



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ
ΕΝΖΥΜΟ ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

**STUDY OF THE EFFECT OF BIOACTIVE COMPOUNDS ON
THE ENZYME OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE KINASE**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΙΦΤΗ ΦΡΑΝΤΣΕΣΚΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ΕΝΖΥΜΟ
ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: Πρίφτη Φραντσέσκα του Χρήστο

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΚΤΕΛΕΣΗΣ: Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Στραβοδήμος Γεώργιος

Μεταδιδακτορικός ερευνητής Δομικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| Περιεχόμενα..... | 3 |
| Περίληψη..... | 6 |
| Abstract..... | 7 |
| 1. Εισαγωγή..... | 8 |
| 1.1 Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου..... | 9 |
| 1.2 Βιολογικός ρόλος της κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου..... | 13 |
| 1.3 Ρύθμιση της δραστικότητας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου..... | 17 |
| 1.4 Η κινάση της φωσφορυλάσης ως μεταβολικός θεραπευτικός στόχος..... | 18 |
| 1.5 Βιοδραστικές ενώσεις..... | 19 |
| 1.5.1 Φλορετίνη..... | 20 |
| Σκοπός..... | 23 |
| 2. Πειραματικό μέρος..... | 24 |
| 2.1 Υλικά - Όργανα..... | 24 |
| 2.2 Παρασκευαστικές μέθοδοι..... | 26 |
| 2.2.1 Απομόνωση της γ-καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου $_{rm}PhKg_{trunc}$ | 26 |
| 2.3 Αναλυτικές μέθοδοι..... | 26 |
| 2.3.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστικότητας της $_{rm}PhKg_{trunc}$ | 26 |
| 2.3.2 Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας της GPa..... | 30 |
| 2.3.3 Προσδιορισμός φωσφορικών ιόντων-Μέθοδος ασκορβικού οξέος..... | 31 |
| 2.3.4 Προσδιορισμός σταθεράς IC_{50} του αναστολέα Phloretin έναντι της PhKg..... | 32 |
| 3. Αποτελέσματα-Συζήτηση..... | 35 |
| 4. Βιβλιογραφία..... | 38 |

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της κ. Βασιλικής Σκαμνάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος, την οποία και ευχαριστώ που με δέχτηκε από την πρώτη στιγμή στο γραφείο της και που μου ανέθεσε το θέμα της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης. Την ευχαριστώ για τη συνεχή και ουσιαστική καθοδήγηση κατά την εκπόνηση της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Λεωνίδα Δημήτριο και τον κ. Στραβοδῆμο Γεώργιο, Μεταδιδακτορικό Ερευνητή και μέλος της τριμελούς επιτροπής για την διαρκή παρακολούθηση, τις υποδείξεις και διορθώσεις του ως προς το εργαστηριακό σκέλος της μελέτης. Μου μετέδωσε, στο μέτρο του δυνατού, τις γνώσεις του και μου έμαθε από την αρχή την λειτουργία του εργαστηρίου και τα απαραίτητα βήματα για την διεκπεραίωση των πειραμάτων καθ'όλη τη διάρκεια υλοποίησης των πειραματικών εργασιών. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα καθώς επίσης και τον συμφοιτητή μου Νίκο Σείζη που πραγματοποίησε την διπλωματική του εργασία παράλληλα με εμένα, για την καθημερινή αλληλεπίδραση στο εργαστήριο. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και κυρίως τη μητέρα μου για την ενθάρρυνση και τη δύναμη που μου παρείχε να συνεχίσω τις σπουδές μου.

Περίληψη

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) είναι ένα ένζυμο που παίζει καταλυτικό ρόλο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου και έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών ως εν δυνάμει φαρμακευτικός στόχος. Αναστολείς της δράσης του ενζύμου αυτού, το οποίο ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, η οποία καταλύει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα, συμβάλλοντας στην αντιμετώπιση μεταβολικών νοσημάτων όπως ο διαβήτης τύπου II. Βιοδραστικές ενώσεις, όπως οι πολυφαινολικές ενώσεις, έχει βρεθεί ότι χαρακτηρίζονται από χαμηλή γλυκαιμική απόκριση και αντιδιαβητική δράση. Η φλορετίνη, μια πολυφαινολική ένωση διυδροχαλκόνης, έχει αποδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης του μεταβολισμού. Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της ευρύτερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και έχει ως απώτερο σκοπό τη μελέτη ενζύμων του μεταβολισμού του γλυκογόνου και την ανεύρεση αναστολέων τους με θεραπευτική δράση. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης της φλορετίνης στη δραστηριότητα του ενζύμου της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου *in vitro*, ως πρώτο στάδιο για την αξιοποίηση της για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμάκων για τον διαβήτη τύπου II στο εγγύς μέλλον. Πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες που έδειξαν ότι η φλορετίνη έχει ανασταλτική δράση έναντι της μυϊκής ισόμορφης της PhK από κουνέλι ενώ υπολογίστηκε η τιμή της σταθεράς αναστολής της $IC_{50} = 7.72 \pm 0.25 \mu\text{M}$.

