκογονόλυση και τη λυσοσωμική αποικοδόμηση (γλυκοφαγία). Το αποτέλεσμα είναι συσσώρευση ή/και δομική αλλοίωση του γλυκογόνου. Κάποιες από αυτές αναλύονται παρακάτω (Ellingwood S. et al., 2018). Κλινικά παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα εκδηλώσεων που κυμαίνεται από ηπατομεγαλία και υπογλυκαιμία έως μυϊκή κόπωση, κράμπες και καρδιομυοπάθεια, ανάλογα με τον ιστό-στόχο. Η ηλικία έναρξης ποικίλλει (νεογνική έως ενήλικη ζωή) και η σοβαρότητα των συμπτωμάτων εξαρτάται από την υπολειμματική ενζυμική

δραστικότητα. Η διάγνωση στηρίζεται σε βιοχημικό έλεγχο και συχνότερα σε μοριακό γενετικό έλεγχο που επιτρέπει ακριβή ταυτοποίηση της κατηγορίας. Η αντιμετώπιση είναι κατά κανόνα με αλλαγή στη διατροφή (δίαιτα υψηλή σε πρωτεΐνη), με ειδικές θεραπείες όπου υπάρχουν (π.χ. ενζυμική υποκατάσταση στη Pompe) και εξατομικευμένη παρακολούθηση από επιστήμονες (Mishra K.et al,2024). Στην εικόνα που ακολουθεί συνοψίζονται οι συχνότεροι τύποι των GSDs, τα υπεύθυνα ένζυμα/μεταφορείς και η κατανομή κατά ιστό.



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της οδού μεταβολισμού του γλυκογόνου και των σημείων όπου υπάρχουν γενετικές ανεπάρκειες. Η δυσλειτουργία του κάθε ενζύμου αντιστοιχεί σε διαφορετικό τύπο GSD. Τύποι GSD: 0 - GS, IV - GBE, XV -Glycogenin-1, XIV - UDP phosphorylase, III - GDE, VI - PYGL, V - PYGM, II - GAA, IA - Glucose-6-phosphatase (Mishra K,et al.,2024).

1.5.1) Νόσος Cori/Forbes (GSD τύπου III)

Η GSD τύπου III (νόσος Cori/Forbes) προκαλείται από παθογόνες μεταλλάξεις στο γονίδιο AGL (1p21), το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου. Το ένζυμο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, διαθέτει δύο διακριτές καταλυτικές θέσεις και η ανεπάρκεια οποιασδήποτε από τις δύο αρκεί για να εμποδίσει την σωστή λειτουργία της γλυκογονόλυσης κοντά στα σημεία διακλάδωσης. Αυτό μπορεί να έχει ως συνέπεια συσσώρευση γλυκογόνου με βραχείες εξωτερικές αλυσίδες, ιδίως στα ηπατοκύτταρα και στους σκελετικούς/καρδιακούς μύες (Mishra K.et al,2024). Η νόσος κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο, αντιπροσωπεύει περίπου το ένα τέταρτο των GSDs και παρουσιάζει σημαντική φαινοτυπική

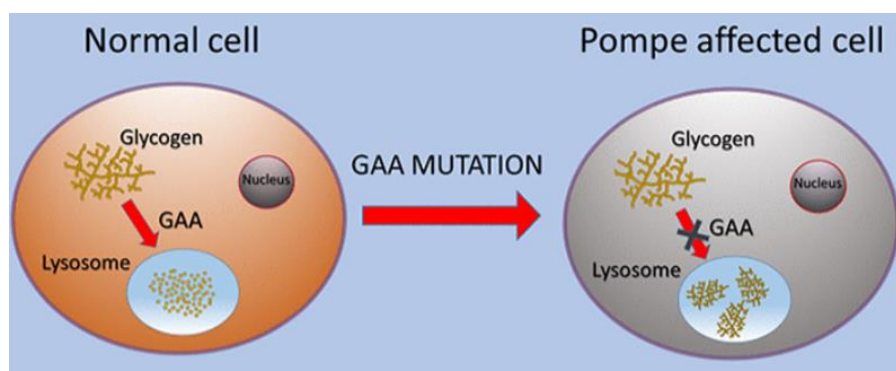
ετερογένεια λόγω ισομορφών του AGL. Στη βρεφική-παιδική ηλικία εκδηλώνεται με ηπατομεγαλία, υπογλυκαιμία, καθυστέρηση ανάπτυξης και μπορεί να συνοδεύεται από μυοπάθεια, ενώ η γλυκονογένεση δεν επηρεάζεται. Η διάγνωση βασίζεται κυρίως σε μοριακό έλεγχο του AGL και η θεραπευτική προσέγγιση είναι κατεξοχήν διαιτητική (Ellingwood S.et al.,2018).

1.5.2) Νόσος Hers (GSD τύπου VI)

Αντίστοιχα, η GSD τύπου VI (νόσος Hers) σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο PYGL και μειωμένη τη δραστηριότητα της ηπατικής φωσφορυλάσης (Daghlis S.et al.,2025). Τυπικά είναι ηπιότερη, με ηπατομεγαλία και υπογλυκαιμία που συχνά βελτιώνονται με την ηλικία. Συνήθως εκδηλώνεται στην πρώιμη παιδική ηλικία με καθυστέρηση ανάπτυξης και υπογλυκαιμία, ενώ η κλινική εικόνα είναι καλύτερη σε σχέση με άλλες ηπατικές GSD. Η διάγνωση επιβεβαιώνεται με ανίχνευση παθολογικών παραλλαγών στο PYGL ή, εναλλακτικά, με μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας σε ηπατικό ιστό. Η αντιμετώπιση είναι κυρίως διαιτητική με γεύματα πλούσια σε υδατάνθρακες με γενικά άριστη πρόγνωση. Κλινικά μοιάζει με την ηπατική GSD-IX (ανεπάρκεια της κινάσης της φωσφορυλάσης), γι' αυτό και συχνά απαιτείται μοριακός έλεγχος για τη διάγνωση (Ellingwood S.et al.,2018).

1.5.3) Νόσος Pompe (GSD τύπου II)

Η νόσος Pompe (GSD τύπου II) είναι ξεχωριστή μεταξύ των GSD, καθώς αποτελεί λυσοσωμική νόσο αποθήκευσης που προκαλείται από έλλειψη της όξινης α-γλυκοσιδάσης (GAA). Η απουσία του ενζύμου αναστέλλει τη λυσοσωμική αποικοδόμηση του γλυκογόνου (γλυκοφαγία) και οδηγεί σε ενδολυσοσωμική συσσώρευση, κυρίως στον σκελετικό και τον καρδιακό μυ (Ellingwood S.et al.,2018). Κλινικά, το φάσμα κυμαίνεται από τη βρεφική ηλικία, όπου παρουσιάζεται μια ταχέως εξελισσόμενη μορφή με υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια και βαριά υποτονία, έως μορφές όψιμης έναρξης με προοδευτική μυϊκή αδυναμία και συχνά προβλήματα στην αναπνευστική οδό. Υπογλυκαιμία συνήθως δεν παρατηρείται, καθώς η συνεισφορά της λυσοσωμικής οδού στην παραγωγή γλυκόζης είναι μικρή. Η θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης έχει βελτιώσει σημαντικά την πρόγνωση, ενώ διερευνώνται νεότερες στρατηγικές, όπως βελτιστοποίηση δοσολογίας, συνδυαστικές προσεγγίσεις και γονιδιακή θεραπεία (Taverna S.et al.,2020).



Εικόνα 11. Σε φυσιολογικά κύτταρα η λυσοσωμική GAA διασπά το γλυκογόνο. Κατά τη νόσο Pompe, η ανεπάρκεια της GAA οδηγεί σε προοδευτική συσσώρευση στα λυσοσώματα (Taverna S.et al.,2020).

1.5.4) Σακχαρώδης διαβήτης

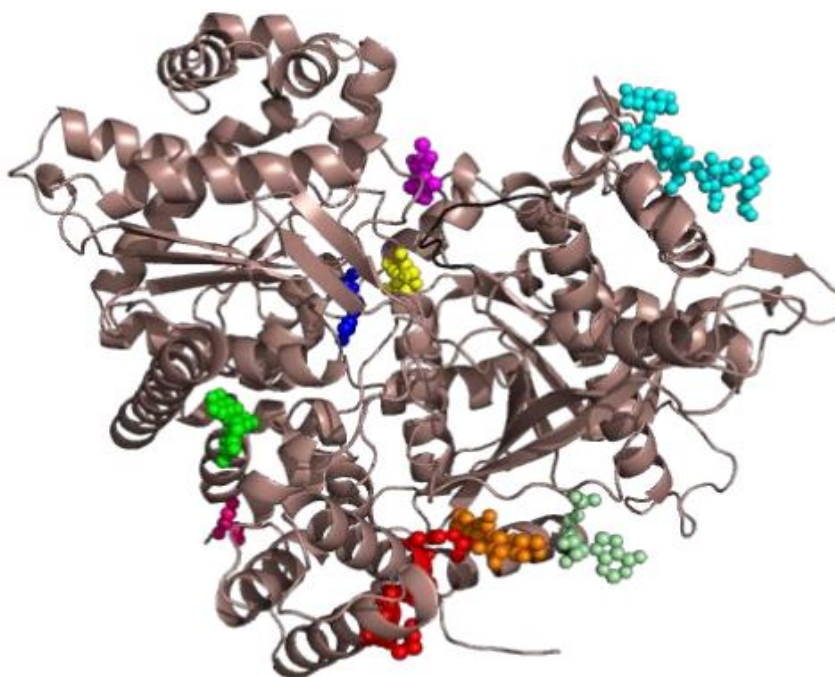
Πέρα από τις κλασικές GSDs, ο σακχαρώδης διαβήτης αναδεικνύει μια συστηματική διαταραχή του μεταβολισμού και της δομής του γλυκογόνου. Στον διαβήτη τύπου 1 η έλλειψη ινσουλίνης μεταβάλλει τη ροή άντλησης/αποθήκευσης, ενώ έχουν περιγραφεί αλλοιώσεις στη δομή του γλυκογόνου (Ashcroft F.M.et al.,2017). Στον διαβήτη τύπου 2 ο συνδυασμός αντίστασης στην ινσουλίνη και της σχετικής ανεπάρκειας ινσουλίνης οδηγεί σε ανώμαλη ηπατική ρύθμιση, συσσώρευση γλυκογόνου (π.χ. νεφρός, πάγκρεας) και αλλαγές στη δομή του, οι οποίες φαίνεται ότι είναι εν μέρει αναστρέψιμες με αλλαγή στον τρόπο ζωής ή σε διαφορετικές διατροφικές και φαρμακευτικές στρατηγικές που βελτιώνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Συνολικά, είτε πρόκειται για μονογονιδιακές GSDs (π.χ. AGL, PYGL, GAA) είτε για πολυπαραγοντικές καταστάσεις όπως ο διαβήτης, ο τρόπος με τον οποίο συντίθεται, δομείται και αποικοδομείται το γλυκογόνο αποτελεί κρίσιμο σημείο ανάμεσα στη βιοχημεία και την κλινική εικόνα (Liu X.et al.,2024).

1.6) Αναστολείς

Η ανεξέλεγκτη διάσπαση του γλυκογόνου, η αποικοδόμηση του μέσω γλυκοφαγίας και η απορρύθμιση της λειτουργίας ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες συμβάλλουν σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και ορισμένες GSDs (Ellingwood S.et al.,2018). Η ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων των δύο οδών θα μπορούσε επομένως να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για τον έλεγχο της υπεργλυκαιμίας και την εύρεση πιθανών στόχων φαρμάκων για την θεραπεία των ασθενειών (Liu X.et al.,2024).

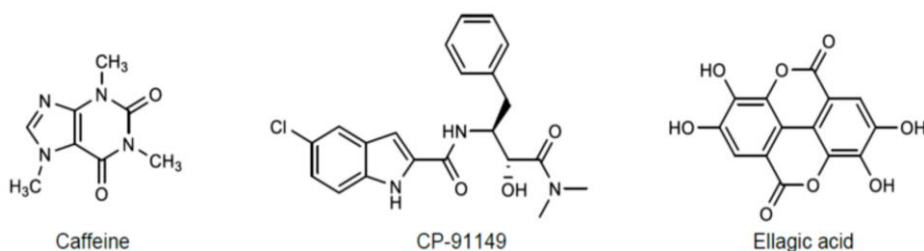
1.6.1) Αναστολή της γλυκογονόλυσης μέσω της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η γλυκογονόλυση ελέγχεται κυρίως από την φωσφορυλάση του γλυκογόνου, το ένζυμο που καταλύει το καθοριστικό βήμα διάσπασης του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη. Η ρύθμιση του ενζύμου γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης (μετατροπή της GPb σε GPa) και μέσω αλλοστερικών υποδοχέων που το μετακινούν από την ενεργό «R» σε μια ανενεργή κατάσταση (Rosha S.et al.,2022). Μάλιστα, η φωσφορυλάση διαθέτει πολλά κέντρα σύνδεσης, όπως είναι η καταλυτική περιοχή, η αλλοστερική ή αλλιώς η θέση σύνδεσης AMP, το κέντρο σύνδεσης αναστολέων, η θέση σύνδεσης της καφεΐνης ή αλλιώς πουρινική, η θέση σύνδεσης του γλυκογόνου, το κέντρο σύνδεσης της κερσετίνης και η νέα αλλοστερική θέση. Η ύπαρξη πολλών θέσεων δέσμευσης έχει επιτρέψει την ανάπτυξη διαφόρων κατηγοριών αναστολέων (Rosha S.et al.,2021).



Εικόνα 12. Κρυσταλλική δομή του μονομερούς της GP (μυϊκή ισομορφία). Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το καταλυτικό κέντρο, με μωβ το κέντρο σύνδεσης αναστολέα, με ανοιχτό πράσινο το αλλοστερικό κέντρο, με κόκκινο το νέο αλλοστερικό κέντρο, με γαλάζιο η θέση σύνδεσης του γλυκογόνου, με πράσινο η θέση πρόσδεσης της κερσετίνης, με πορτοκαλί η θέση σύνδεσης βενζαμιδαζολίου, με μπλε το μόριο PLP, με ροζ η Ser14 και με μαύρο η 280s loop (Alexoroulos S.et al.,2024).

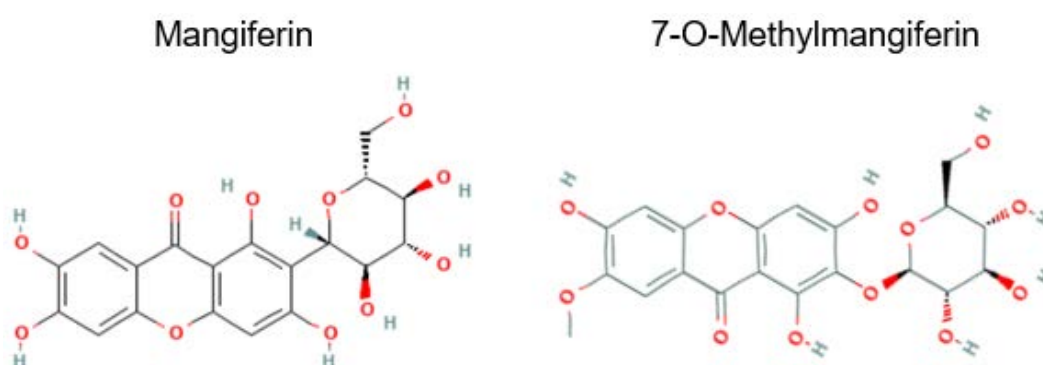
Συνθετικοί αναστολείς υψηλής ισχύος, όπως τα ινδολοκαρβοξαμίδια CP-91149 (Rocha S.et al.,2021) και ingliforib (Zhao Y.et al.,2024), ή τα παράγωγα γλυκόζης τύπου azasugars, δρουν σε διαφορετικές θέσεις του ενζύμου, αλλά η υψηλή ομολογία των ισομορφών (ηπατικής, μυϊκής, εγκεφαλικής) και ζητήματα φαρμακοκινητικής έχουν περιορίσει την κλινική τους αξιοποίηση (Zois C.et al.,2016). Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φυσικοί αναστολείς από φλαβονοειδή όπως η χρυσίνη, η βαϊκαλεΐνη και η νορβογονίνη, που αναστέλλουν την φωσφορυλιωμένη μορφή της GP (Rosha S.et al.,2022). Άλλα φυσικά προϊόντα, όπως οι ανθοκυανιδίνες, τα τριτερπένια και οι C-γλυκοζυλιωμένοι αναστολείς, έχουν επίσης δείξει ισχυρή αναστολή *in vitro*. Η καφεΐνη, παρότι ιστορικά χρησιμοποιείται ως πρότυπο και ήταν η πρώτη φυσική ένωση με αποδεδειγμένη θέση αναστολέα, είναι σχετικά ασθενής καθώς, απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις για αξιοσημείωτη αναστολή. Παρουσιάζει ωστόσο ενδιαφέρουσες συνεργιστικές ιδιότητες, αφού η παρουσία γλυκόζης ή άλλων αλλοστερικών αναστολέων ενισχύει την δραστικότητά της, γεγονός που έχει αξιοποιηθεί πειραματικά (Chapple B.et al.,2024). Μάλιστα, φλαβονοειδή όπως η EGCG και η EGC δεσμεύονται σε διαφορετική αλλοστερική θέση από την καφεΐνη, λειτουργώντας ως μη ανταγωνιστικοί αναστολείς και υποδεικνύοντας δυνατότητα για ηπατική εκλεκτικότητα (Alexoroulos S.et al.,2024). Συνολικά, η αναστολή της γλυκογονόλυσης μέσω της GP αποτελεί έναν πολύ ελκυστικό θεραπευτικό στόχο, αλλά παρουσιάζονται ακόμη δυσκολίες που πρέπει να ξεπεραστούν, όπως οι ομοιότητες που παρουσιάζουν οι ισομορφές μεταξύ τους στην καταλυτική τους θέση και στην αλληλουχία (Rosha S.et al.,2022).