Abstract

Glycogen phosphorylase kinase (PhK) is an enzyme that plays a catalytic role in the degradation of glycogen and has attracted the interest of researchers as a potential drug target. Inhibitors of this enzyme, which activates glycogen phosphorylase, which catalyzes the degradation of glycogen to glucose 1-phosphate, could lead to lower blood glucose levels, helping to treat metabolic diseases such as type II diabetes. Bioactive compounds, such as polyphenolic compounds, have been found to have a low glycemic response and antidiabetic activity. Phloretin, a dihydrochalcone polyphenolic compound, has been shown to play an important role in regulating metabolic homeostasis. The present dissertation was carried out in the context of the wider research conducted in the laboratory of Structural and Functional Biochemistry, Department of Biochemistry & Biotechnology of the University of Thessaly and has as its ultimate purpose the study of glycogen metabolism enzymes and their therapeutic inhibitors. The aim of the present study was to investigate the effect of phloretin on the activity of the enzyme glycogen phosphorylase kinase *in vitro*, as a first step in its development for the development of innovative drugs for type II diabetes in the near future. Kinetic studies that took place showed that phloretin had an inhibitory effect on the muscle isoform of PhK from rabbits while the value of the constant of IC_{50} was calculated at $7.72 \pm 0.25 \mu\text{M}$.

1. Εισαγωγή

Με τον όρο βιοδραστικές ενώσεις αναφερόμαστε στις ενώσεις εκείνες, που εντοπίζονται είτε στους μικροοργανισμούς και τα φυτά είτε στα ζώα, για τις οποίες υπάρχουν επαρκώς τεκμηριωμένα επιστημονικά δεδομένα, τα οποία αποδεικνύουν ότι οι ενώσεις αυτές μπορούν να επιτελέσουν μια συγκεκριμένη λειτουργία εντός του οργανισμού. Πρόκειται για ουσίες για τις οποίες πραγματοποιούνται μελέτες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε ζωικά μοντέλα, σε κλινικό και επιδημιολογικό επίπεδο συμβάλλοντας στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους και του βιολογικού αποτελέσματος της επίδρασης τους. Τέτοιες ενώσεις έχουν μελετηθεί στο πλαίσιο ανάπτυξης νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων (Saadaoui et al., 2020; Zimmermann et al., 2021; Ruiz-López et al., 2019).

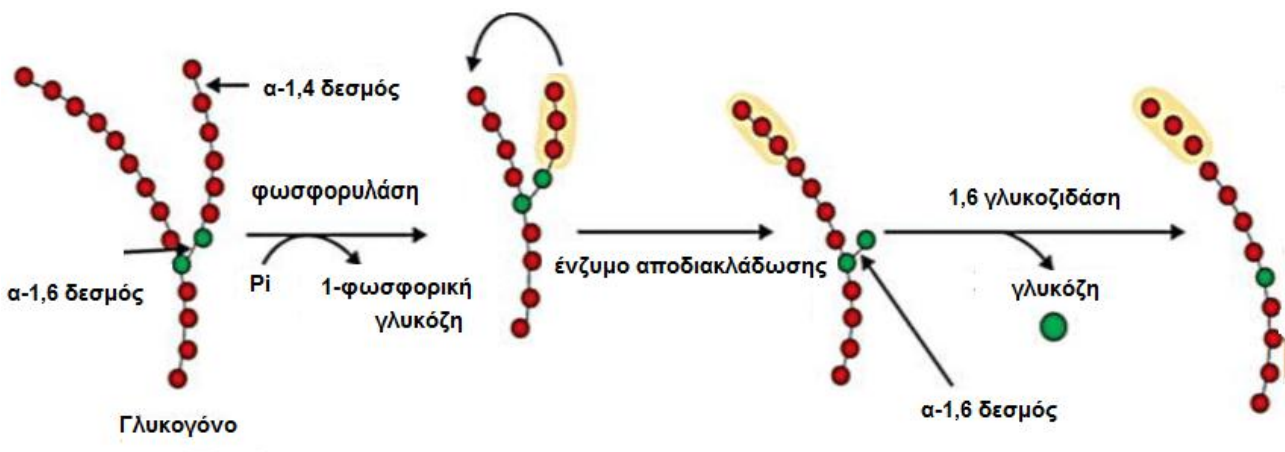
Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (υπεργλυκαιμία). Η γλυκογονόλυση και η γλυκονεογένεση αποτελούν τα μονοπάτια παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ και τα ένζυμα που ελέγχουν τα παραπάνω μονοπάτια αποτελούν δυνητικά μοριακούς στόχους για την ανάπτυξη αντι-υπεργλυκαιμικών παραγόντων. Τα ένζυμα της γλυκογονόλυσης τόσο η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) όσο και η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών ως εν δυνάμει φαρμακευτικοί στόχοι. Αναστολείς αυτών των ενζύμων της γλυκογονόλυσης θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη μείωση μεταβολικών νοσημάτων όπως ο διαβήτης τύπου II. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ανάγκη για ανεύρεση νέων φαρμακευτικών παραγόντων για τον διαβήτη τύπου II υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι πολλά από τα σύγχρονα φαρμακευτικά σκευάσματα, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του, έχουν σοβαρές παρενέργειες που αφορούν εκτός από το ήπαρ, την καρδιά, τους νεφρούς και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Δραστικές ουσίες όπως η κουρκουμίνη, η αλλισίνη και η τζιντζερόλη έχει βρεθεί ότι έχουν σημαντική αντι-υπεργλυκαιμική δράση τόσο στα πειραματικά μοντέλα όσο και στους ανθρώπους (Shanmugam et al., 2021).

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι μια διατροφή πλούσια σε πολυφαινολικές ενώσεις παίζει σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην ελαχιστοποίηση του κινδύνου εμφάνισης διαβήτη αλλά και στη βελτίωση της συμπτωματολογίας σε άτομα που ήδη πάσχουν από τη νόσο. Οι πολυφαινολικές ενώσεις συμμετέχουν στην εξουδετέρωση των δραστικών ριζών και ιδιαίτερα του οξυγόνου και φαίνεται η δράση τους να σχετίζεται με χαμηλή γλυκαιμική απόκριση. Η φλορετίνη, μια φυσική φαινολική ένωση από τα μήλα, χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλία βιολογικών δραστηριοτήτων όπως αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιαλλεργικές, αντικαρκινικές, αντιθρομβωτικές και ηπατοπροστατευτικές. Παρά το πλήθος των κλινικών μελετών, απαιτούνται νέες προσπάθειες στην κλινική έρευνα για τον προσδιορισμό του θεραπευτικού της ρόλου αλλά και των μοριακών-βιοχημικών μηχανισμών που τον επάγουν (Mariadoss et al., 2019). Προς αυτή την κατεύθυνση στην παρούσα εργασία θα διερευνηθεί η βιοδραστικότητα της φλορετίνης ως προς την ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου της γλυκογονόλυσης PhK ως πρώτο στάδιο για τη μελέτη της επίδρασης της στο μονοπάτι της γλυκογονόλυσης.

1.1 Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου

Το γλυκογόνο είναι μια ενδιάμεση και άμεσα κινητοποιούμενη πηγή ενέργειας. Αποτελεί μια αποδοτική μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης με μειωμένο βάρος (αφαίρεση μορίων νερού) και όγκο. Πρόκειται για ένα διακλαδισμένο πολυμερές αποτελούμενο από κατάλοιπα γλυκόζης, τα οποία ενώνονται με α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ κάθε δέκα κατάλοιπα γλυκόζης υπάρχει ένας α -1,6 γλυκοζιτικός δεσμός, ο οποίος χρησιμεύει στην εισαγωγή των σημείων διακλάδωσης (Ellingwood et al., 2018). Το γλυκογόνο αποτελεί βασική πηγή αποθήκευσης ενέργειας καθώς ο καταβολισμός του είναι ελεγχόμενος, ρυθμίζει την περιεκτικότητα της γλυκόζης στο αίμα, κινητοποιείται άμεσα και είναι ικανό για παροχή ενέργειας στην περίπτωση έντονης ξαφνικής σωματικής άσκησης σε αντίθεση με τα λιπαρά οξέα. Η αποθήκευση του γλυκογόνου πραγματοποιείται στο κυττόςολιο με τη μορφή κοκκίων. Αν και αποτελείται περίπου το 10% του βάρους του ήπατος και μόλις το 2% του βάρους των μυών, οι μύες έχουν μεγαλύτερη ποσότητα γλυκογόνου καθώς έχουν μεγαλύτερη μάζα (Adeva-Andany et al., 2016; Murray and Rosenbloom, 2018).

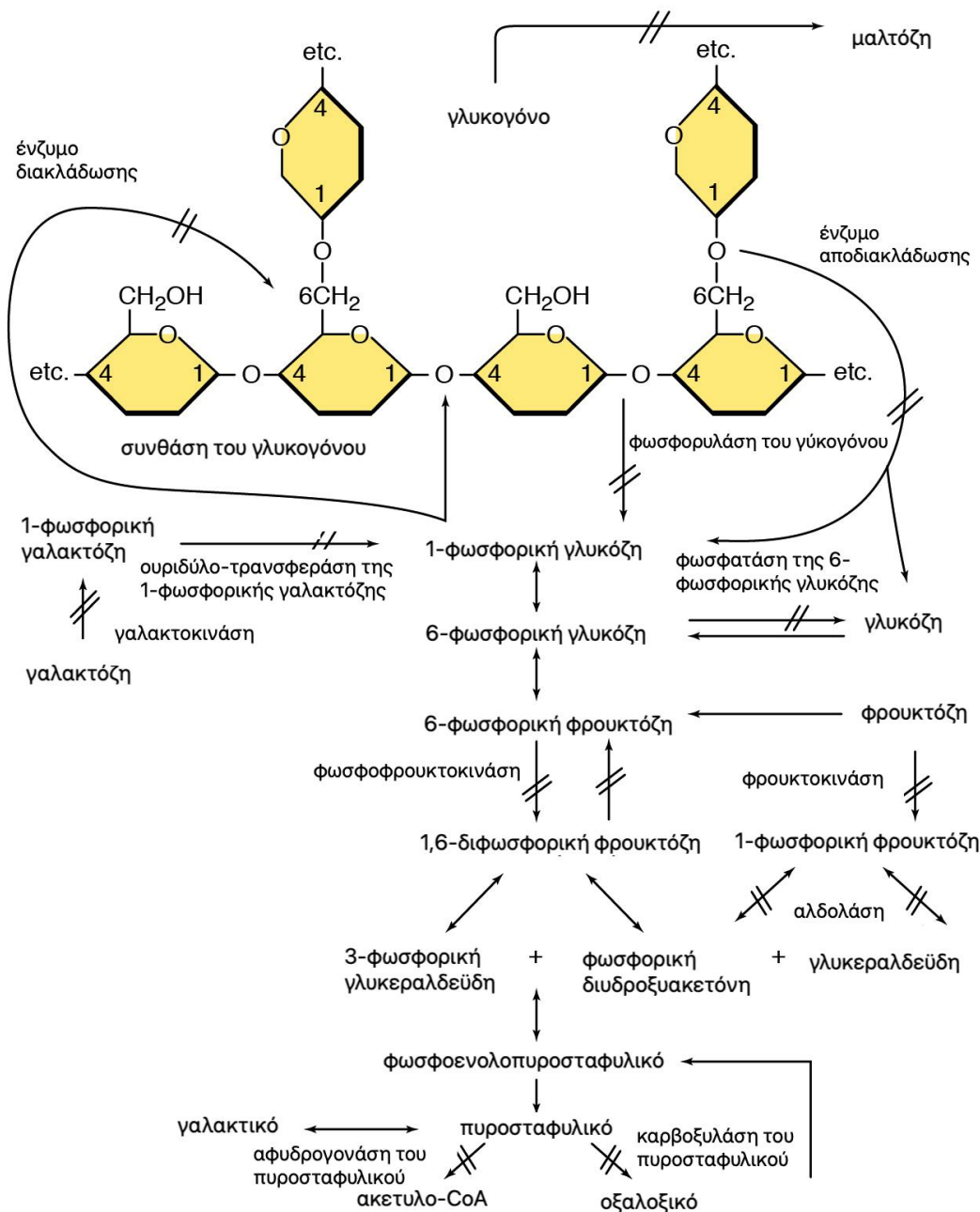
Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 1, η αποικοδόμηση του γλυκογόνου λαμβάνει χώρα σε τρία βήματα. Το πρώτο αφορά την απελευθέρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το δεύτερο αφορά την ανακατασκευή του υποστρώματος και το τρίτο τη μετατροπή της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Για τη σύνθεση του γλυκογόνου απαιτείται η ενεργοποιημένη μορφή της γλυκόζης, UDP-γλυκόζη (ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη). Όλες αυτές οι αντιδράσεις ελέγχονται από ένζυμα που αποκρίνονται μέσω αλλοστερικής ρύθμισης στην παρουσία μεταβολιτών ή ελέγχονται ορμονικά με σκοπό την προσαρμογή για τις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού (Ellingwood et al., 2018).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου (Mohammad, 2021).