Εικόνα 13. Γνωστοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, οι οποίοι είναι η καφεΐνη, η CP-91149 και το Ellagic acid (Rosha S,et al.2021).

1.6.2) Η επίδρασης της mangiferin στη γλυκογονόλυση και τη γλυκοφαγία

Η mangiferin είναι μια πολυφαινολική ξανθόνη προερχόμενη από το μάνγκο, στη οποία έχουν αποδοθεί σημαντικές αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, όπως και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Akter S.et al.,2022). Έχει βρεθεί πως μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης σε διαβητικά ποντίκια χωρίς να υπάρχουν ενδείξεις άμεσης αναστολής της GP (Imran M.et al.,2017). Μελέτη που χρησιμοποίησε πειραματικά μοντέλα ποντικών έδειξαν ότι συνδέεται με αύξηση της αυτοφαγίας μέσω της αύξησης LC3-II που συμμετέχει στην δημιουργία των αυτοφαγοσωμάτων, καθώς και μέσω της καταστολής σηματοδότησής του μονοπατιού του mTORC1 (Hou J.et al.,2018). Στην παρούσα εργασία εξετάζεται εάν το παραγωγό 7OMF παρουσιάζει ανασταλτική δράση έναντι της γλυκογονόλυσης σε ex vivo σύστημα HepG2.

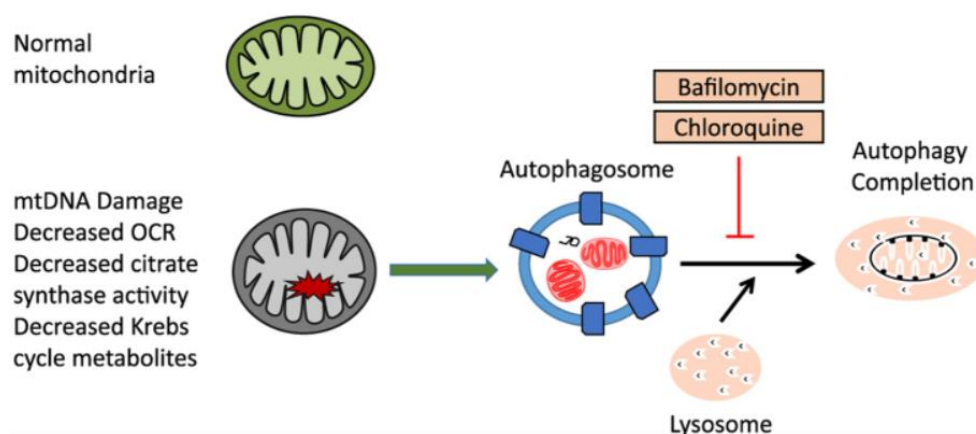


Εικόνα 14. Χημική δομή mangiferin με PubChem CID: 5281647 στο αριστερό μέρος και χημική δομή 7-O-Methylmangiferin με PubChem CID: 73354034 στο δεξί μέρος (PubChem).

1.6.3) Αναστολή της γλυκοφαγίας

Η γλυκοφαγία είναι εξειδικευμένη μορφή αυτοφαγίας που διασφαλίζει την μεταφορά του γλυκογόνου των κυττάρων στα λυσοσώματα για διάσπαση. Ειδικοί αναστολείς της γλυκοφαγίας δεν έχουν ακόμη αναπτυχθεί. Ωστόσο, χρησιμοποιούνται, γενικοί αναστολείς της αυτοφαγίας, όπως η βαφιλομυκίνη A1 και η χλωροκίνη, οι οποίες αναστέλλουν την οξύτητα των λυσοσωμάτων και μπλοκάρουν τη σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με το λυσοσώμα, οδηγώντας σε συσσώρευση της STBD1 και άλλων υποστρωμάτων (Redmann M.et al.,2016). Η δράση των δυο αναστολέων φαίνονται στην παρακάτω εικόνα. Επιπλέον, η αναστολή της GAA με φάρμακα όπως η ακαρβόζη μειώνει τη λυσοσωμική διάσπαση του γλυκογόνου και έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τη μελέτη της γλυκοφαγίας σε μυϊκά κύτταρα,

επηρεάζοντας τη χρήση της γλυκόζης και την ευαισθησία στην ινσουλίνη (Mancini M. et al., 2023). Από την άλλη πλευρά, η οδός mTORC1 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της αυτοφαγίας. Η φαρμακευτική αναστολή της (π.χ. με ραπαμυκίνη) μπορεί να προάγει τη γλυκοφαγία. Παράλληλα, σήματα όπως τα επίπεδα ασβεστίου και το κυκλικό AMP επηρεάζουν την επιλογή των υποστρωμάτων (Koutsifeli P. et al., 2022). Γενικά, η κατανόηση των μηχανισμών και της φαρμακολογικής ρύθμισης της γλυκοφαγίας βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο, γεγονός που καθιστά την εύρεση εκλεκτικών αναστολέων πεδίο ενεργής έρευνας.



Εικόνα 15. Αναστολή αυτοφαγίας μέσω βαφιλομυκίνης και χλωροκίνης (Redmann M. et al., 2016).

2) Σκοπός

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθούν τα επίπεδα έκφρασης βασικών πρωτεϊνών της γλυκογονόλυσης (PYGL, AGL) και της γλυκοφαγίας (STBD1) σε κύτταρα HepG2, ώστε να αποτυπωθεί ο λειτουργικός συντονισμός των δύο οδών στο ηπατοκυτταρικό υπόδειγμα. Το μονοπάτι της κυτταροπλασματικής ηπατικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου (γλυκογονόλυση) είναι αρκετά μελετημένο, αλλά δεν ισχύει το ίδιο για το μονοπάτι της γλυκοφαγίας στο ήπαρ. Απώτερος σκοπός είναι να απαντηθούν τα κάτωθι ερωτήματα :

α) Πώς συσχετίζονται τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών της γλυκογονόλυσης (PYGL, AGL) και της γλυκοφαγίας (STBD1, GAA και GABARAP) ανάλογα με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου (συνθήκες νηστείας, σίτισης);

β) Πώς μεταβάλλονται τα επίπεδα των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της ορμονικά επαγόμενης γλυκογονόλυσης;

γ) Η αναστολή της κυτταροπλασματικής γλυκογονόλυσης επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών της γλυκοφαγίας;

Η μελέτη αξιολογεί ορμονικά και φαρμακολογία ερεθίσματα (γλυκαγόνη, ινσουλίνη, καφεΐνη), καθώς και την επίδραση του 7-O-Methylmangiferin (7OMF) ως υποψήφιου αναστολέα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε προκαθορισμένες συνθήκες καλλιέργειας/χειρισμών. Η μεθοδολογική προσέγγιση περιλαμβάνει ένα συνδυασμό βιοχημικών τεχνικών, όπως

ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot, ex vivo κινητικές μελέτες και ανάλυση πρωτεϊνικού προφίλ με τη φασματομετρία μάζας.

3) Υλικά και Μέθοδοι

3.1) Οργανολογία

Air displacement pipettes 0,2–20 μ L, 20–200 μ L, 200–1000 μ L - Gilson	Heatblock - Kisker
Sonicator Model UP400S - Hielscher Ultra-sound Technology	Water bath - Selecta / WiseBath
Multimode plate reader - Enspire multimode plate reader	Αναδευτήρας (Vortex) - Bio Vortex V1
Επωαστήρας κυτταροκαλλιιεργειών- Thermo Electron Corporation	Ζυγοί - Kern EW, Kern 440-47 N
Πεχάμετρο - Metrohm 827 pH Lab	Πλάκα Neubauer - HBG Germany
Πλαστική ράβδος (scraper) - Thermo Fisher Scientific	Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς - Bio-Rad Mini Trans-Blot
Συσκευή ηλεκτροφόρησης - Bio-Rad Mini-PRO-TEAN Tetra Cell	Τροφοδοτικό - Wealtec Elite 200
Φυγόκεντρος κυτταροκαλλιιεργειών - Jouan BR4 · Eppendorf 5810R	Φωτόμετρο - Spectronic 20 GENESYS
Σκοτεινός θάλαμος/σετ εμφάνισης μεμβρανών - Kodak	Quick spin - Nippon Genetics Europe GmbH
Αναδευτήρας - Heidolph Rotamax	Laminar Flow Hood - Telstar AV-30/70

Πίνακας 1. Οργανολογία των πειραμάτων : Κατάλογος οργάνων και συσκευών με εταιρεία/μοντέλο.

3.2) Αναλώσιμα

Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων, επιφάνειας 75 cm ² - Sarstedt	Κρυοσωληνάρια (cryovials) για φύλαξη κυττάρων - Sarstedt
Πιάτα καλλιέργειας κυττάρων (60 × 15 mm) - Corning	Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων (96 θέσεων) - Sarstedt
Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων (384 θέσεων) - Corning	Διηθητικά χαρτιά (Whatman) - Sigma
Μεμβράνη νιτροκυταρίνης, 395 x 85 x 85 mm, Macherey- Nagel	Πιάτα καλλιέργειας κυττάρων (100 × 20 mm) - Corning

Πιπέτες ορολογικές (Serological), 2, 5 και 10 mL - Sarstedt	Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcon), 15 mL και 50 mL - Sarstedt
Πλαστικά σωληνάρια (eppendorf), 1,5 mL - Sarstedt	Ρύγχοι πιπετών, 0,2–10 µL, 20–200 µL και 100–1000 µL - Sarstedt
Γυάλινα σιφώνια- Kimble	Φιλμ ανίχνευσης σήματος - FUJI MEDICAL

Πίνακας 2. Λίστα αναλωσίμων κυτταροκαλλιέργειας/βιοχημικών πειραμάτων.

3.3) Διαλύματα

Transfer Buffer 1×: Μεθανόλη 20 % v/v, SDS 0,05 % w/v, Running Buffer 10× 10 % v/v σε dH ₂ O (Αποθήκευση στους 4 °C).	Fixer: 750 mL dH ₂ O, 225 mL Διαλύματος A, 25 mL Διαλύματος B. (Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι).
Developer: 725 mL dH ₂ O, 250 mL Διαλύματος A, 25 mL Διαλύματος B. (Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι).	Lysis Buffer (1): 20 mM HEPES (pH 7,5), Triton X-100 0,05 %, PMSF 1 mM, NaF 1 mM. (Αποθήκευση στους 4 °C).
Lysis Buffer (2): 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), Triton X-100 0,5 %, NaCl 250 mM, EDTA 3 mM, PMSF 1 mM, DTT 2 mM. (Αποθήκευση στους 4 °C).	TBS 10×: Tris base σε dH ₂ O, pH 7,4–7,6. (Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου).
Running Buffer 10×: Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1 % (Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου).	TBST 1×: TBS 10× 10 % v/v, Tween-20 0,06 % v/v σε dH ₂ O. (Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου).
Running Buffer 1×: Running Buffer 10× 10 % v/v + SDS 0,1 % v/v σε dH ₂ O. (Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου).	TEMED: Χρήση χωρίς αραίωση. (Αποθήκευση στους 4 °C).
Tris 20 mM (pH 7,5): Αραίωση stock Tris 1 M (pH 7,5) με ddH ₂ O. (Αποθήκευση στους 4 °C).	Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 10 % w/v: Διαλύεται σε ddH ₂ O (τελικό 10 % w/v). (Αποθήκευση στους –20 °C).
Sample Buffer 4×: 1 M Tris (pH 6,8), Γλυκερόλη 10 %, SDS 10 %, β-μερκαπτοαιθανόλη 5 %, bromophenol blue 1 %. (Αποθήκευση στους –20 °C).	PMSF 200 mM / 20 mM: Stock PMSF 200 mM με αραίωση 10 % σε ισοπροπανόλη παρασκευάζεται διάλυμα 20 mM. (Αποθήκευση στους –20 °C).
Ρυθμιστικό διάλυμα 1: Ιμιδαζόλιο 200 mM, KCl 400 mM, DTT 4 mM, EDTA 4 mM, pH 6,8. Αποθήκευση στους 4 °C.	Ρυθμιστικό διάλυμα 2: Ιμιδαζόλιο 135 mM, KCl 270 mM, DTT 2,7 mM, EDTA 2,7 mM, pH 6,8. Αποθήκευση στους 4 °C.
Μίγμα μολυβδαινικού αμμωνίου / οξικού ψευδαργύρου: Μολυβδαινικό αμμώνιο 15 mM + οξικό ψευδάργυρο 100 mM, ρύθμιση pH 5,0 με πυκνό HCl.	Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10 % (w/v), pH 5,0
Lysis Buffer (3): 4 % SDS, 100mM DTT (pH 7,5) 100mM Tris – HCl (pH 7,5). Αποθήκευση στους 4 °C.	

Πίνακας 3. Διαλύματα και συνθέσεις: σύσταση, pH, συνθήκες αποθήκευσης.

3.4) Υλικά

Ammonium molybdate tetrahydrate - Sigma-Aldrich	Imidazole - Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA) - New England Biolabs	L-ascorbic acid - Sigma
L-glutamine - Gibco	Sodium fluoride (NaF) - Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) - Life Technologies / Invitrogen	Sodium hydroxide (NaOH) - Merck
Dexamethasone (DEX) - Riedel-de Haën	Penicillin - Gibco
Streptomycin - Gibco	Fetal Bovine Serum (FBS) - Gibco
Trypsin - Gibco	Glycogen - Sigma-Aldrich
HEPES - Serva	Triton X-100 - AppliChem
Hydrochloric acid (HCl) - AppliChem	Zinc acetate - Sigma-Aldrich
β -glycerophosphate (β -GP) - Sigma-Aldrich	β -mercaptoethanol (BME) - Sigma-Aldrich
α -D-glucose 1-phosphate (G1P) - Sigma-Aldrich	Acrylamide/Bis-acrylamide solution 40 % - Bio-Rad
Protein ladder - Thermo Scientific (Fermantas)	Skimmed milk powder - Regilait 25
Immobilon Classico Western HRP Substrate – Milipore	Tween 20 - Sigma
Glycine - Serva	Glycerol - AppliChem
Isopropanol - Sigma	Protease inhibitor cocktail - Sigma
Methanol - Chemlab	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) - Sigma
Bradford Protein Assay (5x) - Bio-Rad	Developer - Fujifilm
Fixer - Fujifilm	Dimethyl sulfoxide (DMSO) - Sigma
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) - SERVA	Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x - Gibco
Sodium chloride (NaCl) - Scharlab	Sodium dodecyl sulfate (SDS) - Sigma
Tetramethylethylenediamine (TEMED) - AppliChem	Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) - Serva
Glucagon - Sigma	Ammonium persulfate (APS) - Serva
Insulin - Sigma	Bromophenol blue - Research Organics

Πίνακας 4. Χημικά και καλλιεργητικά υλικά : κατάλογος χημικών και εταιρείες.

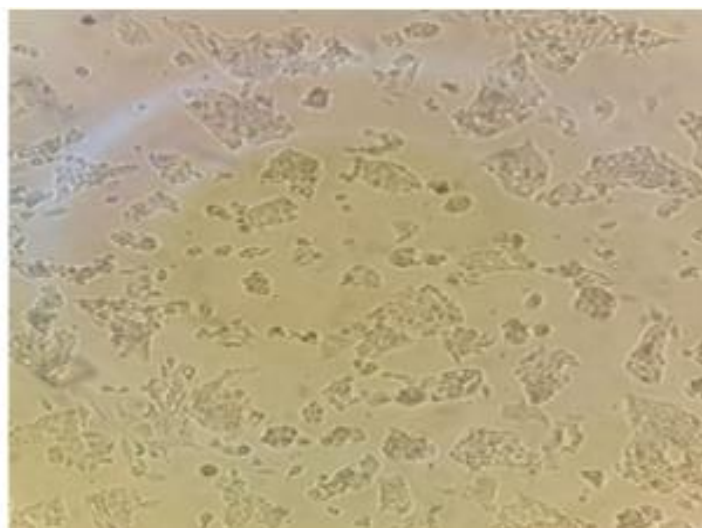
3.5) Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα για Western Blot

Αντίσωμα	Αραίωση (v/v)	Πηγή παραγωγής	Μοριακό βάρος	Εταιρεία
Starch-binding domain-containing protein 1 (STBD1)	1:1000	Rabbit	41 kDa	Proteintech
Glycogen phosphorylase, liver form (PYGL)	1:2000	Rabbit	97 kDa	Proteintech
Amylo-1,6-glucosidase, 4- α -glucanotransferase (AGL)	1:2000	Rabbit	165 kDa	Proteintech
Alpha-tubulin (α -tubulin)	1:1000	Mouse	55 kDa	Santa Cruz
HRP-conjugated anti-mouse IgG	1:2000	Goat	-	Proteintech
HRP-conjugated anti-rabbit IgG	1:2000	Goat	-	Proteintech

Πίνακας 5. Πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα, αραίωση, εταιρεία, μοριακό βάρος και πηγή παραγωγής.

3.6) Κυτταρική σειρά HepG2

Η HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line) είναι ανθρώπινη ηπατική κυτταρική σειρά επιθηλιακής μορφολογίας, προερχόμενη από βιοψία ήπατος Καυκάσιου άρρενος, ηλικίας 15 χρονών, με καλά διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Συνήθως καλλιέργεια γίνεται σε DMEM με 10 % FBS, στους 37 °C και 5 % CO₂. Η σειρά χρησιμοποιείται ευρέως ως in vitro μοντέλο ηπατοκυττάρων για μελέτες τοξικολογίας και μεταβολισμού πρωτεϊνών.



Εικόνα 16. Φωτογραφία από μικροσκόπιο κυττάρων HepG2.