Πιο αναλυτικά, η PhK ενεργοποιεί με φωσφορυλίωση τη GP, η οποία συμμετέχει στην αντίδραση διάσπασης του α -1,4 γλυκοζιτικού δεσμού, με τη φωσφορόλυση στο μη αναγωγικό άκρο του γλυκογόνου. Από την αντίδραση αυτή αποσπάται ένα μόριο 1-φωσφορικής γλυκόζης, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Η αντίδραση είναι αναστρέψιμη καθώς ένας

δεσμός (C-O-C) υποκαθίσταται από άλλο δεσμό ίδιας ενέργειας (C-O-P), ευνοώντας την κατεύθυνση προς τα δεξιά. Η GP συνεχίζει την αποσύνθεση α-1,4 γλυκοζιτικού δεσμού μέχρι να φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων γλυκόζης από τη διακλάδωση. Η μεταφοράση μετατοπίζει 3 κατάλοιπα γλυκόζης από την εξωτερική στην εσωτερική διακλάδωση ώστε να μείνει εκτεθειμένη μια μόνο μονάδα γλυκόζης που είναι συνδεδεμένη με α-1,6 γλυκοζιτικό δεσμό. Το ένζυμο αποδιακλάδωσης ή α-1,6 γλυκοζιδάση (GDE) υδρολύει το γλυκοζιτικό δεσμό α-1,6 απελευθερώνοντας ένα μόριο γλυκόζης. Οι δυο δραστηριότητες αυτές του ενζύμου (της μεταφοράσης και της γλυκοζιδάσης α-1,6) συνυπάρχουν σε μια πρωτεΐνη και ο γενετικός τύπος που την κωδικοποιεί χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 1. Η φωσφογλυκομουτάση μετατρέπει την 1-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Αξίζει να επισημανθεί ότι η 6-φωσφορική γλυκόζη δεν δύναται να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Στο ήπαρ, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, η οποία δεν ανευρίσκεται στους περισσότερους ιστούς, καταλύει τη μετατροπή της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε γλυκόζη, η οποία απελευθερώνεται διατηρώντας τη συνολική ομοιότητα της γλυκόζης του οργανισμού. Το ένζυμο GP ρυθμίζεται αλλοστερικά και με φωσφορυλίωση (Adeva-Andany et al., 2016; Paredes-Flores and Mohiuddin, 2022). Η φωσφορυλάση α είναι η ενεργή μορφή του ενζύμου, ενώ η φωσφορυλάση β η ανενεργή. Δομικές μεταβολές στη μορφή β μετατοπίζουν μια θηλιά κοντά στο ενεργό κέντρο και έτσι παρεμποδίζουν μερικώς την καταλυτική δράση. Αντίθετα, στην μορφή α επέρχεται μετακίνηση της θηλιά με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Στους μύες, το σύστημα ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση από την PhK, προκαλώντας αλλαγή της δομής του ενζύμου της GP με αποτέλεσμα την πρόσβαση στο ενεργό κέντρο φωσφορυλίωσης. Αυξημένα επίπεδα επινεφρίνης ως αποτέλεσμα φόβου, άσκησης, ή ηλεκτρικής διέγερσης μυών συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του ενζύμου (Migocka-Patrzałek and Elias, 2021).



Paint X lite

Εικόνα 2. Συνοπτική απεικόνιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου.