3.7) Διαχείριση κυτταροκαλλιιεργειών

3.7.1) Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε cryovials σε θερμοκρασία κατάψυξης -80°C είτε σε υγρό άζωτο. Κατά την απόψυξη, το cryovial μεταφέρεται σε υδατόλουτρο (37°C) προκειμένου να ξεπαγώσει και στη συνέχεια τοποθετείται σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood). Στον θάλαμο γίνεται προσθήκη του 1 ml από το cryovial σε δοκιμαστικό σωλήνα (falcon) με 9 ml θρεπτικού μέσου (DMEM) και φυγοκεντρείται σε 1000 rpm για 5 λεπτά στους 25°C . Από την φυγοκέντρωση, αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται προσεκτικά σε 5 ml θρεπτικού μέσου. Το τελευταίο βήμα είναι η μεταφορά των 5 ml σε καλλιιεργητική φλάσκα, η παρατήρηση της στο μικροσκόπιο και η τοποθέτηση της σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C με 5 % CO_2 .

3.7.2) Ψύξη κυττάρων

Η ψύξη κυττάρων αποσκοπεί στην αποθήκευση τους για να είναι διαθέσιμα σε πιθανή μελλοντική χρήση. Το πρωτόκολλο απαιτεί τα βήματα της θρυψινοποίησης αλλά μετά την φυγοκέντρωση το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται και χωρίζεται σε cryovials με αναλογία 0,9 ml FBS και 0,1 ml DMSO ανά δείγμα, το οποίο έχει κρυοπροστατευτική ιδιότητα. Τέλος, τα cryovials μεταφέρονται σε κατάψυξη με θερμοκρασία -80°C .

3.7.3) Θρυψινοποίηση

Ο ρόλος της θρυψίνης είναι να διασπά πρωτεΐνες προσκόλλησης τόσο μεταξύ των κυττάρων όσο και στην επιφάνεια καλλιέργειας, λειτουργώντας ως πρωτεάση. Η διαδικασία ξεκινάει με την αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και την προσθήκη διαλύματος θρυψίνης, συνήθως 2 ml, με σκοπό να καλυφθεί πλήρως το στρώμα των κυττάρων. Ακολουθεί επώαση στον κλίβανο για 2 λεπτά, με ενδιάμεσο έλεγχο στο μικροσκόπιο για αποκόλληση των κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί πως, η θρυψίνη αν παραμείνει παραπάνω χρονικό διάστημα στα κύτταρα προκαλεί κυτταροτοξικότητα και χρειάζεται άμεση εξουδετέρωση. Για την εξουδετέρωση της δράσης προστίθεται θρεπτικό μέσο με αναλογία 4 προς 1 σε σχέση με την θρυψίνη. Το εναιώρημα μεταφέρεται σε σωλήνα falcon και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε συνθήκες 1000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου ($20-25^{\circ}\text{C}$). Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου, το ίζημα επαναιωρείται σε νέο θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα μεταφέρονται στη φλάσκα και επωάζονται ξανά στον κλίβανο. Η διαδικασία της θρυψινοποίησης είναι απαραίτητη προκειμένου να αποκτηθούν κύτταρα για επόμενα πειράματα ή σε περίπτωση που έχουν δημιουργηθεί συσσωματώματα.

3.7.4) Μέτρηση κυττάρων

Η ποσοτική εκτίμηση του κυτταρικού πληθυσμού γίνεται με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, δηλαδή μια ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα. Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση και στη συνέχεια 10 μ l από το κυτταρικό αιώρημα τοποθετούνται κάτω από την καλυπτρίδα. Η καταμέτρηση πραγματοποιείται στο οπτικό μικροσκόπιο ως εξής: καταγράφεται ο αριθμός κυττάρων σε τέσσερις προκαθορισμένες περιοχές – τεταρτημόρια (a–d), υπολογίζεται ο μέσος όρος $(a + b + c + d)/4$ και προκύπτει η συγκέντρωση κυττάρων ανά ml. Αξιοποιώντας τη συγκέντρωση των κυττάρων ανά ml, υπολογίζεται ο όγκος του θρεπτικού με τον κατάλληλο αριθμό κυττάρων ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Ο όγκος που απαιτείται μεταφέρεται σε νέο falcon και γίνεται φυγοκέντρηση από όπου το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό και διαχωρίζεται ισόποσα σε wells. Το plate μεταφέρεται στον επωαστικό κλίβανο, αφού ελεγχθεί στο μικροσκόπιο

3.7.5) Συγκομιδή κυττάρων (Cell harvesting)

Μετά την έκθεση των κυττάρων στις υπό δοκιμή ουσίες για τον προκαθορισμένο χρόνο, ακολουθεί η συλλογή τους για τα επόμενα στάδια του πειράματος. Αρχικά απομακρύνεται το καλλιεργητικό μέσο και πραγματοποιείται μία πλύση με PBS 1 $\times$. Στη συνέχεια, με τη χρήση cell scraper και με ήπιες κινήσεις σε όλη την επιφάνεια του well, τα κύτταρα αποκολλώνται και μεταφέρονται σε erpendorfs σε πάγο. Η διαδικασία πλύσης επαναλαμβάνεται ώστε να συλλεχθεί και το υπολειπόμενο κυτταρικό υλικό από το well. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε συνθήκες 2000 rpm για 5 λεπτά στους 4 °C και το ίζημα, που περιέχει τα κύτταρα διατηρείται στους –80 °C για μελλοντική χρήση.

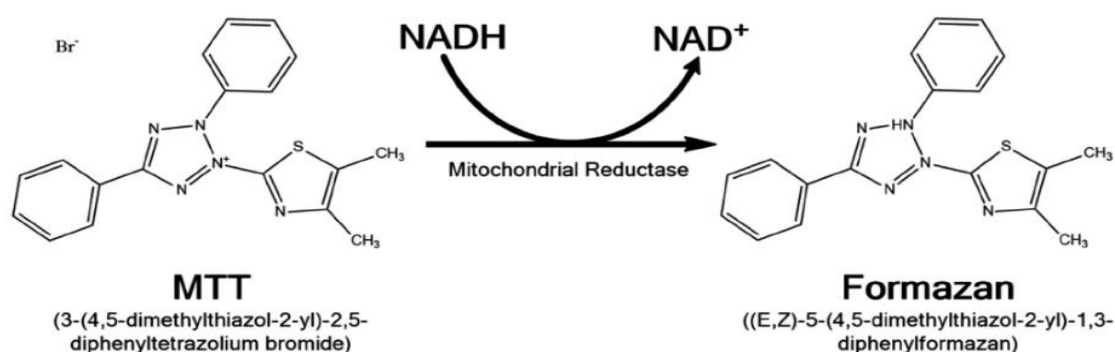
3.7.6) Λύση κυττάρων

Αρχικά, γίνεται λύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα (lysis buffer). Τα κύτταρα λύθηκαν με δύο διαφορετικά lysis buffer ανάλογα με το πείραμα που προοριζόταν, όπως θα δούμε στη συνέχεια. Η σύνθεση των lysis buffer φαίνονται στον Πίνακα 4. Σε κάθε erpendorf με το ίζημα των κυττάρων προστέθηκαν 500 μ l σε αυτά με το lysis buffer(1) και 20 μ l σε αυτά με το lysis buffer(2), ακολούθησε καλή διαλυτοποίηση και επώαση για 15 με 20 λεπτά για να δράσει το lysis buffer. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε κατεργασία υπερήχων (sonication) για περαιτέρω αποδιοργάνωση των κυτταρικών δομών και κατακερματισμό του DNA. Οι παράμετροι διαφέρουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος και σε αυτό το πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν παλμοί διάρκειας 1 second για 2 με 3 επαναλήψεις, στο 35 % amplitude, με 1 cycle και διάστημα 30 s μεταξύ των επαναλήψεων.

3.8) Κυτταρικές μελέτες

3.8.1) Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT

Η μέθοδος MTT (3-(4,5-dimethylimidazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) είναι χρωματομετρική δοκιμασία μεταβολικής δραστηριότητας (όχι άμεσα «ζωτικότητα» ή «κυτταροτοξικότητα»), που συσχετίζεται με τον αριθμό μεταβολικά ενεργών κυττάρων. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο τετραζολικό άλας MTT (κίτρινο), το οποίο ανάγεται από NAD(P)H-εξαρτώμενες οξειδοαναγωγάσες (κυρίως μιτοχονδριακές, αλλά και κυτταροπλασματικές) σε αδιάλυτους κρυστάλλους φορμαζάνης (μωβ).



Εικόνα 17. Αναγωγή του MTT σε φορμαζάνη από το NADH ($\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$) (Kamiloglu S. et al., 2020)

Οι κρύσταλλοι διαλύονται με ισοπροπανόλη και η οπτική πυκνότητα μετρείται συνήθως στα 570 nm με αναφορά στα 690 nm και η οπτική πυκνότητα είναι ανάλογη της ποσότητας των μεταβολικά ενεργών κυττάρων στην καλλιέργεια. Στο εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο γίνεται στρώσιμο των κυττάρων (10.000 με 15.000 ανά well) σε plate 96 θέσεων. Τα κύτταρα βρίσκονται σε θρεπτικό μέσο DMEM high glucose 25 mM , με 1 % L-glutamine, 1 % penicillin–streptomycin (Pen/Strep) και 10 % FBS. Το επόμενο βήμα αποτελεί η απομάκρυνση του DMEM και η προσθήκη των επιθυμητών ουσιών με τις συγκεντρώσεις που φαίνονται στο παρακάτω πίνακα.

Ουσίες	Συγκεντρώσεις
Caffeine	400 μM , 1 mM, 2 mM,
7-O-methylmangiferin (7OMF)	50 μM , 100 μM , 500 μM

Πίνακας 6. Δοσολογίες καφεΐνης και 7OMF για τη μέθοδο MTT.

Οι ουσίες προστέθηκαν σε DMEM high glucose με 5 % FBS, 1 % L-glutamine, 1 % penicillin–streptomycin (Pen/Strep) και έγινε επώαση για 6 ώρες. Στη συνέχεια, γίνεται απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται διάλυμα MTT 0,5 mg/ml, το οποίο έχει προστεθεί στο ίδιο DMEM και το plate επωάζεται για 3 ώρες στον επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 37°C με

5 % CO₂. Κατόπιν, αφαιρείται το αντιδραστήριο MTT, προστίθεται ισοπροπανόλη για την πλήρη διαλυτοποίηση της φορμαζάνης και πραγματοποιείται η φωτομέτρηση σε plate reader.

3.9) Αναλυτικές τεχνικές

3.9.1) Χρωματομετρικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford αποτελεί ταχεία και οικονομική χρωματομετρική προσέγγιση για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης σε βιολογικά δείγματα. Βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 σε πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον, με κύρια συνεισφορά από κατάλοιπα βασικών αμινοξέων (ιδίως αργινίνης) και υδρόφοβες/ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η δέσμευση μετατοπίζει την ισορροπία της χρωστικής προς την μπλε ανιονική μορφή, με μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm και η μετρούμενη οπτική πυκνότητα σε αυτό το μήκος κύματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Για τη βαθμονόμηση κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη με διαλύματα αλβουμίνης ορού βοός (BSA) γνωστής συγκέντρωσης. Η καμπύλη προκύπτει από τις μετρήσεις απορρόφησης στα 595 nm και προσεγγίζεται γραμμικά ως $y = a x + b$, όπου y η τιμή της φωτομέτρησης και x η ποσότητα πρωτεΐνης στο δείγμα. Σε αυτό το πειραματικό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση: $y = 0,0345x + 0,010$.

3.9.2) Προετοιμασία δειγμάτων για SDS-PAGE, για κινητική μελέτη με αναστολείς και για το Glucose-Glo Assay

Για τον σκοπό των πειραμάτων, κύτταρα της ανθρώπινης ηπατικής σειράς HepG2 καλλιεργήθηκαν σε DMEM high glucose (25 mM) συμπληρωμένο με 10 % FBS, 1 % L-glutamine και 1 % Pen/Strep, σε τρυβλία καλλιέργειας 60 mm × 15 mm, με αρχική πυκνότητα σποράς $1,75 \times 10^6$ κύτταρα/τρυβλίο, και επώαστηκαν σε 37 °C, 5 % CO₂. Την επόμενη ημέρα αφαιρέθηκε το μέσο και προστέθηκε DMEM w/o glucose και FBS συμπληρωμένο με 1 % L-glutamine και 1 % Pen/Strep. Σε όλα τα δείγματα, εκτός των control, το θρεπτικό μέσο περιείχε δεξαμεθαζόνη 10 nM και ινσουλίνη 100 nM και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες. Η ινσουλίνη προστίθεται για να επάγει τη σύνθεση του γλυκογόνου, ενώ η δεξαμεθαζόνη για να συγχρονίσει τα κύτταρα στο ίδιο στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Στη συνέχεια, το μέσο αντικαταστάθηκε με DMEM w/o phenol red, FBS, γλυκόζη και L-glutamine με μόνο 1 % Pen/Strep, στο οποίο προστέθηκαν γλυκαγόνη 100 nM, η οποία ενεργοποιεί τη γλυκογονόλυση και οι αντίστοιχοι ουσίες ανά ομάδα: caffeine 400 μM στο δείγμα caffeine, 7OMF 100 μM στο δείγμα 7OMF, που ήταν διαλυμένη σε 100 % DMSO, ίδιες ποσότητες caffeine και 7OMF στο δείγμα 7OMF + caffeine όπως και DMSO 0,2 % v/v στο δείγμα με DMSO. Για τα δείγματα που προορίζονταν για SDS-PAGE πραγματοποιήθηκε συλλογή μετά από 6 ώρες, ενώ για τον ενζυμικό προσδιορισμό μετά από 3 ώρες, σύμφωνα με τη διαδικασία που έχει περιγραφεί παραπάνω και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C. Η λύση των κυττάρων έγινε με προσθήκη 20 μl lysis buffer (2) για τα δείγματα της SDS-PAGE και με την προσθήκη 500 μl lysis buffer (1) για τα δείγματα του ενζυμικού προσδιορισμού. Τα lysis buffer αναγράφονται στο Πίνακα 4. Μετά την λύση των κυττάρων εφαρμόστηκε κατεργασία

υπερήχων (sonication) για περαιτέρω αποδιοργάνωση των κυτταρικών δομών και κατακερματισμό του DNA. Οι παράμετροι για την ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot που εφαρμόστηκαν ήταν παλμοί διάρκειας 1 second για 2 με 3 επαναλήψεις, στο 35 % amplitude, με 1 cycle και διάστημα 30 s μεταξύ των επαναλήψεων, ενώ για την κινητική μελέτη ήταν οι ίδιες παράμετροι με την διαφορά ότι το amplitude ήταν στο 40%. Η ολική πρωτεΐνη ποσοτικοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford.

Μελέτη	Δείγματα
Western Blot – Lysis Buffer (2)	1) Control, 2) Caffeine 400 μ M, 3) 7OMF 100 μ M, 4) 7OMF 100 μ M + Caffeine 400 μ M, 5) Glucagon 100 nM, 6) Dexamethasone 10 nM + Insulin 100 nM, 7) DMSO 0,2 % v/v
Κινητική μελέτη – Lysis Buffer (1)	1) Control, 2) 7OMF 100 μ M, 3) Caffeine 400 μ M, 4) 7OMF 100 μ M + Caffeine 400 μ M, 5) DMSO 0,2 % v/v
Glucose - Glo Assay (kit Promega)	1) Glucagon 100 nM, 2) DMSO 0,2 % v/v, 3) Caffeine 400 μ M, 4) 7OMF 100 μ M, 5) Caffeine 400 μ M + 7OMF 100 μ M,

Πίνακας 7. Σύνοψη συνθηκών: δείγματα ανά μελέτη και συγκεντρώσεις.

3.9.3) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS–PAGE) αποτελεί καθιερωμένη μέθοδο διαχωρισμού πρωτεϊνών με κύριο κριτήριο το μοριακό βάρος υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Το SDS προσδένεται στις αποδιαταγμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες και τους προσδίδει υψηλό καθαρό αρνητικό φορτίο περίπου ανάλογο της μάζας, εξομοιώνοντας τον λόγο φορτίου προς μάζα μεταξύ διαφορετικών πρωτεϊνών. Υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, οι ανιονικές πλέον πρωτεΐνες μετακινούνται από την κάθοδο (–) προς την άνοδο (+). Τα δείγματα αρχικά φορτώνονται σε πηκτή χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (stacking gel), όπου «στοιβάζονται», και στη συνέχεια εισέρχονται στην πηκτή διαχωρισμού υψηλότερης περιεκτικότητας (separating gel), όπου ο διαχωρισμός πραγματοποιείται ανάλογα με το μέγεθος. Τα συστατικά των gel αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Gel	Σύνθεση
Separating gel	H ₂ O, 30 % acrylamide mix, 1,5 M Tris (pH 8,8), 10 % SDS, 10 % ammonium persulfate, TEMED
Stacking gel	H ₂ O, 30 % acrylamide mix, 1,0 M Tris (pH 6,8), 10 % SDS, 10 % ammonium persulfate, TEMED

Πίνακας 8. Συνθέσεις πηκτωμάτων SDS-PAGE: separating και stacking.

Τα δείγματα προετοιμάζονται σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer) που περιέχει SDS, Tris–HCl, γλυκερόλη, bromophenol blue, β-μερκαπτοαιθανόλη και H₂O και θερμαίνονται πριν από την εφαρμογή τους στις θέσεις της πηκτής στους 95 °C για 5 λεπτά. Έπειτα, τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε σταθερή τάση 90 V, με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος Running Buffer 1×. Στη συγκεκριμένη μελέτη φορτώθηκαν 7,5 μl από κάθε δείγμα. Μετά τον διαχωρισμό, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη για ανοσοαποτύπωση κατά Western blot. Η χρήση δεικτών μοριακού βάρους επιτρέπει την εκτίμηση του μεγέθους των ζωνών, ενώ η επιλογή του ποσοστού ακρυλαμιδίου (ή η χρήση βαθμιδωτών πηκτών) προσαρμόζεται στο εύρος μοριακών βαρών που εξετάζεται. Η μέθοδος δεν διατηρεί τη βιολογική δραστηριότητα των πρωτεϊνών, αλλά παρέχει υψηλής ανάλυσης διαχωρισμό για σκοπούς ταυτοποίησης και ποιοτικού ελέγχου.