Η μυϊκή GP βρίσκεται στην ενεργό μορφή μόνο όταν η συγκέντρωση της AMP είναι υψηλή ενώ το ATP δρα σαν αρνητικός αλλοστερικός ρυθμιστής. Η μετάπτωση από την μια μορφή (T) στην άλλη (R) ελέγχεται από το ενεργειακό φορτίο ενώ η 6-φωσφορική γλυκόζη ευνοεί την κατάσταση T (Kelsall et al.,2017; Watson et al., 1994). Η φωσφορυλάση β είναι ανενεργός λόγω υψηλής συγκέντρωσης ATP και 6-φωσφορικής γλυκόζης, ωστόσο, η φωσφορυλάση α είναι ενεργός ανεξάρτητα των επιπέδων αυτών των δυο μορίων. Στους μυς σε ηρεμία κυριαρχεί η μορφή β (ανενεργός) ενώ κατά την άσκηση η μορφή α (Migocka-Patrzałek and Elias, 2021). Όσον αφορά την ηπατική GP, σε αντίθεση με την μυϊκή με την οποία έχει 90% ομοιότητα, η κατάσταση α μεταπίπτει στην ανενεργή κατάσταση T από την R όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι υψηλή.

Ωστόσο, το AMP δεν έχει καμία επίπτωση στην ενεργότητα του συγκεκριμένου ενζύμου στο ήπαρ (Rath et al., 2000).

Η επινεφρίνη και η γλυκαγόνη είναι δυο ορμόνες που παίζουν ρόλο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Το ένυσμα για την επαγωγή της αποικοδόμησης του γλυκογόνου είναι η επινεφρίνη (ή αλλιώς αδρεναλίνη), η οποία εκκρίνεται κυρίως ως αποτέλεσμα μυϊκής διέγερσης. Η δράση της συγκεκριμένης ορμόνης επηρεάζει σε μεγαλύτερο ποσοστό τους μυς και λιγότερο το ήπαρ (Moncany and Plas, 1980).

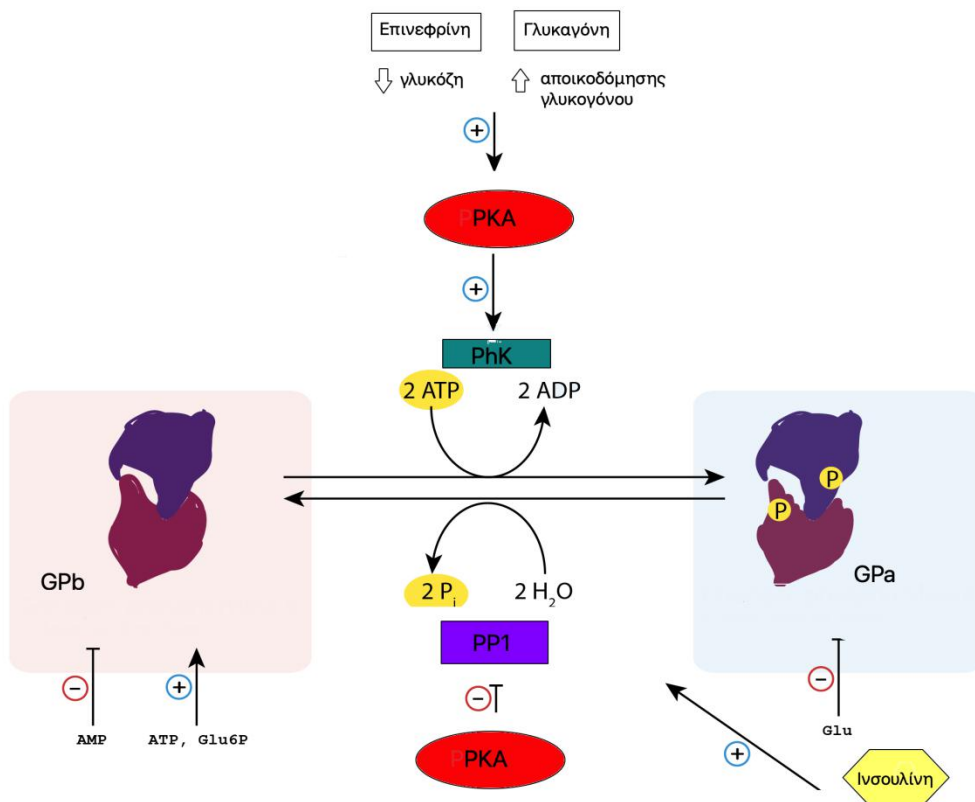
Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου είναι μια διαδικασία, η οποία επιβάλλεται να τερματίζεται πολύ γρήγορα, όταν πλέον δεν είναι απαραίτητη. Με έναν αντίστοιχο καταρράκτη με αυτόν της ενεργοποίησης μπορεί να περιγραφεί και η αποφωσφορυλίωση και απενεργοποίηση της PhK ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιείται η συνθάση του γλυκογόνου. Η μετατροπή της GTP σε GDP είναι μια αντίδραση που λαμβάνει χώρα συνεχώς μέσα στα κύτταρα. Ακόμα, τα κύτταρα μετατρέπουν συνεχώς την cAMP σε AMP. Η πρωτεϊνική κινάση A φωσφορυλίώνει την PhK, καθιστώντας την καταλληλότερο υπόστρωμα για την πρωτεϊνική φωσφατάση 1, η οποία με τη σειρά της αφαιρεί την φωσφορική ομάδα από την GP μετατρέποντας την σε ανενεργή μορφή (Roach et al., 2012). Χωρίς εξωτερικό σήμα οι περισσότερες αντιδράσεις ($GTP \rightarrow GDP$, $cAMP \rightarrow AMP$) οδηγούν προς τα αριστερά και σε απενεργοποίηση των ενζύμων αποικοδόμησης του γλυκογόνου (Llaveró et al., 2021).