3.9.4) Ανοσοαπότυπωση πρωτεϊνών (Western Blot)

Το Western blot (ανοσοαποτύπωση) είναι μέθοδος ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσα σε σύνθετα βιολογικά δείγματα. Μετά τον διαχωρισμό με SDS–PAGE, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου εξισορροπείται για 10 min σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) και στη συνέχεια συναρμολογείται η διάταξη «sandwich». Η διάταξη περιλαμβάνει με τη σειρά : σφουγγάρι – διηθητικό χαρτί (Whatman) – πήκτωμα – μεμβράνη νιτροκυτταρίνης – διηθητικό χαρτί – σφουγγάρι, με προσεκτική απομάκρυνση τυχόν φυσαλίδων. Η μεταφορά πραγματοποιείται σε σταθερό ρεύμα 0,35 A για 70 min στους 4 °C. Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα TBST 1×.

3.9.4.1) Αποκλεισμός μη ειδικής πρόσδεσης (Blocking)

Μετά την ηλεκτρομεταφορά, η μεμβράνη υποβάλλεται σε αποκλεισμό (blocking) ώστε να καλυφθούν μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης και να μειωθεί το υπόβαθρο. Χρησιμοποιείται TBST 1× με 5 % αποβουτυρωμένο γάλα (non-fat dry milk), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη ξεπλένεται σύντομα με TBST και προχωρά η επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα.

3.9.4.2) Ανίχνευση πρωτεϊνών με αντισώματα

Η μεμβράνη επωάζεται με πρωτοταγές αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση, προετοιμασμένο σε TBST 1× με 2 % (w/v) άπαχο αποβουτυρωμένο γάλα για 16 με 18 ώρες στους 4 °C υπό ήπια ανάδευση. Κατόπιν, γίνονται πέντε διαδοχικές πλύσεις με διάρκεια 5 λεπτά σε TBST 1×, ώστε να απομακρυνθεί μη ειδικά προσδεμένο αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση με δευτεροταγές αντίσωμα, που έχει αραιωθεί με αναλογία 1:2000 σε TBST 1×, με 2 % w/v άπαχο γάλα, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ήπια ανάδευση. Τέλος, γίνεται πλύση της μεμβράνης τρεις φορές επί 5 λεπτά με TBST 1× για να αφαιρεθεί το δευτερογενές αντίσωμα που δεν προσδέθηκε.

3.9.4.3) Απεικόνιση σήματος

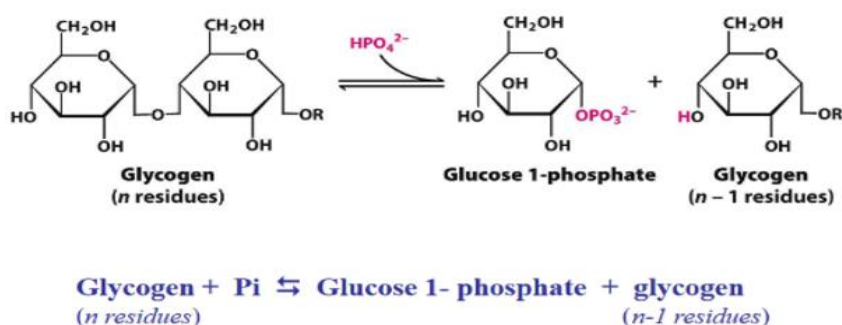
Η οπτικοποίηση βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Το δευτεροταγές αντίσωμα είναι συζευγμένο με την υπεροξειδάση (horseradish peroxidase-HRP) και μετά την προσθήκη του υποστρώματος ECL, παράγεται φως από την αντίδραση ενζύμου με το υπόστρωμά του. Πραγματοποιείται 3 λεπτά επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως, η μεμβράνη μεταφέρεται σε κασετίνα έκθεσης σε σκοτεινό θάλαμο, όπου εκτίθεται σε φωτοευαίσθητο φιλμ ακτινών X για την καταγραφή του σήματος. Το φιλμ αναπτύσσεται σε διάλυμα εμφάνισης (developer), ξεπλένεται με νερό και μονιμοποιείται σε διάλυμα μοιμοποίησης (fixer).

3.9.4.4) Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων από την διαδικασία Western Blot έγινε με την χρήση των προγραμμάτων ImageJ και Microsoft Office Excel. Τα αρχεία εικόνας εισήχθησαν στο ImageJ, έγινε αφαίρεση υποβάθρου, οριοθετήθηκαν οι περιοχές ενδιαφέροντος για κάθε ζώνη και υπολογίστηκε η ολοκληρωμένη οπτική πυκνότητα. Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν ως προς την πρωτεΐνη αναφοράς α-tubulin και συγκρίθηκαν με το αντίστοιχο control. Ορίζεται σαν 1 η ένταση των ζωνών των επιπέδων των τριών πρωτεϊνών ως προς την αντίστοιχη ένταση των επιπέδων της α-tubulin στο ανάλογο control. Επιπλέον, η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την κινητική μελέτη, το Glucose-Glo Assay και το MTT έγινε με την χρήση του προγράμματος IBM SPSS Statistics. Για τη σύγκριση των ομάδων εφαρμόστηκε μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA). Οι πολλαπλές συγκρίσεις έναντι της ομάδας ελέγχου έγιναν με το τεστ Dunnett (2-sided). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $p\text{-value} = 0,05$.

3.9.5) Κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου σε εκχυλίσματα HepG2

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου συμμετέχει σε αντιστρεπτή αντίδραση στο μονοπάτι της γλυκογονόλυσης. Στην παρούσα κινητική προσέγγιση εξετάζεται η φορά προς την παραγωγή γλυκογόνου, η οποία αφορά την προσθήκη της 1-φωσφορικής γλυκόζης (G1P) στο πολυμερές, με ταυτόχρονη απελευθέρωση ανόργανου φωσφόρου (Pi), το οποίο ποσοτικοποιείται φασματοφωτομετρικά μέσω του συστήματος ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου.



Εικόνα 18. Η αμφίδρομη αντίδραση που συμμετέχει η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (Fo C.et al.,2021).

Τα δείγματα των ομάδων που αναφέρθηκαν στον Πίνακα 7 λύθηκαν με 500 μl από το lysis buffer(1) και ακολούθησε φυγοκέντρωση σε συνθήκες 13.000 rpm, 4 °C, για 15 λεπτά, όπου το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ενζύμου για το πείραμα. Για την εκτέλεση της δοκιμής, το κυτταρικό εκχύλισμα αναμιγνύεται με γλυκογόνο 1 % w/v και επωάζεται για 15 λεπτά στους 30 °C σε υδατόλουτρο. Κατόπιν, κατάλληλος όγκος (100 ή 170 μl) μεταφέρεται σε διάλυμα υποστρώματος που περιέχει G1P 30 mM. Η αντίδραση παρακολουθείται με δειγματοληψίες 40 μl στους χρόνους 0, 10, 20, 30 και 40 λεπτά και κάθε δείγμα προστίθεται άμεσα σε 10 μl SDS 1 % w/v για την μετουσίωση του ενζύμου. Για την ανάπτυξη χρώματος, σε κάθε δείγμα που ολοκληρώνεται, προστίθενται 500 μl αντιδραστήριου. Πρόκειται για μίγμα διαλύματος ασκορβικού οξέος και μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1:4 v/v. Σε pH περίπου 5 με Zn^{2+} , το ανόργανο φώσφορο σχηματίζει σύμπλοκο με το μολυβδαινικό, το οποίο μετά την αναγωγή από το ασκορβικό οξύ δίνει χρώμα με μέγιστη απορρόφηση περί τα 850 nm. Τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επιπλέον 15 λεπτά στους 30 °C πριν από τη μέτρηση στα 850 nm. Για την απομάκρυνση υποβάθρου αφαιρείται η συμβολή φωσφορικών που δεν παράγονται ενζυμικά. Παρασκευάζονται εις διπλούν και λαμβάνεται ο μέσος όρος των εξής δειγμάτων-μαρτύρων:

Μάρτυρας	Σύνθεση
H ₂ O	10 μL SDS 1 % w/v + 40 μL dH ₂ O
G1P	10 μL SDS 1 % w/v + 31,1 μL dH ₂ O + 8,9 μL G1P 30 mM
Φωσφορικών	10 μL SDS 1 % w/v + 30 μL dH ₂ O + 10 μL Pi 1 mM

Πίνακας 9. Μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν και τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών.

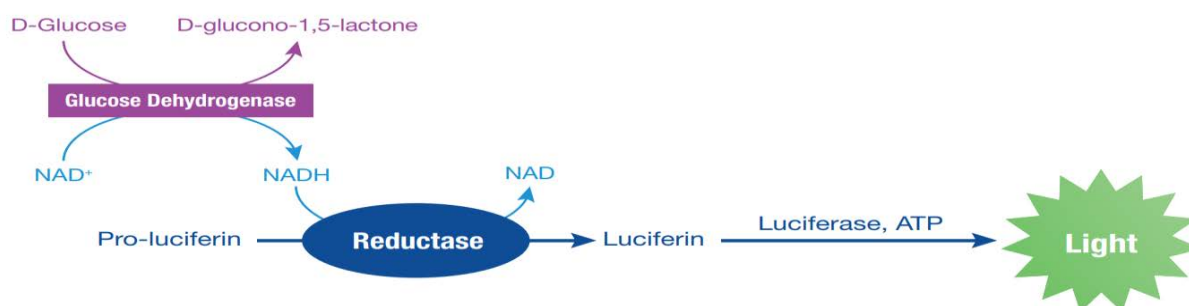
3.9.5.1) Στατιστική και υπολογιστική επεξεργασία κινητικών μετρήσεων

Για την επεξεργασία των δεδομένων από τις κινητικές ενζυμικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε το GraFit 6.0 με εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης. Για τις παραμέτρους κλιμάκωσης των σημάτων χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής f , ο οποίος, σύμφωνα με το πρωτόκολλο, προκύπτει από το γινόμενο του παραμέτρου $limit$ με τον όγκο δοκιμασίας (assay volume) και τη συγκέντρωση του ενζύμου C στο μίγμα αντίδρασης (δηλαδή $f = limit \times assay\ volume \times C$). Η παράμετρος $limit$ υπολογίζεται από τη σχέση: $limit = 0,78 \times [G1P] \times assay\ volume$, όπου 0,78 αντιστοιχεί στο 78 % της G1P που καταναλώνεται προς παραγωγή ορθοφωσφορικών όταν η αντίδραση φτάσει σε ισορροπία, $[G1P]$ είναι η συγκέντρωση της G1P στο σύστημα και assay volume ο όγκος που λαμβάνεται για τον τερματισμό της αντίδρασης. Με τον τρόπο αυτό, κανονικοποιούνται οι ταχύτητες ως προς τις συνθήκες της δοκιμής.

3.9.6) Ποσοτικός προσδιορισμός γλυκόζης με το kit Glucose-Glo™ Assay (Promega)

Το Glucose-Glo™ Assay αποτελεί μια μέθοδο βιοφωταύγειας, όπου γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης, βασισμένος σε συζευγμένες ενζυμικές αντιδράσεις. Η αφυδρογονάση της γλυκόζης καταλύει την οξείδωση της με ταυτόχρονη αναγωγή του NAD^+ σε $NADH$. Το $NADH$ ενεργοποιεί τη μετατροπή του πρόδρομου υποστρώματος λουσιφερίνης σε

λουσιφερίνη και μέσω της λουσιφεράσης, παράγεται σταθερού τύπου βιοφωταύγεια, της οποίας η ένταση είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης γλυκόζης στο δείγμα.



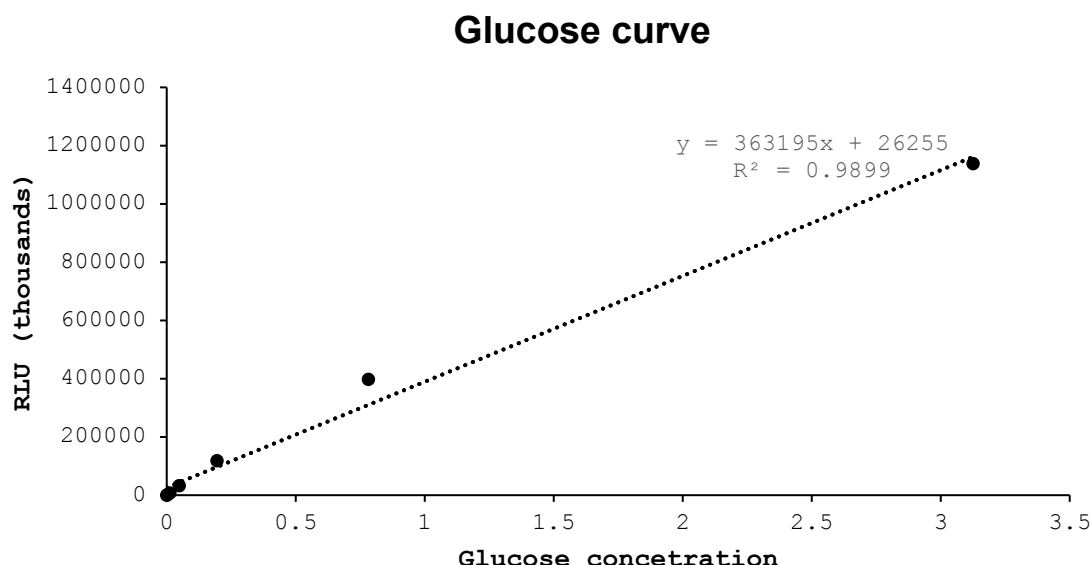
Εικόνα 19. Ενζυμική ανίχνευση γλυκόζης μέσω βιοφωταύγειας.(Promega). Η D-γλυκόζη οξειδώνεται από την αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) σε D-γλυκονο-1,5-λακτόνη με ταυτόχρονη αναγωγή του $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$. Το NADH τροφοδοτεί μια NADH-εξαρτώμενη ρεδουκτάση, η οποία μετατρέπει τη προ-λουσιφερίνη σε λουσιφερίνη (οξειδώνοντας πάλι $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$). Τέλος, η λουσιφεράση, παρουσία ATP, καταλύει την οξείδωση της λουσιφερίνης παράγοντας φωταύγεια. Η ένταση του φωτός είναι ανάλογη της παραγόμενης ποσότητας NADH και, κατ' επέκταση, της συγκέντρωσης γλυκόζης στο δείγμα.

3.9.6.1) Δημιουργία καμπύλης αναφοράς γλυκόζης

Το πρώτο βήμα ήταν η κατασκευή καμπύλης αναφοράς γλυκόζης για τη μετατροπή του βιοφωταυγικού σήματος σε συγκέντρωση. Οι συγκεντρώσεις που παρείχε ο κατασκευαστής ήταν: 0, 0,0031, 0,0122, 0,0488, 0,1953, 0,7813, 3,125 μM . Η γλυκόζη περιλαμβανόταν στο kit και διαλύθηκε σε PBS. Από κάθε συγκέντρωση φορτώθηκαν 12,5 μl ανά well σε plate 384 θέσεων (Costar® #3570 384-well plates - white-walled), σε τέσσερις επαναλήψεις για αποφυγή σφάλματος και κατόπιν προστέθηκαν 12,5 μl από το αντιδραστήριο ανίχνευσης γλυκόζης, προετοιμασμένο σύμφωνα με τον πίνακα σύνθεσης, διατηρώντας αναλογία όγκων δείγματος: αντιδραστηρίου 1:1. Το plate ανακινήθηκε για 60 δευτερόλεπτα και επώαστηκε για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η φωταύγεια καταγράφηκε σε plate-reading luminometer. Οι τιμές υποβάθρου (αρνητικός μάρτυρας/blank) αφαιρέθηκαν πριν από την προσαρμογή της καμπύλης και τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων στα άγνωστα δείγματα.

Glucose Detection Reagent	Ανά αντίδραση (384-well)
Luciferin Detection Solution	12,5 μl
Reductase	62,5 nL (0,0625 μl)
Reductase Substrate	62,5 nL (0,0625 μl)
Glucose Dehydrogenase	0,5 μL
NAD	62,5 nL (0,0625 μL)

Πίνακας 10. Σύνθεση του Glucose Detection Reagent για plate 384 θέσεων.



Σχήμα 1. Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης με εξίσωση $y = 363195x + 26255$ και $R^2 = 0.9899$. Ο άξονας γ'γ αναπαριστά το αποτέλεσμα σε average relative light unit RLU (thousands), ενώ ο x'x αναπαριστά τις συγκεντρώσεις γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκαν σε μM . Οι συγκεντρώσεις ήταν: 0, 0,0031, 0,0122, 0,0488, 0,1953, 0,7813, 3,125 μM .

3.9.6.2) Προετοιμασία δειγμάτων για το Glucose-Glo™ Assay

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HepG2, με ίδιες συνθήκες καλλιέργειας και προσθήκης ουσιών όπως στα δείγματα για το Western blot στο υποκεφάλαιο 3.9.2. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον Πίνακα 7. Στα καθορισμένα χρονικά σημεία συλλέχθηκε μέρος από το υπερκείμενο κάθε δείγματος και αραιώθηκε σε PBS με αναλογία 2 μl σε 98 μl (τελικός όγκος 100 μl). Τα δείγματα είτε μπορούν να αποθηκευτούν στους $-20^{\circ}C$ μέχρι τη μέτρηση είτε μεταφέρονται άμεσα σε plate 384 θέσεων. Την ημέρα του πειράματος, διανεμήθηκαν 12,5 μl από κάθε δείγμα σε well και προστέθηκαν 12,5 μl από το Glucose Detection Reagent, όπως στην καμπύλη αναφοράς (αναλογία 1:1). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια που περιεγράφηκε παραπάνω.

3.10) Πρωτεωμική ανάλυση με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/MS)

Η LC-MS αποτελεί συνδυασμό διαχωρισμού υγρής χρωματογραφίας (HPLC/LC) και φασματομετρικής ανίχνευσης μάζας (MS), προσφέροντας ταυτόχρονα διαχωρισμό των συστατικών και αξιόπιστη ταυτοποίησή. Η LC απομονώνει τα συστατικά ενός δείγματος σε διακριτές κορυφές, ενώ η MS αποδίδει το αντίστοιχο φάσμα μάζας για κάθε κορυφή, επιτρέποντας αναγνώριση γνωστών/αγνώστων ενώσεων και διερεύνηση της δομής τους. Λόγω αυτής της συνεργιστικής δράσης, η LC-MS χρησιμοποιείται ευρέως για βασική έρευνα όπως και για μελέτες φαρμακοδυναμικής και για διάκριση επιλεγμένων ουσιών από πολύπλοκα δείγματα. Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση της γλυκαγόνης στα επίπεδα των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στα μονοπάτια μεταβολισμού του γλυκογόνου, όπως και να γίνει διάκριση μεταξύ συνθηκών νηστείας και σίτισης των κυττάρων.

3.10.1) Προετοιμασία δειγμάτων για LC-MS/MS

Για την πρωτεωμική ανάλυση καλλιιεργήθηκαν ηπατικά κύτταρα HepG2. Τα δείγματα υπήρχαν σε τρεις επαναλήψεις και ήταν τα εξής : Control (+) – συνθήκη κορεσμού, Control (-) – συνθήκη νηστείας και Glucagon 6 hours. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό DMEM 25mM high glucose, συμπληρωμένο με 10 % FBS, 1 % L-glutamine και 1 % Pen/Strep σε τρυβλία καλλιέργειας 100 mm × 20 mm και επωάστηκαν σε 37 °C, 5 % CO₂. Την επόμενη ημέρα αφαιρέθηκε το μέσο και προστέθηκε DMEM w/o glucose και FBS συμπληρωμένο με 1 % L-glutamine και 1 % Pen/Strep σε όλα τα δείγματα εκτός από το Control (+) το οποίο παρέμεινε με το DMEM high glucose. Στο δείγμα Glucagon 6 hours, το μέσο περιείχε δεξαμεθαζόνη 10 nM και ινσουλίνη 100 nM και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες. Στη συνέχεια, στο ίδιο δείγμα το μέσο αντικαταστάθηκε με DMEM w/o phenol red, FBS, γλυκόζη και L-glutamine με μόνο 1 % Pen/Strep, στο οποίο προστέθηκε γλυκαγόνη 100 nM και έγινε συλλογή μετά από 6 ώρες με το τρόπο που εξηγείται στο 3.7.5. Πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με το lysis buffer (3) που αναγράφεται στο Πίνακα 3 και sonication με παλμούς διάρκειας 1 second για 2 με 3 επαναλήψεις, στο 35 % amplitude, με 1 cycle και διάστημα 30 s μεταξύ των επαναλήψεων και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Τέλος, στάλθηκαν στο Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming", όπου έγινε και η πρωτεωμική ανάλυση φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS).

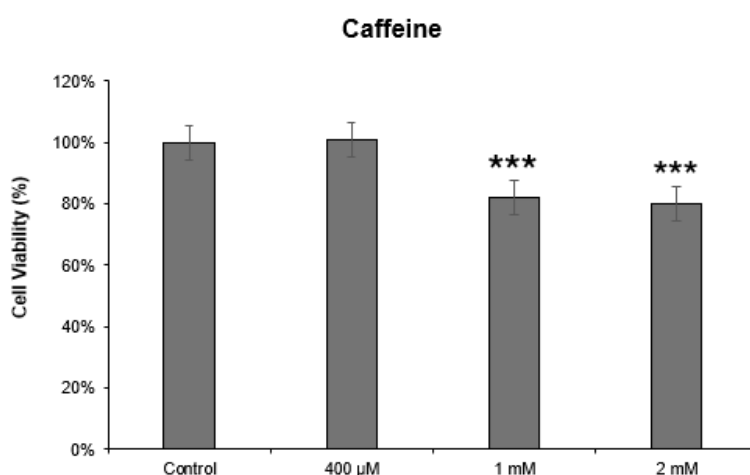
3.10.2) Ανάλυση και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε από το Biomedical Sciences Research Center "Alexander Fleming". Τα raw data αναλύθηκαν στο DIA-NN 2.2.0 (Data-Independent Acquisition by Neural Networks) μέσω αναζήτησης έναντι της βάσης αναφοράς Homo sapiens και της contaminant database του DIA-NN (σύνολο 20.747 πρωτεϊνών), σε library-free mode, επιτρέποντας έως δύο missed cleavages. Ως στρατηγική ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε το νέο QuantUMS (Quantification using an Uncertainty Minimizing Solution) σε high-precision mode, και το scoring ορίστηκε σε generic. Δημιουργήθηκε φασματική βιβλιοθήκη από τα DIA runs και χρησιμοποιήθηκε για εκ νέου ανάλυσή τους. Εφαρμόστηκαν οι προεπιλεγμένες ρυθμίσεις του DIA-NN με οξείδωση μεθειονίνης και ακετυλίωση N-τελικού άκρου πρωτεΐνης ως μεταβλητές τροποποιήσεις και καρβαμυδομεθυλίωση κυστεϊνών ως σταθερή τροποποίηση. Επίσης, ενεργοποιήθηκε η αφαίρεση N-τελικής μεθειονίνης. Η λειτουργία match-between-runs (MBR) χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αναλύσεις και τα αποτελέσματα (σε επίπεδο precursor και protein group) φιλτραρίστηκαν σε 1% FDR. Τα παραγόμενα αποτελέσματα υποβλήθηκαν σε στατιστική επεξεργασία και απεικόνιση στο Perseus (1.6.15.0). Οι ποσότητες QuantUMS/MaxLFQ σε επίπεδο protein group φορτώθηκαν και μετασχηματίστηκαν σε log₂, οι πρωτεΐνες με < 70 % έγκυρες τιμές σε τουλάχιστον μία ομάδα απομακρύνθηκαν. Τα εναπομείναντα missing values υποκαταστάθηκαν με τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις του Perseus, βάσει κανονικής κατανομής. Τα αποτελέσματα t-test απεικονίστηκαν ως volcano plot στο Perseus.

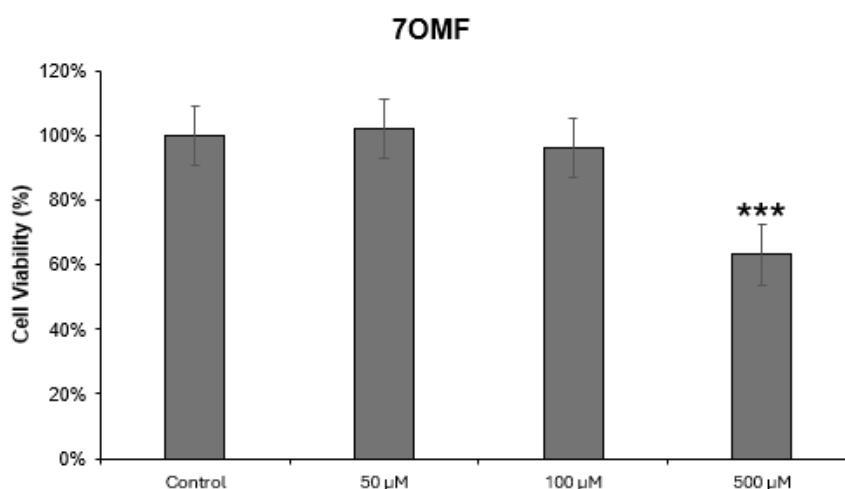
4) Αποτελέσματα

4.1) Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT

Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των ουσιών καφεΐνη και 7OMF σε κύτταρα HepG2, προκειμένου να προσδιοριστεί το εύρος των συγκεντρώσεων που δεν είναι τοξικές για την ανάπτυξη των κυττάρων με τη μέθοδο MTT. Ακολουθούν διαγράμματα, όπου παρουσιάζονται τα ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων στις διάφορες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Για την καφεΐνη οι συγκεντρώσεις ήταν 400 μ M, 1 mM, 2 mM και για την 7OMF ήταν 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M και η κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τεσσάρων επαναλήψεων.



Σχήμα 2. Ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας σε διάφορες συγκεντρώσεις καφεΐνης. Ο άξονας y'γ αναφέρεται στην επί τις % κυτταρική βιωσιμότητα, ενώ ο x'χ στην συγκέντρωση της καφεΐνης και στο μάρτυρα – control του πειράματος. Τα αποτελέσματα αναλύονται ως mean $\pm$ SD (n=4) με $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***.

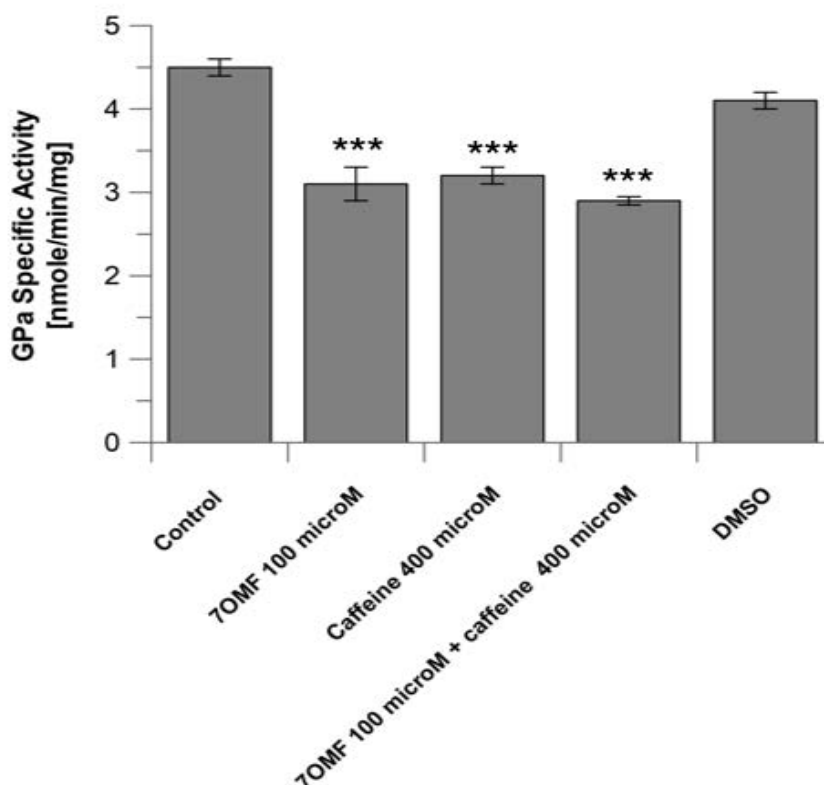


Σχήμα 3. Ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας σε διάφορες συγκεντρώσεις 7OMF. Ο άξονας y'γ αναφέρεται στην επί τις % κυτταρική βιωσιμότητα, ενώ ο x'χ στην συγκέντρωση της καφεΐνης και στο μάρτυρα – control του πειράματος. Τα αποτελέσματα αναλύονται ως mean $\pm$ SD (n=4) με $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***.

Η ανάπτυξη των κυττάρων HepG2 έγινε σε plate 96 θέσεων και ακολούθησε επώαση με τις ουσίες για 6 ώρες στις συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν. Τα control επωάστηκαν με την αντίστοιχη ποσότητα με DMSO, καθώς η 7OMF ήταν διαλυμένη σε DMSO. Έγινε εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας και ανάλυση ως προς τις % βιωσιμότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν στην περίπτωση της καφεΐνης μείωση τις βιωσιμότητας κατά 20% από την συγκέντρωση 1 mM και μετά, ενώ στην 7OMF υπήρχε μείωση κατά 37% στην μεγαλύτερη συγκέντρωση στα 500 μ M. Έτσι, η συγκέντρωση 400 μ M της καφεΐνης και η συγκέντρωση 100 μ M για την 7OMF αποδείχθηκαν ασφαλείς για τη χρήση τους στα πειράματα που ακολουθούν.

4.2) Αναστολή της γλυκογονόλυσης από την καφεΐνη και την 7OMF σε κύτταρα HepG2

Στο πρώτο μέρος, εξετάστηκε η αναστολή της γλυκογονόλυσης από την καφεΐνη και τη mangiferin. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε το κατά πόσο το ανάλογο της mangiferin, το 7OMF, αναστέλλει το μονοπάτι της γλυκογονόλυσης σε ex vivo κύτταρα HepG2 σε σύγκριση με την καφεΐνη που είναι γνωστός αναστολέας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και της γλυκογονόλυσης. Οι συγκεντρώσεις που προστέθηκαν στα δείγματα ήταν 400 μ M για την καφεΐνη και 100 μ M για την 7OMF με βάση το πείραμα με τη μέθοδο MTT. Το DMSO χρησιμοποιείται ως control για την 7OMF. Τα βήματα του πρωτοκόλλου και ο χειρισμός για την καλλιέργεια των κυττάρων HepG2 αναφέρονται παραπάνω στο 3.8.4. Δείγμα λήφθηκε τις χρονικές στιγμές των 0, 10 λεπτών, 20 λεπτών, 30 λεπτών και των 40 λεπτών και έγιναν 3 επαναλήψεις. Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης των ουσιών.

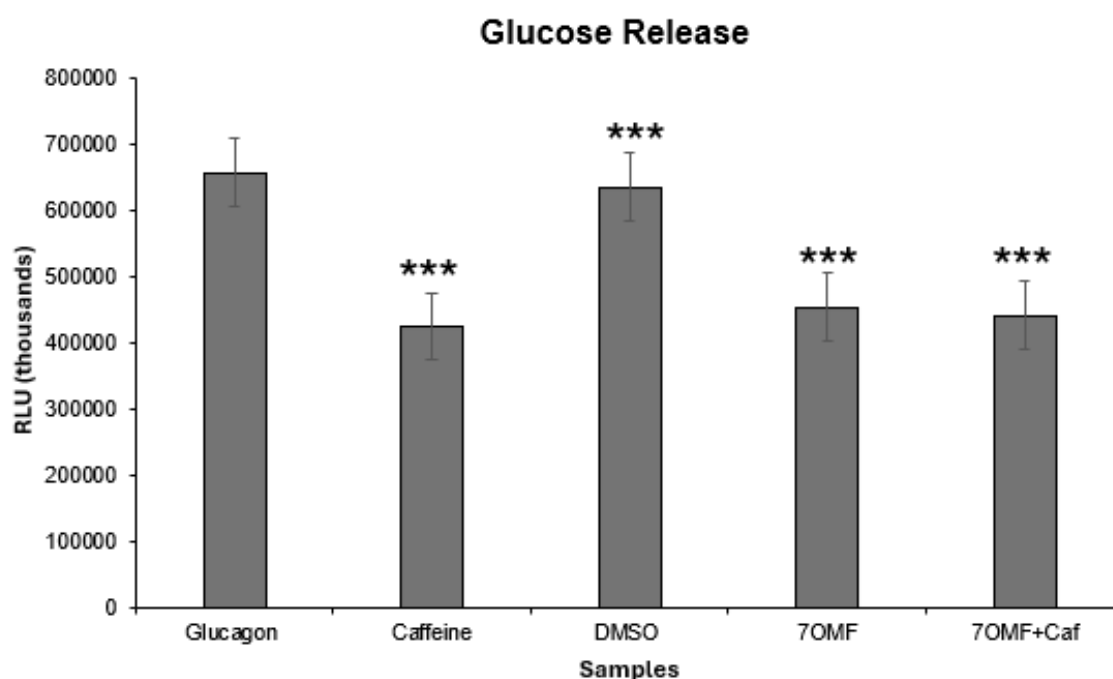


Σχήμα 4. Διάγραμμα για την ειδική ενζυμική δραστηριότητα της GP σε αντιδράσεις παρουσία των ουσιών Caffeine, 7OMF και στο συνδυασμό τους καθώς και σε συνθήκες Control και DMSO. Η δραστηριότητα της GP εκφράζεται ως

nmol / min / mg πρωτεΐνης και υπολογίζεται χρησιμοποιώντας 5 χρονικά σημεία και σφάλματα (απεικονίζονται στις ράβδους). Τα αποτελέσματα αναλύονται ως mean $\pm$ SD (n=4) με $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***.

Τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης δείχνουν πως υπήρξε αναστολή τόσο παρουσία της 7OMF όσο και παρουσία της καφεΐνης (το οποίο ήταν γνωστό και ανταποκρίνεται σε προηγούμενα αποτελέσματα από την βιβλιογραφία). Τα ποσοστά αναστολής για τις ουσίες ήταν περίπου 24% στο δείγμα με 7OMF και συγκέντρωση 100 μ M, 28% στο δείγμα με καφεΐνη συγκέντρωσης 400 μ M και περίπου 29% στο δείγμα με το συνδυασμό 7OMF και καφεΐνης. Η αναστολή είναι παρόμοια σε ποσοστό και στις δυο περιπτώσεις, ενώ δεν υπήρξε μεγάλη διαφορά όταν συνδυάστηκαν και οι δύο ουσίες μαζί. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει πως δεν υπάρχει συνεργιστική σχέση μεταξύ τους. Επιπλέον, στη συνθήκη με DMSO δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά σε σχέση με το Control, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν επηρεάζει το αποτέλεσμα στην αναστολή που προκαλείται από την 7OMF.

Στο δεύτερο μέρος, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκόζης με τη χρήση του kit Glucose-Glo™ Assay της εταιρείας Promega. Τα δείγματα που πραγματοποιήθηκε η μέτρηση ήταν τα δείγματα Glucagon, 7OMF, Caffeine, 7OMF + Caffeine και DMSO και ο τρόπος ανάπτυξης και χειρισμού των κυττάρων επεξηγείται στο υποκεφάλαιο 3.9.6 όπως και το πειραματικό πρωτόκολλο. Για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη γλυκόζης από υποκεφάλαιο 3.9.6.1.