Το γλυκογόνο συντίθεται και αποικοδομείται μέσω δύο διαφορετικών βιολογικών διεργασιών. Η ουριδινοδιφωσφορική γλυκόζη (UDP-G) είναι μια ενεργοποιημένη μορφή της γλυκόζης, η οποία χρησιμοποιείται για το σχηματισμό του γλυκογόνου. Ένα ένζυμο σχηματισμού διακλαδώσεων σχηματίζει τους δεσμούς α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ο σχηματισμός διακλαδώσεων είναι σημαντικός γιατί αυξάνει την διαλυτότητα ενώ ταυτόχρονα δημιουργούνται πολλά άκρα, στα οποία μπορεί να δρουν φωσφορυλάσες/αποφωσφορυλάσες. Η συνθάση του γλυκογόνου έχει δυο διαμορφώσεις, την α (ενεργή) και τη β (ανενεργή). Η πρωτεϊνική κινάση A φωσφορυλίώνει τη συνθάση του γλυκογόνου, με αποτέλεσμα να απενεργοποιείται μερικώς (μορφή β). Η ίδια κινάση ελέγχει και την GP (Cross et al., 1995).

Η αποικοδόμηση και η σύνθεση του γλυκογόνου ρυθμίζονται αντίρροπα. Η πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1) αναιρεί τη δράση των πρωτεϊνικών κινασών απομακρύνοντας τη φωσφορική ομάδα από την συνθάση β, η οποία μετατρέπεται στην ενεργό μορφή της συνθάση α και ταυτόχρονα απενεργοποιεί την PhK. Το πλήρες σύμπλοκο της πρωτεϊνικής φωσφατάσης απαρτίζεται από την PP1, τη ρυθμιστική υπομονάδα RGi και τον αναστολέα 1. Η PP1 εμφανίζει αυξημένη συγγένεια με την υπομονάδα R Gi, ενώ ο αναστολέας 1 συνδέεται ισχυρά με την PP1 και την αναστέλλει. Στην περίπτωση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου, η PKA είναι ενεργός. Η φωσφορυλίωση στην υπομονάδα RGi οδηγεί σε ελευθέρωση της PP1. Όταν απελευθερωθεί η PP1 και δεν βρίσκεται σε γεινίαση με το υπόστρωμα της, είναι λιγότερο ενεργός και εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τον αναστολέα 1, ο οποίος όταν φωσφορυλιωθεί συνδέεται με την PP1 και την καθιστά περισσότερο ανενεργή (Petersen et al., 2017). Η ινσουλίνη συμβάλλει στην ενεργοποίηση της διαδικασίας της σύνθεσης του γλυκογόνου ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική φωσφατάση. Όταν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι υψηλά, η ινσουλίνη επάγει την ενεργοποίηση της PP1 φωσφορυλιώνοντας την

υπομονάδα RGi σε μια διαφορετική θέση από αυτή που τροποποιεί η πρωτεϊνική κινάση A (Ragolia et al., 1998).

Το γλυκογόνο αποτελεί μια αποδοτική μορφή αποθήκευσης της γλυκόζης καθώς το 90% των κατάλοιπων γλυκόζης διασπώνται χωρίς δαπάνη ενέργειας-ATP. Το υπόλοιπο 10% των κατάλοιπων των διακλαδώσεων διασπώνται σε γλυκόζη δαπανώντας μόρια ATP. Η πλήρης οξείδωση της γλυκόζης παράγει περίπου 31 μόρια ATP ενώ η συνολική απόδοση της αποθήκευσης είναι εξαιρετικά υψηλή. Τέλος, αξίζει να τονιστεί ότι ο μεταβολισμός του γλυκογόνου στο ήπαρ ελέγχει το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα καθώς η φωσφορυλάση α είναι ένζυμο που δρα σαν αισθητήρας για τη συγκέντρωση της γλυκόζης (Bollen et al., 1998; Browner and Fletterick, 1992).



Εικόνα 3. Διττός μηχανισμός ρύθμισης της δράσης της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (για τη δημιουργία της εικόνας χρησιμοποιήθηκε η σελίδα www.pngwing.com).

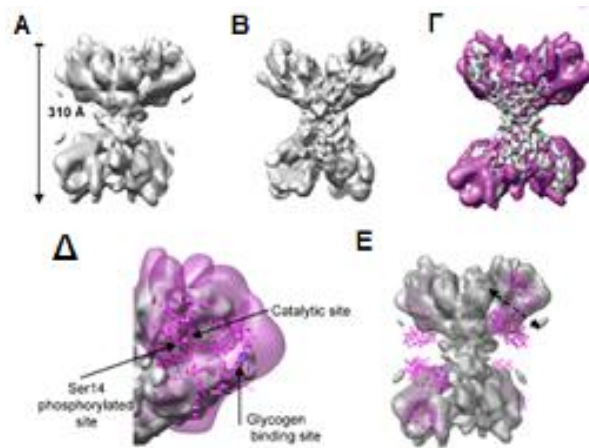
1.2 Βιολογικός ρόλος της κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει 518 γονίδια πρωτεϊνικών κινάσων, που παίζουν σημαντικό ρόλο σε θεμελιώδη για την κυτταρική επιβίωση σηματοδοτικά ή μεταβολικά μονοπάτια. Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα, τα οποία καταλύουν τη μεταφορά μίας φωσφορικής ομάδας από το μόριο ATP στο υδροξύλιο ενός καταλοίπου σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα. Η πλειοψηφία των συγκεκριμένων ενζύμων παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς μια θέση φωσφορυλίωσης όπου υπάρχουν συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα, αναγκαία για την αναγνώριση. Η μεταφορά της φωσφορικής ομάδας εξαρτάται από τον κατάλληλο προσανατολισμό