Σχήμα 5. Διάγραμμα όπου απεικονίζονται οι τιμές RLU (thousands) για την απελευθέρωση της γλυκόζης στον γ'γ και τα αντίστοιχα δείγματα του πειράματος στον x'x. Τα αποτελέσματα αναλύονται ως mean $\pm$ SD (n=3) με $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***. Οι συγκεντρώσεις γλυκόζης κυμαίνονται μεταξύ 0.7813 μ M και 3,125 μ M με βάση την καμπύλη αναφοράς.

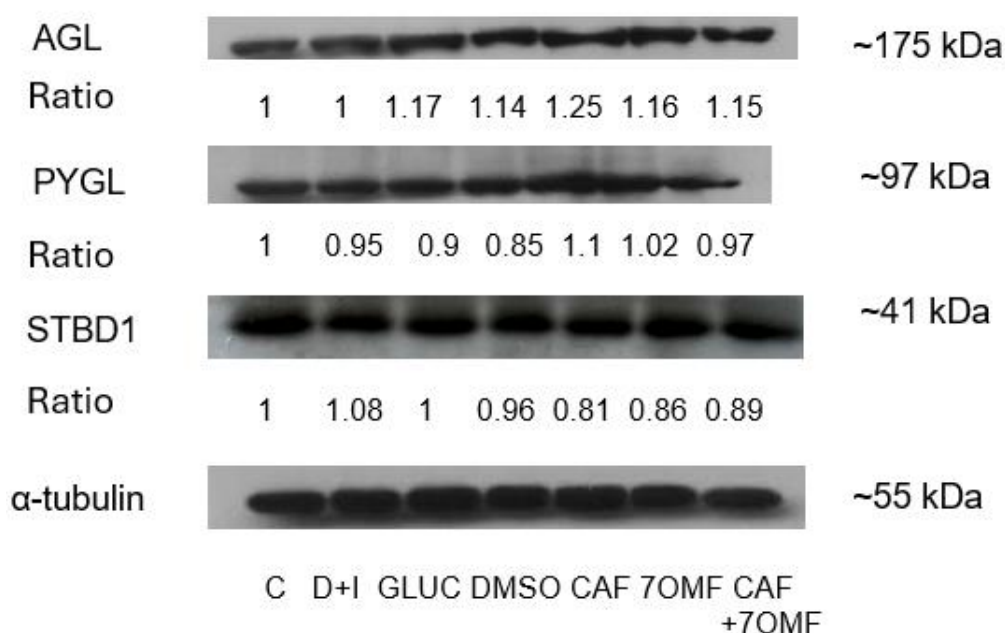
Με βάση τα αποτελέσματα όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 5, η προσθήκη της 7OMF παρουσιάζει μείωση της παραγωγής γλυκόζης κατά 31%, το οποίο είναι συγκρίσιμο και με την

μείωση της καφεΐνης κατά 35%. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο συνδυασμός καφεΐνης και 7OMF δεν προκαλεί περαιτέρω μείωση των επιπέδων απελευθέρωσης γλυκόζης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά της αναστολής της γλυκογονόλυσης και υποδηλώνουν ότι η 7OMF έχει σαφώς επίδραση στο μονοπάτι της γλυκογονόλυσης πάρα το γεγονός ότι δεν παρατηρείται συνέργεια σε σχέση με την καφεΐνη. Για την διεύρυνση του πιθανού μηχανισμού αναστολής είναι απαραίτητη η *in vitro* μελέτη ως προς ένζυμα της γλυκογονόλυσης.

4.3) Διερεύνηση της επίδρασης της καφεΐνης και της 7OMF στα πρωτεϊνικά επίπεδα των PYGL, STBD1 και AGL σε κύτταρα HepG2 με Western Blot

Επόμενος στόχος ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της καφεΐνης και της 7OMF στα επίπεδα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην γλυκογονόλυση (AGL, PYGL) και στην γλυκοφαγία (STBD1). Πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western blot, με σκοπό να ανιχνευθούν οι πιθανές μεταβολές.

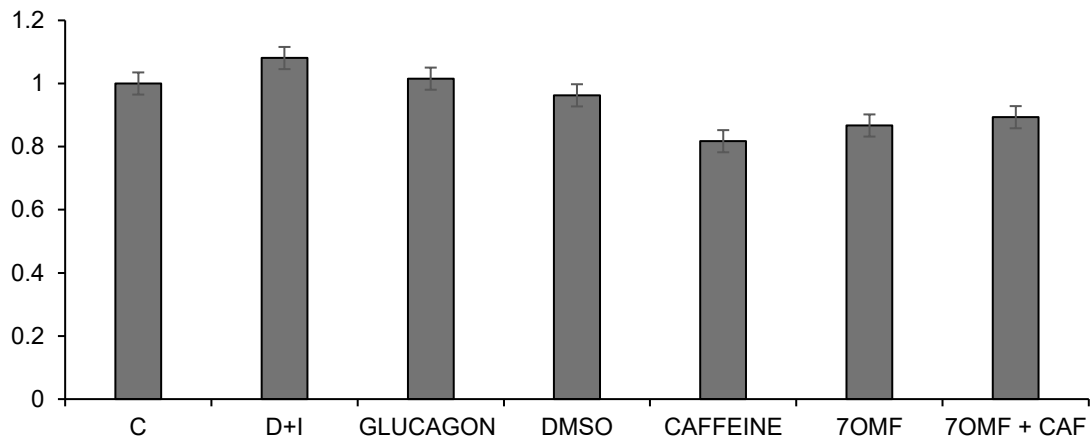
Αρχικά, παρουσιάζονται στην Εικόνα 20 τα αποτελέσματα από την ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot από την οποία προκύπτουν τα διαγράμματα που ακολουθούν.



Εικόνα 20. Επίδραση των ουσιών καφεΐνης και 7OMF στα πρωτεϊνικά επίπεδα των STBD1, AGL, PYGL με την μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western blot. Οι λόγοι για το ratio προκύπτουν μετά την κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των τριών πρωτεϊνών ως προς την ένταση των ζωνών της α -tubulin μέσω του προγράμματος Image J και συγκρίνονται ως προς την αντίστοιχη ένταση των επιπέδων της α -tubulin στο control. Ορίζεται 1 η ένταση των ζωνών των επιπέδων των τριών πρωτεϊνών ως προς την αντίστοιχη ένταση των επιπέδων της α -tubulin στο control.

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 6, τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της STBD1 δεν επηρεάζονται σημαντικά από τις ορμόνες και τις ουσίες με τις οποίες επώαστηκαν τα δείγματα στις συγκεντρώσεις και στις ώρες επώασης που μελετάμε.

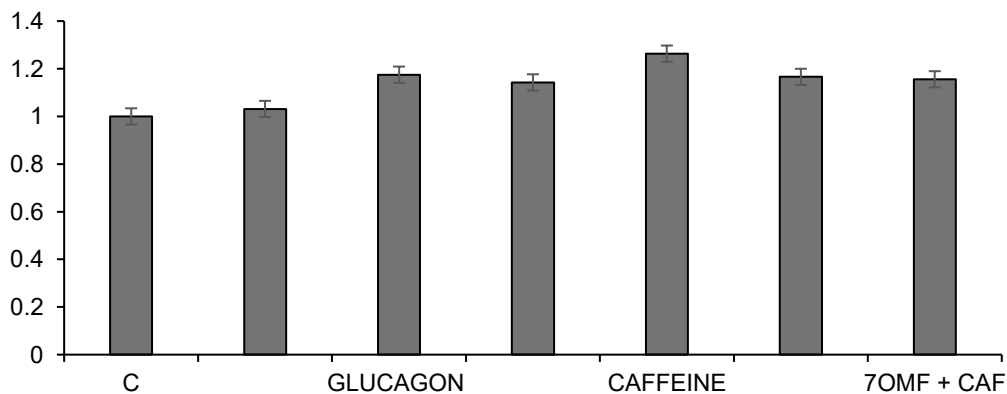
STBD1



Σχήμα 6. Επίδραση των ουσιών καφεΐνης και 7OMF στα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της STBD1 παρουσία ορμονών γλυκαγόνης και ινσουλίνης με τη μέθοδο ανοσοποτύπωσης κατά Western blot. Τα δείγματα είναι: Control, D+I : επώαση με δεξαμεθαζόνη και ινσουλίνη για 16 ώρες, Glucagon: επώαση με γλυκαγόνη για 6 ώρες, DMSO: control για 7OMF, Caffeine: επώαση με καφεΐνη και γλυκαγόνη για 6 ώρες, 7OMF: επώαση με 7OMF και γλυκαγόνη για 6 ώρες, 7OMF + Caffeine : επώαση με καφεΐνη, 7OMF και γλυκαγόνη για 6 ώρες. Έγινε κανονικοποίηση της πυκνότητας των ζωνών της STBD1 ως προς την ένταση των ζωνών της α -tubulin μέσω του Microsoft Excel και ορίστηκε σαν 1 η ένταση των ζωνών της STBD1 ως προς την ανάλογη ένταση των επιπέδων της α -tubulin στο αντίστοιχο control.

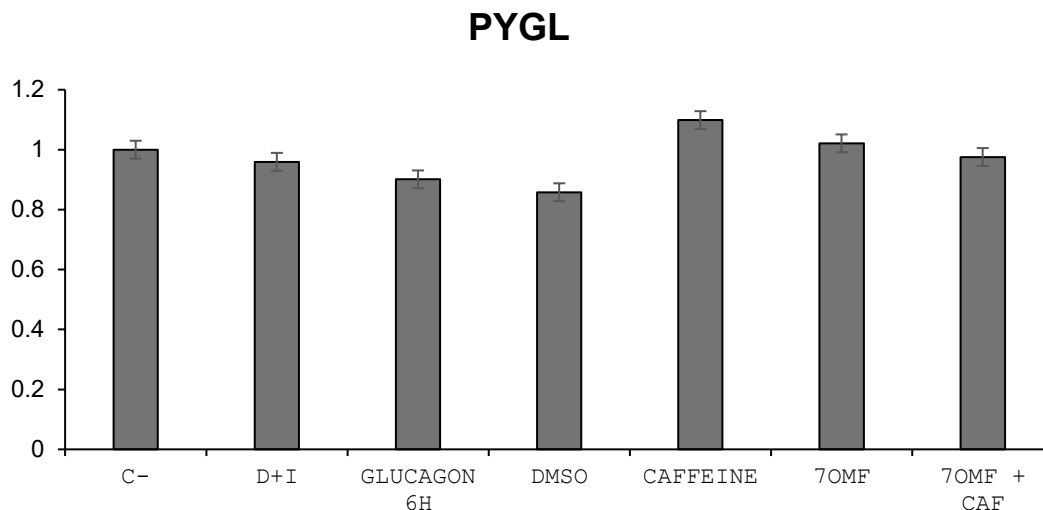
Όσον αφορά τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της AGL συνολικά δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική αλλαγή, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7. Υπάρχει μια μικρή αύξηση παρουσία γλυκαγόνης και καφεΐνης κατά 15%, όμως αυτό πρέπει να μελετηθεί διεξοδικά ξανά για να διαπιστωθεί η συσχέτιση.

AGL



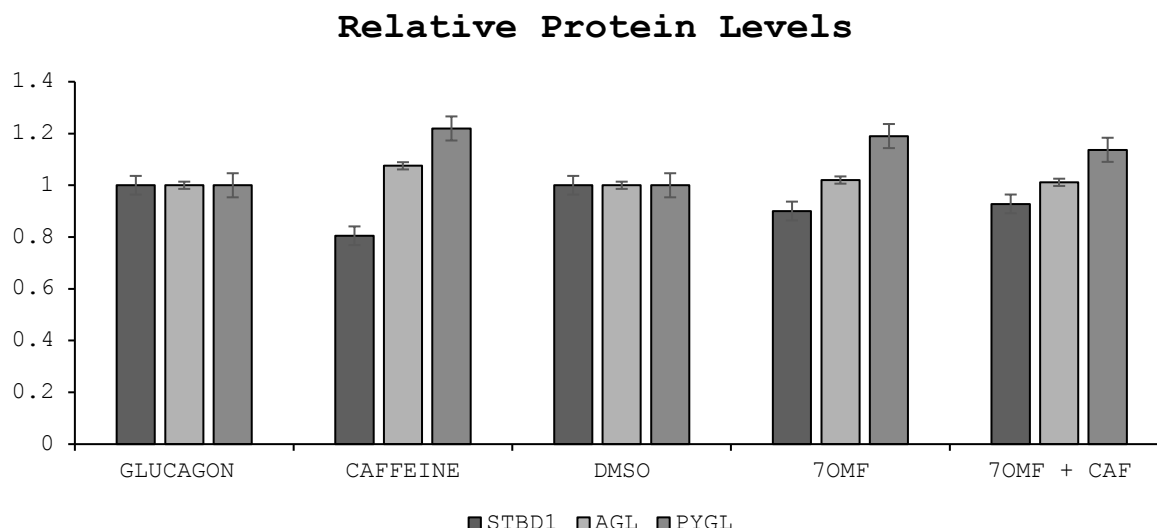
Σχήμα 7. Επίδραση των ουσιών καφεΐνης και 7OMF στα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της AGL παρουσία ορμονών γλυκαγόνης και ινσουλίνης με τη μέθοδο ανοσοποτύπωσης κατά Western blot. Τα δείγματα είναι: Control, D+I : επώαση με δεξαμεθαζόνη και ινσουλίνη για 16 ώρες, Glucagon: επώαση με γλυκαγόνη για 6 ώρες, DMSO: control για 7OMF, Caffeine: επώαση με καφεΐνη και γλυκαγόνη για 6 ώρες, 7OMF: επώαση με 7OMF και γλυκαγόνη για 6 ώρες, 7OMF + Caffeine : επώαση με καφεΐνη, 7OMF και γλυκαγόνη για 6 ώρες. Έγινε κανονικοποίηση της πυκνότητας των ζωνών της AGL ως προς την ένταση των ζωνών της α -tubulin μέσω του Microsoft Excel και ορίστηκε σαν 1 η ένταση των ζωνών της AGL ως προς την ανάλογη ένταση των επιπέδων της α -tubulin στο αντίστοιχο control.

Στα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της PYGL φαίνεται μια ήπια αύξηση κατά 10% παρουσία καφεΐνης, ενώ δεν παρουσιάζεται κάποια άλλη σημαντική μεταβολή παρουσία των ορμονών γλυκαγόνη και ινσουλίνη ή παρουσία της 7OMF. Αυτό βέβαια είναι απαραίτητο να μελετηθεί ξανά μελλοντικά χρησιμοποιώντας και άλλες συνθήκες όπως και άλλες ώρες.



Σχήμα 8. Επίδραση των ουσιών καφεΐνης και 7OMF στα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της PYGL παρουσία ορμονών γλυκαγόνης και ινσουλίνης με τη μέθοδο ανοσοποτύπωσης κατά Western blot. Τα δείγματα είναι: Control, D+I : επώαση με δεξαμεθαζόνη και ινσουλίνη για 16 ώρες, Glucagon: επώαση με γλυκαγόνη για 6 ώρες, DMSO: control για 7OMF, Caffeine: επώαση με καφεΐνη και γλυκαγόνη για 6 ώρες, 7OMF: επώαση με 7OMF και γλυκαγόνη για 6 ώρες, 7OMF + Caffeine : επώαση με καφεΐνη, 7OMF και γλυκαγόνη για 6 ώρες. Έγινε κανονικοποίηση της πυκνότητας των ζωνών της PYGL ως προς την ένταση των ζωνών της α -tubulin μέσω του Microsoft Excel και ορίστηκε σαν 1 η ένταση των ζωνών της PYGL ως προς την ανάλογη ένταση των επιπέδων της α -tubulin στο αντίστοιχο control.

Στο επόμενο διάγραμμα πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων των σχετικών πρωτεϊνικών επιπέδων των STBD1, PYGL και AGL ανάμεσα στα δείγματα που έχει γίνει επώαση των κυττάρων με τη γλυκαγόνη και σε αυτά που έχουν προστεθεί οι υπό μελέτη ουσίες. Το control για την καφεΐνη είναι το Glucagon, ενώ για την 7OMF είναι το DMSO, καθώς η 7OMF είναι διαλυμένη σε DMSO. Τα επίπεδα της PYGL φαίνεται ότι αυξάνονται κατά 20% παρουσία καφεΐνης και κατά 18% παρουσία 7OMF. Στις υπόλοιπες πρωτεΐνες δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές. Γενικά, οι μεταβολές είναι μικρές στα όρια του στατιστικού σφάλματος και είναι σημαντικό να μελετηθεί περαιτέρω μια πιθανή συσχέτιση.



Σχήμα 9. Επίδραση των ουσιών καφεΐνης και 7OMF στα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα των STBD1, AGL, PYGL με την μέθοδο ανοσοτύπωσης κατά Western blot. Τα δείγματα είναι: Glucagon: επώαση με γλυκαγόνη για 6 ώρες, DMSO: control για 7OMF, Caffeine: επώαση με καφεΐνη και γλυκαγόνη για 6 ώρες, 7OMF: επώαση με 7OMF και γλυκαγόνη για 6 ώρες, 7OMF + Caffeine : επώαση με καφεΐνη, 7OMF και γλυκαγόνη για 6 ώρες. Η πυκνότητα των ζωνών των STBD1, AGL και PYGL κανονικοποιήθηκε ως προς την ένταση των ζωνών της α -tubulin μέσω του προγράμματος Microsoft Excel. Ως 1 ορίζεται η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων των STBD1, AGL, PYGL ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της α -tubulin στο δείγμα glucagon για να γίνει σύγκριση με το δείγμα με caffeine. Αντίθετα, ορίζεται ως 1 η ένταση των ζωνών των πρωτεϊνικών επιπέδων των STBD1, AGL, PYGL ως προς την αντίστοιχη ένταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της α -tubulin στο δείγμα DMSO για σύγκριση με το δείγμα με 7OMF και 7OMF + Caffeine.

4.4) Πρωτεωμική ανάλυση με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/MS)

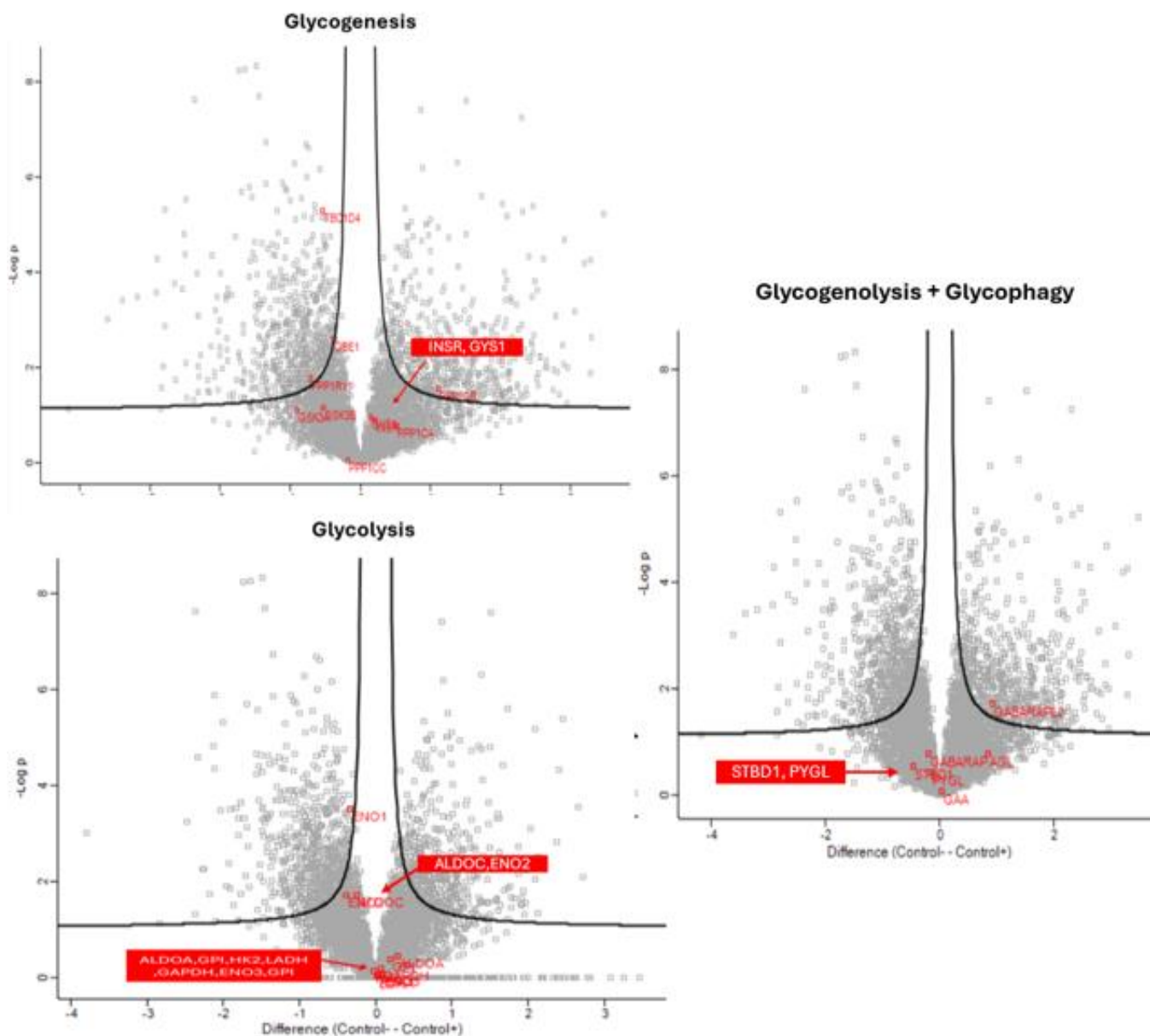
Πραγματοποιήθηκε πρωτεωμική ανάλυση με φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της γλυκαγόνης στα επίπεδα των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταβολισμού του γλυκογόνου σε κύτταρα HepG2. Αναλυθήκαν τρία διαφορετικά δείγματα (Control (+), Control (-), Glucagon 6 hours) από τρεις πειραματικές επαναλήψεις και δυο τεχνικές επαναλήψεις. Αξίζει να τονιστεί πως το Control (+) βρισκόταν σε θρεπτικό μέσο DMEM high glucose 25mM (fed state), το Control (-) (fasting state) σε DMEM w/o glucose, ενώ το Glucagon 6 hours βρισκόταν σε DMEM w/o glucose με τη προσθήκη ινσουλίνης και δεξαμεθαζόνης για επώαση 16 ωρών και έπειτα σε DMEM w/o glucose και phenol red με τη προσθήκη της ορμόνης γλυκαγόνης για 6 ώρες. Περισσότερες λεπτομέρειες για το χειρισμό και το τρόπο καλλιέργειας των κυττάρων αναγράφονται στο 3.10.1.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός βιοπληροφορικών προγραμμάτων, ενώ για την απεικόνιση των αλλαγών στην έκφραση των πρωτεϊνικών επιπέδων μεταξύ των υπό μελέτη συνθηκών χρησιμοποιήθηκαν volcano plots με το πρόγραμμα Perseus. Δημιουργήθηκαν διαφορετικά Volcano plots στα οποία έγιναν συγκρίσεις μεταξύ fed state και fasting state και μεταξύ fasting state και Glucagon 6 hours. Κάθε διάγραμμα αναφερόταν σε διαφορετικό μεταβολικό μονοπάτι. Τα μονοπάτια που μελετήθηκαν ήταν : η γλυκογένεση (γλυκογονική σύνθεση), τα μονοπάτια αποικοδόμησης του γλυκογόνου (γλυκογονόλυση, γλυκοφαγία) και η γλυκόλυση (γλυκογονική διάσπαση). Ο παρακάτω πίνακας αναφέρεται στις πρωτεΐνες που εξετάστηκαν ανά μονοπάτι.

Γονίδιο	Συντομογραφία	Μονοπάτι
Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunit Alpha, Beta, Gamma	PPP1CA, PPP1CB, PPP1CC	Γλυκογένεση
Insulin Receptor	INSR	Γλυκογένεση
Glycogen Synthase 1	GYS1	Γλυκογένεση
1,4-Alpha-Glucan Branching Enzyme 1	GBE1	Γλυκογένεση
TBC1 Domain Family Member 4	TBC1D4	Γλυκογένεση
Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha, Beta	GSK3A, GSK3B	Γλυκογένεση
Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 11	PPP1R11	Γλυκογένεση
Enolase 1, 2, 3	ENO1, ENO2, ENO3	Γλυκόλυση
Phosphoglycerate Kinase 1	PGK1	Γλυκόλυση
Glucose-6-Phosphate Isomerase	GPI	Γλυκόλυση
Aldolase, Fructose-Bisphosphate A, C	ALDOC, ALDOA,	Γλυκόλυση
Hexokinase 2	HK2	Γλυκόλυση
Lactate Dehydrogenase A	LDHA	Γλυκόλυση
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	GAPDH	Γλυκοφαγία
Alpha Glucosidase	GAA	Γλυκοφαγία
GABA Type A Receptor-Associated Protein	GABARAP	Γλυκοφαγία
GABA Type A Receptor Associated Protein Like 2	GABARAPL2	Γλυκοφαγία
Starch Binding Domain 1	STBD1	Γλυκοφαγία
Glycogen Phosphorylase L	PYGL	Γλυκογονόλυση
Amylo-Alpha-1,6-Glucosidase And 4-Alpha-Glucanotransferase	AGL	Γλυκογονόλυση

Πίνακας 11. Γονίδια, συντομογραφία γονιδίων και μονοπάτια που συμμετέχουν.

Αρχικά, εξετάστηκαν οι αλλαγές τις πρωτεϊνικής έκφρασης των μορίων που συμμετέχουν στη γλυκογένεση, στα μονοπάτια της γλυκογονικής σύνθεσης και της γλυκογονικής αποικοδόμησης και στη γλυκόλυση μεταξύ fed και fasting state των κυττάρων. Παρατήρηση των διαγραμμάτων Volcano δείχνει πως δεν υπάρχουν σημαντικές στατιστικά αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ανάμεσα στα διάφορα μονοπάτια.



Εικόνα 21. Volcano plots από πρωτεωμική ανάλυση με φασματομετρία μάζας LC-MS/MS με το πρόγραμμα Perseus. Σύγκριση των συνθηκών Control (+) και Control (-) για τα μονοπάτια της γλυκογένεσης, της γλυκόλυσης και της γλυκογονόλυσης μαζί με τη γλυκοφαγία με σκοπό να διερευνηθεί αν υπάρχει διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος. Στον άξονα x'x απεικονίζεται το fold change (log₂, Control (-) - Control (+)) και στον κατακόρυφο το -log₁₀(p-value) από το two-sample t-test. Οι μαύρες καμπύλες ορίζουν το κριτήριο σημαντικότητας του Perseus (FDR = 0,05, s₀ = 0,1). Τα σημεία που βρίσκονται εκτός των καμπυλών χαρακτηρίζονται στατιστικά σημαντικά. Υψηλότερες τιμές αντιπροσωπεύουν μεγαλύτερες και πιο στατιστικά σημαντικές αλλαγές. Οι θετικές τιμές στον x'x δηλώνουν υπερέκφραση, ενώ οι αρνητικές μείωση. Κάθε γκρι σημείο αντιστοιχεί σε μια πρωτεΐνη, αλλά στο plot εμφανίζονται με τα ονόματα των γονιδίων που τις κωδικοποιούν. Με κόκκινο έχουν επισημανθεί οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος.

Στη συνέχεια, έγιναν αντίστοιχα διαγράμματα Volcano μεταξύ των δειγμάτων Glucagon 6 hours, που αφορά επαγωγή της γλυκογονόλυσης και των δειγμάτων που ήταν σε fasting state. Η γλυκαγόνη έχει ως κύριο ρόλο την ενεργοποίηση της γλυκογονόλυσης, αλλά έπρεπε να μελετηθεί εάν μπορεί να επηρεάσει πέρα από τη σηματοδοτική ενεργοποίηση και τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος.

Σε αυτές τις συγκρίσεις βρέθηκαν μεγαλύτερες διαφορές ανάμεσα στις δύο συνθήκες σε σχέση με πριν. Περνώντας στα αποτελέσματα, στη γλυκογένεση φαίνεται πως πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη σύνθεση του γλυκογόνου (GBE1, GYS1), όπως και οι υπομονάδες της PP1 και ο υποδοχέας ινσουλίνης παρουσίασαν μείωση στα επίπεδα έκφρασης τους, ενώ η GSK3, που αναστέλλει την GYS1 και ο TBC1D4 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική υπερέκφραση. Από την άλλη πλευρά, στη γλυκόλυση η πλειοψηφία των ενζύμων, όπως ενολάσες και αλδολάσες, παρουσιάζουν παρόμοια μείωση στα επίπεδα έκφρασης τους παρουσία γλυκαγόνης. Σχετικά με τα δύο μονοπάτια αποικοδόμησης του γλυκογόνου, τη γλυκογονόλυση και τη γλυκοφαγία, βρέθηκε μείωση σε τρία από τα τέσσερα ένζυμα που συμμετέχουν στη γλυκοφαγία, δηλαδή στη GAA και στα GABARAP, GABARAPL2, ενώ η STBD1 όπως και το βασικό ένζυμο της γλυκογονόλυσης, PYGL δεν παρουσίασαν μεταβολή στα πρωτεϊνικά τους επίπεδα. Παραδόξως εμφανίζεται μικρή μείωση στο γονίδιο AGL που αφορά τα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου. Τα αποτελέσματα από τα Volcano plots φαίνονται παρακάτω.

5) Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου συμβαίνει μέσω δύο διαφορετικών οδών. Η κυτταροπλασματική αποικοδόμηση είναι το κύριο μονοπάτι αποικοδόμησης του γλυκογόνου, αλλά υπάρχει και ένα εναλλακτικό μονοπάτι λυσοσωμικής αποικοδόμησης σε περιπτώσεις που ενεργοποιούνται μηχανισμοί αυτοφαγίας, που ονομάζεται γλυκοφαγία. Μελέτες έχουν αναδείξει το ρόλο της STBD1 στη μεταφορά του γλυκογόνου στα λυσοσώματα. Η STBD1 μέσω της επικράτειας CBM20 και του AIM τομέα της συνεργάζεται με την GABARAPL1 και μεταφέρει τους κόκκους γλυκογόνου στα αυτοφαγικά σωμάτια για αποικοδόμηση, η οποία γίνεται μέσω της GAA. Υπάρχουν πρώιμες μελέτες που υποστηρίζουν ότι υπάρχει αλληλεπίδραση της STBD1 με πρωτεΐνες της γλυκογονόλυσης σε κύτταρα HepG2 κυρίως σε περιόδους νηστείας, ωστόσο δεν έχει διευκρινιστεί αυτή η συσχέτιση γεγονός που υπογραμμίζει την ανάγκη για περαιτέρω μελέτες (Zhu Y.et al.,2014).

Παράλληλα, η ορμονική ρύθμιση μέσω ινσουλίνης/γλυκαγόνης και η αλλοστερική τροποποίηση της PYGL καθορίζουν τη ροή μέσω της γλυκογονόλυσης, διασφαλίζοντας την ομοιόσταση της γλυκόζης υπό μεταβαλλόμενες ενεργειακές απαιτήσεις. Στο πειραματικό πλαίσιο της εργασίας, αξιοποιήθηκαν τόσο ορμονικά ερεθίσματα (γλυκαγόνη, δεξαμεθαζόνη/ινσουλίνη) όσο και ουσίες (καφεΐνη, 7-O-Methylmangiferin), ώστε να εξεταστεί η επίδραση τους στα επιπέδων των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτά τα μονοπάτια σε κύτταρα HepG2. Πιθανή αλληλεπίδραση των δύο οδών ενδέχεται να έχει κλινικό ενδιαφέρον, καθώς διαταραχές έχουν συσχετισθεί με μεταβολικές και ηπατικές παθήσεις (όπως αντίσταση στην ινσουλίνη και διαβήτη) καθώς και σε πολλές γλυκογονιώσεις (GSDs) (Ellingwood S.et al.,2018).

Η μεθοδολογική στρατηγική της παρούσας εργασίας περιλαμβάνει ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών με Western Blot για ποσοτικοποίηση PYGL, AGL και STBD1 με κανονικοποίηση στην α-tubulin, κινητική αποτίμηση της PYGL σε εκχυλίσματα HepG2 με φασματοφωτομετρική ποσοτικοποίηση ανόργανου φωσφόρου, ποσοτικό προσδιορισμό γλυκόζης με το kit Glucose-Glo™ όπως και πρωτεωμική ανάλυση με φασματομετρία μάζας LC-MS/MS. Ο συνδυασμός των διαφορετικών πειραμάτων «έκφραση-ενζυμική δραστηριότητα-μεταβολικό προϊόν» στο ίδιο μοντέλο αποσκοπεί σε ένα πιο ολοκληρωμένο πλαίσιο ερμηνείας των παρατηρήσεων υπό ορμονική/φαρμακολογική πρόκληση. Η επιλογή της σειράς HepG2 ευνοεί την αναπαραγωγικότητα και τη συγκρισιμότητα των χειρισμών, με την επιφύλαξη ότι πρόκειται για καλά διαφοροποιημένη καρκινική σειρά που δεν αναπαριστά πλήρως τη φυσιολογία ηπατοκυττάρων.

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT έδειξαν πως η συγκέντρωση των 400 μM για την καφεΐνη όπως και η συγκέντρωση των 100 μM για την 7OMF, ήταν οι κατάλληλες για να χρησιμοποιηθούν στα ακόλουθα πειραματικά πρωτόκολλα χωρίς να επηρεάσουν σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα.