των δύο υποστρωμάτων, δηλαδή του ATP και της υδροξυλομάδος του αμινοξέος-στόχου, όπου το υδροξύλιο τοποθετείται απέναντι από την μεταφερόμενη φωσφορική ομάδα (Manning et al., 2002). Η PhK ήταν η πρώτη πρωτεϊνική κινάση στην οποία χαρακτηρίστηκε η δράση της και ακολούθησε εν συνεχεία ο καθαρισμός της. Όπως προαναφέρθηκε, η PhK αποτελεί ένα ένζυμο με πρωταρχικό ρόλο που εμπλέκεται στον έλεγχο της αποικοδόμησης του γλυκογόνου, ελεγχόμενη από διαφορετικά μονοπάτια όπως τα επίπεδα της ADP, τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου, την έκκριση ορμονών (π.χ αδρεναλίνη), την πρωτεόλυση και την αλλαγή του pH (Chebotareva et al., 2009; Vénien-Bryan et al., 2002).

Το μόριο της PhK περιλαμβάνει τέσσερις υπομονάδες με στοιχειομετρία (αβγδ)₄ ενώ το συνολικό μοριακό του βάρος είναι $1.3 \cdot 10^6$ Da (Brushia RJ and Walsh, 1999). Η υπομονάδα α της PhK έχει δύο ισομορφές την ηπατική (PHKA) και την μυϊκή (PHKA1), οι οποίες κωδικοποιούνται από δύο ανεξάρτητα γονίδια. Η υπομονάδα β (PHKB) κωδικοποιείται από ένα γονίδιο ενώ οι διαφορετικές ισομορφές της αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Η υπομονάδα γ (PHKG) έχει δύο ισομορφές, την ηπατική (PHKG2) και την μυϊκή (PHKG1), οι οποίες κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια. Τέλος, η υπομονάδα δ χαρακτηρίζεται από συνεχή, καθολική έκφραση και κωδικοποιείται από τα γονίδια CALM1, CALM2 και CALM3 (Adeva-Andany et al., 2016). Η α υπομονάδα αποτελείται από 1237 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 138 kDa ενώ η β υπομονάδα αποτελείται από 1092 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 125 kDa. Η δραστηριότητα του ενζύμου ρυθμίζεται μέσω αυτών των δυο υπομονάδων με φωσφορυλίωση ή αυτοφωσφορυλίωση. Στην υπομονάδα β εντοπίζεται η θέση πρόσδεση της ADP, η οποία συνδέεται με υψηλή συγγένεια αυξάνοντας τη δραστηριότητα της PhK. Η υπομονάδα δ αποτελείται από 148 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 16,7 kDa ενώ η καταλυτική υπομονάδα γ αποτελείται από 386 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 44,7 kDa. Η νευρική διέγερση επιτυγχάνεται από ιόντα ασβεστίου, τα οποία συνδέονται στην υπομονάδα δ, η οποία είναι πανομοιότυπη με την καλμοδουλίνη. Επιπλέον, η σύζευξη της υπομονάδας δ με τα ιόντα ασβεστίου προκαλεί τη σύσπαση των μυών με παράλληλη παραγωγή ενέργειας (Vénien-Bryan et al., 2002). Αξίζει να σημειωθεί ότι η PhK διαφέρει από τις υπόλοιπες κινάσες, οι οποίες ρυθμίζονται από την καλμοδουλίνη, στο γεγονός ότι η υπομονάδα δ προσδέεται στο ολοένζυμο χωρίς να απαιτείται η παρουσία ασβεστίου. Τέλος, η υπομονάδα γ της PhK αποτελείται από μια περιοχή με δράση κινάσης και μια αυτοανασταλούμενη περιοχή που ρυθμίζεται από την πρόσδεση της καλμοδουλίνης (Graves et al., 1999; Priddy et al., 2007).

Η δομή του ολοενζύμου της PhK έχει προσδιοριστεί σύμφωνα με κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία σε ευκρίνεια 9,9 Å. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4, η δομή του συγκεκριμένου ενζύμου μοιάζει με πεταλούδα με δύο λοβούς, οι οποίοι συνδέονται με 2 λοξές γέφυρες. Οι δύο λοβοί ενώνονται με μια γέφυρα που δημιουργείται μεταξύ των αμινοξέων Lys108 και Gly109. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δυο γέφυρες, οι οποίες συνδέουν τους λοβούς αποτελούνται κατά μεγάλο ποσοστό από την υπομονάδα β (Vénien-Bryan et al., 2002; Vénien-Bryan et al., 2009).



Εικόνα 4. Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής της PhK σε συνδυασμό με την GPb. Α) Επιφανειακή απεικόνιση του συμπλόκου PhK/GPb όπου φαίνεται η χαρακτηριστική δομή πεταλούδας. Β) Επιφανειακή απεικόνιση της PhK. Γ) Επιφανειακή απεικόνιση του συμπλόκου PhK/GPb όπου με γκρι απεικονίζεται η PhK και με μοβ η περιοχή που θα καταλάμβανε το σύμπλοκο PhK/GPb Δ) Εστίαση όπου απεικονίζεται το καταλυτικό κέντρο και η θέση πρόσδεσης του γλυκογόνου Ε) Πιθανές θέσεις πρόσδεσης των διμερών GPb στην PhK (Vénien-Bryan et al., 2009).