Όσον αφορά την κινητική μελέτη στο μονοπάτι της γλυκογονόλυσης, με τη χρήση του γνωστού αναστολέα καφεΐνης της GP και του υπό δοκιμή αναστολέα 7OMF, έδωσε σαν αποτέλεσμα αναστολή περίπου στο 28 % για τα δείγματα με καφεΐνη και 24 % για την 7OMF. Ωστόσο, στα

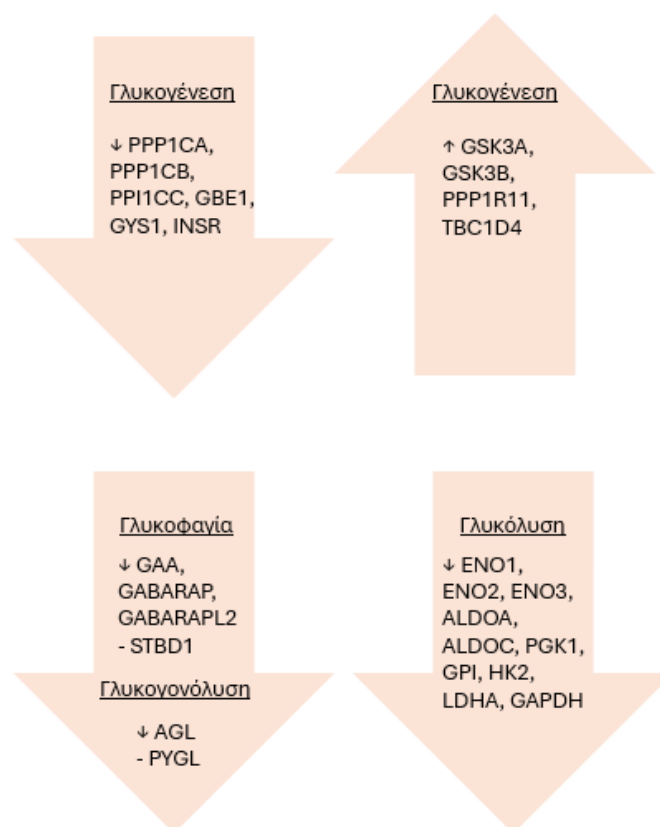
κύτταρα HepG2 που είχαν προστεθεί και οι δύο ουσίες η μείωση ήταν παρόμοια. Η αναστολή της γλυκογονόλυσης προκάλεσε αντίστοιχη μείωση, 35% και 31% στα επίπεδα της συγκέντρωσης της γλυκόζης, ενώ από τα αποτελέσματα δεν υποδηλώνεται συνεργιστική δράση μεταξύ των αναστολέων.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση της καφεΐνης και της 7OMF, όπως και των ορμονών ινσουλίνη (παρουσία δεξαμεθαζόνης) και γλυκαγόνη στα πρωτεϊνικά επίπεδα των STBD1, PYGL και AGL. Τα αποτελέσματα από την ανοσοαποτύπωση με Western Blot για STBD1 έδειξαν μια μικρή αύξηση παρουσία μόνο ινσουλίνης-δεξαμεθαζόνης και μια μικρή μείωση παρουσία καφεΐνης, διατηρώντας συνολικά τα σχετικά πρωτεϊνικά της επίπεδα σταθερά μεταξύ των δειγμάτων. Όσον αφορά τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της AGL εμφανίζεται μια μικρή αύξηση παρουσία γλυκαγόνης και καφεΐνης κατά 15%. Τέλος, τα σχετικά πρωτεϊνικά επίπεδα της PYGL δείχνουν μικρή αύξηση της τάξης του 10% παρουσία καφεΐνης, χωρίς κάποια άλλη αξιοσημείωτη μεταβολή στα υπόλοιπα δείγματα. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικές με αποτέλεσμα να μην μπορεί να βγει κάποιο σαφές συμπέρασμα. Είναι απαραίτητο σε μελλοντικές μελέτες να εξεταστούν διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας και χρόνοι επώασης με τις ορμόνες και τις ουσίες ώστε να επιβεβαιωθούν οι αρχικές μας παρατηρήσεις. Θα πρέπει να διερευνηθεί αν η μικρή αύξηση, της τάξης του 10 και 15%, των επιπέδων των πρωτεϊνών PYGL και AGL που παρατηρείται παρουσία καφεΐνης είναι πειραματική ή μπορεί να υποδηλώνει πιθανή συσχέτιση της καφεΐνης με τη μεταγραφή των γονιδίων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε πρωτεωμική ανάλυση με φασματομετρία μάζας LC-MS/MS, όπου συγκρίθηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνών που σχετίζονται με τα μονοπάτια αποικοδόμησης γλυκογόνου σε συνθήκες νηστείας και κορεσμού σε κύτταρα HepG2. Επιθεώρηση των αποτελεσμάτων σε σχεδιαγράμματα Volcano δεν έδειξε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης. Φαίνεται πως τα επίπεδα των συγκεκριμένων πρωτεϊνών δεν επηρεάζονται για τις συγκεκριμένες συνθήκες και ώρες που μελετάμε. Ωστόσο, αξίζει να μελετηθεί το κατά ποσό η χρονική διάρκεια μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα.

Μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν μετά την ορμονική επαγωγή της γλυκογονόλυσης. Έξι ώρες μετά την επώαση με γλυκαγόνη παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα επίπεδα έκφρασης των ενζύμων της γλυκόλυσης. Επιπλέον, στη γλυκογονική σύνθεση (γλυκογένεση) τα επίπεδα των πρωτεϊνών GBE, GS και PP1 παρουσίασαν σημαντική μείωση, ενώ ο TBC1D4, η PPP1R11 και η GSK3 αυξήθηκαν. Η αύξηση των επιπέδων των τριών τελευταίων θα μπορούσε να αποσκοπεί στη διατήρηση της αναστολής των προηγούμενων, αφού η GSK3 αναστέλλει τη GS και η PP1 αναστέλλει τη GSK3, ενώ η PPP1R11 ρυθμίζει την αναστολή της PP1. Αξίζει να σημειωθεί ότι, με βάση τα αποτελέσματά μας, έξι ώρες μετά η γλυκαγόνη φαίνεται να επιδρά σε επίπεδο σηματοδότησης και όχι σε επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών της γλυκογονόλυσης. Εντούτοις, επηρεάζει σε επίπεδο έκφρασης τις πρωτεΐνες της γλυκογονικής σύνθεσης. Η μείωση των επιπέδων της πλειοψηφίας των ενζύμων της γλυκόλυσης θα έχει ως αποτέλεσμα τελικά τη μείωση της γλυκόλυσης και κατά συνέπεια χαμηλότερα επίπεδα ATP και υψηλότερα επίπεδα AMP. Τα αυξημένα επίπεδα AMP οδηγούν στην ενεργοποίηση ενζύμων όπως η AMPK, η οποία έχει τεκμηριωθεί στη βιβλιογραφία (Wei

Z.et al.,2024), ότι ενεργοποιεί την αυτοφαγία μέσω απενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του mTORC1 και ενεργοποίησης του συμπλέγματος ULK1. Παράλληλα, έχει δειχθεί σε μελέτες ότι η STBD1 αποτελεί υπόστρωμα της AMPK, ευνοώντας πιθανώς τη γλυκοφαγία και την αντίσταση στην ινσουλίνη (Theodoulou A.et al.,2025). Παρ' όλα αυτά, στο χρονικό διάστημα των έξι ωρών δεν παρατηρείται μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης της STBD1, ενώ προέκυψε μείωση στις GAA, GABARAPL2 και GABARAP, που σχετίζονται με τη γλυκοφαγία. Μάλιστα, δεν ανιχνεύθηκαν στα δείγματα επίπεδα mTORC1, όμως ανιχνεύθηκε ο RPTOR, ο οποίος αποτελεί τον ρυθμιστικό «σκελετό» του mTORC1 και στρατολογεί τα υποστρώματά του, ενορχηστρώνοντας τη δραστηριότητά του ανάλογα με τα θρεπτικά, ενεργοποιώντας τον σε επάρκεια και αναστέλλοντάς τον όταν φωσφορυλιώνεται από την AMPK. Είναι παράδοξο πως, ενώ φαίνεται ότι ευνοείται η αυτοφαγία, αυτό δεν αντικατοπτρίζεται στα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών της γλυκοφαγίας. Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκε μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα CREB (cAMP response element-binding protein), ο οποίος ενεργοποιείται από τη γλυκαγόνη. Στο Σχήμα 10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την πρωτεωμική ανάλυση κατά τη σύγκριση των συνθηκών νηστείας και επώασης με γλυκαγόνη για 6 ώρες. Με βάση τα παραπάνω, θα πρέπει να μελετηθεί το σύστημα αυξάνοντας το χρόνο επώασης με γλυκαγόνη, καθώς και να πραγματοποιηθούν μελλοντικά πρωτεωμικές αναλύσεις με την παρουσία αναστολέων.



Σχήμα 10. Επίδραση της γλυκαγόνης στα μονοπάτια μεταβολισμού του γλυκογόνου με βάση τα αποτελέσματα από τη φασματομετρία μάζας. Το βέλος προς τα κάτω υποδηλώνει μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων, το βέλος προς τα πάνω υποδηλώνει αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων, ενώ το – υποδηλώνει πως τα επίπεδα παραμένουν σταθερά.

Συμπερασματικά, η γλυκογονόλυση έχει μελετηθεί εκτενώς. Αντίθετα, η γλυκοφαγία παραμένει λιγότερο μελετημένη, καθώς δεν έχουν αποσαφηνιστεί οι μηχανισμοί ενεργοποίησης και ρύθμισης της. Επομένως, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες λειτουργικής πρωτεωμικής ώστε να διεκρινιστούν οι αλληλεπιδράσεις των οδών και να αναδειχθούν θεραπευτικοί στόχοι. Η πρόοδος σε αυτό το πεδίο είναι ιδιαίτερα υποσχόμενη για φαρμακολογικές παρεμβάσεις στις γλυκογονιώσεις και στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

6) Βιβλιογραφία

- 1) Taverna, S., Cammarata, G., Colomba, P., Sciarrino, S., Zizzo, C., Francofonte, D., ... Duro, G. (2020). Pompe disease: pathogenesis, molecular genetics and diagnosis.
- 2) Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., & Ameneiros-Rodríguez, E. (2016). Glycogen metabolism in humans. *BBA Clinical*, 5, 85–100.
- 3) Demetriadou, A., Drousiotou, A., & Petrou, P. P. (2017). The “sweet” side of ER–mitochondria contact sites. *Communicative & Integrative Biology*, 10(4), e1329787.
- 4) Dewangan, N. (2023, October 27). *Glycogenesis: Location, steps, enzymes, regulation, uses*. Microbe Notes.
- 5) Ellingwood, S. S., & Cheng, A. (2018). Biochemical and clinical aspects of glycogen storage diseases. *Journal of Endocrinology*, 238(3), R211–R225.
- 6) Habtemariam, S. (2019). Glucose metabolism: Normal physiology, diabetic dysregulation, and therapeutic targets. In *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases* (pp. 13–39). Academic Press.
- 7) Hou, J., Zheng, D., Xiao, W., Li, D., Ma, J., & Hu, Y. (2018). Mangiferin enhanced autophagy via inhibiting mTORC1 pathway to prevent high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 383.
- 8) James, S. L., Koutsifeli, P., D'Souza, R. F., Masson, S. W. C., Woodhead, J. S. T., Merry, T. L., Delbridge, L. M. D., & Mellor, K. M. (2024). Glycophagy is involved in cardiac glycogen regulation in response to exercise. *Current Research in Physiology*, 7, 100131.
- 9) Jiang, S., Heller, B., Tagliabracci, V. S., Zhai, L., Irimia, J. M., DePaoli-Roach, A. A., Wells, C. D., Skurat, A. V., & Roach, P. J. (2010). Starch binding domain–containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 34960–34971.
- 10) Koutsifeli, P., Varma, U., Daniels, L. J., Annandale, M., Li, X., Neale, J. P. H., Hayes, S., Weeks, K. L., James, S., Delbridge, L. M. D., & Mellor, K. M. (2022). Glycogen-autophagy: Molecular machinery and cellular mechanisms of glycophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 298(7), 102093.
- 11) Kyriakoudi, S., Theodoulou, A., Potamiti, L., Schumacher, F., Zachariou, M., Papacharalambous, R., Kleuser, B., Panayiotidis, M. I., Drousiotou, A., & Petrou, P. P. (2022). Stbd1-deficient mice display insulin resistance associated with enhanced hepatic ER–mitochondria contact. *Biochimie*, 200, 172–183.
- 12) LibreTexts. (2025, March 28). 15.3: Glycogenolysis and its regulation by glucagon and epinephrine signaling. In Jakubowski & Flatt (Eds.), *Fundamentals of Biochemistry*.
- 13) Liu, X., & Gilbert, R. G. (2024). Normal and abnormal glycogen structure—A review. *Carbohydrate Polymers*, 338, 122195.

- 14) Lytridou, A. A., Demetriadou, A., Christou, M., Potamiti, L., Mastroyiannopoulos, N. P., Kyriacou, K., Phylactou, L. A., Drousiotou, A., & Petrou, P. P. (2020). Stbd1 promotes glycogen clustering during endoplasmic reticulum stress and supports survival of mouse myoblasts. *Journal of Cell Science*, 133(20), jcs244855.
- 15) Akter, S., Moni, A., Faisal, G. M., Uddin, M. R., Jahan, N., Hannan, M. A., Rahman, A., & Uddin, M. J. (2022). Renoprotective effects of mangiferin: Pharmacological advances and future perspectives. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3), 1864.
- 16) Mancini, M. C., Noland, R. C., Collier, J. J., Burke, S. J., Stadler, K., & Heden, T. D. (2023). Lysosomal glucose sensing and glycophagy in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 34(11), 764–777.
- 17) Mishra, K., & Kakhlon, O. (2024). Mitochondrial dysfunction in glycogen storage disorders (GSDs). *Biomolecules*, 14(9), 1096.
- 18) Neoh, G. K. S., Tan, X., Chen, S., Roura, E., Dong, X., & Gilbert, R. G. (2024). Glycogen metabolism and structure: A review. *Carbohydrate Polymers*, 346, 122631.
- 19) Patino, S. C. (2024). *Biochemistry – Glycogenolysis*. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- 20) Redmann, M., Benavides, G. A., Berryhill, T. F., Wani, W. Y., Ouyang, X., Johnson, M. S., ... Zhang, J. (2017). Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Free Radical Biology and Medicine*, 104, 1–13.
- 21) Rocha, S., Aniceto, N., Guedes, R. C., Albuquerque, H. M. T., Silva, V. L. M., Silva, A. M. S., & Freitas, M. (2022). An *in silico* and an *in vitro* inhibition analysis of glycogen phosphorylase by flavonoids, styrylchromones, and pyrazoles. *Nutrients*, 14(2), 306.
- 22) Rocha, S., Lucas, M., Araújo, A. N., Corvo, M. L., Fernandes, E., & Freitas, M. (2021). Optimization and validation of an *in vitro* standardized glycogen phosphorylase activity assay. *Molecules*, 26(15), 4635.
- 23) Tang, Q., Liu, M., Zhao, H., & Chen, L. (2023). Glycogen-binding protein STBD1: Molecule and role in pathophysiology. *Journal of Cellular Physiology*, 238(9), 2010–2025.
- 24) Tang, Q., Liu, M., Zhao, H., & Chen, L. (2022). *The glycogen cargo receptor STBD1: From biology to disease targeted therapies* [Preprint]. Authorea.
- 25) Theodoulou, A., Speckmann, T., Potamiti, L., Baba, O., Morita, T., Drousiotou, A., Panayiotidis, M. I., Schürmann, A., & Petrou, P. P. (2025). Stbd1 stimulates AMPK signaling and alleviates insulin resistance in an *in vitro* hepatocyte model. *The FEBS Journal*, 292(11), 2882–2901.
- 26) Zhang, Y., Sun, Y., Shi, J., Xu, P., Wang, Y., Liu, J., ... Pan, L. (2024). Decoding the molecular mechanism of selective autophagy of glycogen mediated by autophagy receptor STBD1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 121(37), e2402817121.
- 27) Zhao, H., Tang, M., Liu, M., & Chen, L. (2018). Glycophagy: An emerging target in pathology. *Clinica Chimica Acta*, 484, 298–303.
- 28) Zois, C. E., & Harris, A. L. (2016). Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy. *Journal of Molecular Medicine*, 94(2), 137–154.
- 29) Alexopoulos, S., McGawley, M., Mathews, R., Papakostopoulou, S., Koulas, S., Leonidas, D. D., Zwain, T., Hayes, J. M., & Skamnaki, V. (2024). Evidence for the quercetin binding site of glycogen phosphorylase as a target for liver-isoform-selective

- inhibitors against glioblastoma: Investigation of flavanols epigallocatechin gallate and epigallocatechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72(43), 24070–24081.
- 30) Formation and degradation of glycogen. (n.d.). *Basicmedical Key*. Retrieved August 18, 2025.
 - 31) Zhao, Y., Yan, Z., Li, S., Wang, Y., Guo, Y., Wang, T., & Zhang, L. (2024). A novel 5-chloro-N-phenyl-1H-indole-2-carboxamide derivative as a glycogen phosphorylase inhibitor: Evaluating the long-term drug effects on muscle function for the first time. *Molecules*, 29(18), 4448.
 - 32) Chapple, B., Woodfin, S., & Moore, W. (2024). The perfect cup? Coffee-derived polyphenols and their roles in mitigating factors affecting type 2 diabetes pathogenesis. *Molecules*, 29(4), 751.
 - 33) Koutsifeli, P., Daniels, L. J., Neale, J., Fong, S., Varma, U., Annandale, M., Li, X., Nursalim, Y., Bell, J. R., Weeks, K. L., Stotland, A., Taylor, D. J., Gottlieb, R. A., Delbridge, L. M. D., & Mellor, K. M. (2024). Methods for detection of cardiac glycogen-autophagy. *Autophagy Reports*, 3(1), 2405331.
 - 34) Daghlis, S. A. (2025). *Biochemistry, Glycogen*. In StatPearls. NCBI Bookshelf. National Library of Medicine.
 - 35) Han, H.-S., Kang, G., Kim, J. S., Choi, B. H., & Koo, S.-H. (2016). *Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective*. *Experimental & Molecular Medicine*, 48, e218.
 - 36) Ashcroft, F. M. (2017). *Is type 2 diabetes a glycogen storage disease ...* *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(1), 59–68.
 - 37) Imran, M., Arshad, M. S., Butt, M. S., Kwon, J.-H., Arshad, M. U., & Sultan, M. T. (2017). *Mangiferin: A natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders*. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 84.
 - 38) Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). *Guidelines for cell viability assays*. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349
 - 39) Zhu, Y., Zhang, M., Kelly, A. R., & Cheng, A. (2014). The carbohydrate-binding domain of overexpressed STBD1 is important for its stability and protein–protein interactions. *Bioscience Reports*, 34(4), e00117.
 - 40) Wei, Z., Hu, X., Wu, Y., Zhou, L., Zhao, M., & Lin, Q. (2024). Molecular mechanisms underlying initiation and activation of autophagy. *Biomolecules*, 14(12), 1517
 - 41) Theodoulou, A., Speckmann, T., Potamiti, L., Baba, O., Morita, T., Drousiotou, A., Panayiotidis, M. I., Schürmann, A., & Petrou, P. P. (2025). Stbd1 stimulates AMPK signaling and alleviates insulin resistance in an in vitro hepatocyte model. *The FEBS Journal*, 292(11), 2882–2901
 - 42) Ezell, O. (2024). Glycogen Structure & Glycogenolysis – MCAT Biochemistry.
 - 43) Hædersdal, S., Lund, A., Knop, F. K., & Vilsbøll, T. (2018). The role of glucagon in the pathophysiology and treatment of type 2 diabetes. *Mayo Clinic Proceedings*, 93(2), 217–239.