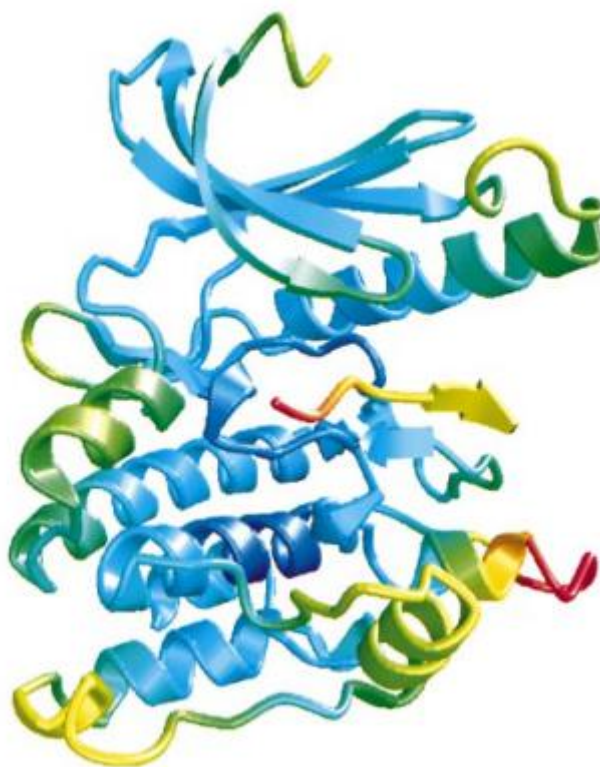
Η δομή της PhK προσδιορίστηκε παρουσία του υποστρώματος της GPb, ιόντων μαγνησίου και ασβεστίου σε pH 8.2, όπου παρατηρήθηκε ότι η GPb προσδένεται στο άκρο των λοβών (Liu et al., 2013). Η δραστηριότητα του ενζύμου αυξάνεται δραματικά με την αύξηση του pH από 6.8 σε 8.2 (Liu et al., 2008). Επιπρόσθετα, η σύγκριση της ανενεργής PhK σε pH 6.8 παρουσία ή/και απουσία ασβεστίου έδειξε ότι το Ca^{2+} επάγει μια αναδιάταξη τόσο στην πυκνότητα του λοβού όσο και της γέφυρας, ενώ δεν επιφέρει αλλαγή στις συνολικές διαστάσεις του ενζύμου (Nadeau et al., 2002).

Η α υπομονάδα της PhK κωδικοποιείται από τα γονίδια PHKA1 και PHKA2, μεταλλάξεις στα οποία οδηγούν στην κατάρρευση όλου του συμπλόκου της PhK (Carrière et al., 2008). Επιπλέον, η α υπομονάδα είναι η πιο ευαίσθητη στην πρωτεόλυση από έναν μεγάλο αριθμό πρωτεασών σε σύγκριση με τις υπόλοιπες υπομονάδες καθώς μεγάλη επιφάνεια της συγκεκριμένης υπομονάδας είναι εκτεθειμένη καθώς οι εξωτερικοί λοβοί συντίθενται από αυτήν. Η παραπάνω υπόθεση στηρίχθηκε στο γεγονός ότι οι θέσεις των επίτοπων για τα μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν την υπομονάδα α (κατάλοιπα 1132-1237) εντοπίζονται στην κορυφή των λοβών (Wilkinson et al., 1997). Τα δομικά αποτελέσματα στηρίζουν την υπόθεση ότι η α υπομονάδα ξεκινάει από την άκρη του λοβού προς το κέντρο του ενζύμου. Τέλος, η καρβόξυ-τελική περιοχή της υπομονάδας α (κατάλοιπα 1060-1237) αλληλεπιδρά με την υπομονάδα γ, μέσω των 724 και 981 αμινοξικών καταλοίπων της (Thompson et al., 2017; Rimmer et al., 2018).

Σημαντικό ρόλο για τη δημιουργία της τεταρτοταγούς δομής της PhK παίζει η υπομονάδα β. Αρχικά, ένας επίτοπος στην υπομονάδα β (κατάλοιπα 708-815) εντοπίζεται σε μια εσωτερική θέση των λοβών κοντά στα σημεία που ενώνονται οι γέφυρες (Vénien-Bryan et al., 2009). Επιπρόσθετα, η στοχευμένη πρωτεόλυση της υπομονάδας α δεν καταστρέφει τις γέφυρες, αντίθετα η πρωτεόλυση των υπομονάδων α και β επάγει τη δημιουργία ενός ενιαίου λοβού χωρίς την παρουσία γεφυρών. Ακόμα, όταν χρησιμοποιείται Li-Br για την επίτευξη της κατακρήμνισης της υπομονάδας β του

ολοενζύμου, παράγεται ένα τριμερές αγδ υπομονάδων, το οποίο στερείται της γέφυρας, κάτι που παρατηρείται και με ηλεκτρονική μικροσκοπία (Wilkinson et al., 1997). Τέλος, υπάρχουν δύο γέφυρες, αλλά τέσσερις υπομονάδες β, υποδεικνύοντας την εμφάνιση του διμερισμού β/β κατά την εσωτερική γεφύρωση των λοβών (Boulatnikov et al., 2008).

Η υπομονάδα γ της PhK είναι η καταλυτική με μοριακή μάζα ~45kDa. Η αμινοξική της αλληλουχία περιέχει 386 αμινοξέα και αποτελείται από δύο διαφορετικές περιοχές: την αμινοτελική επικράτεια αποτελούμενη από (αμινοξικά κατάλοιπα 1-298) με μοριακό βάρος ~30 kDa όπου έχει δράση κινάσης Ser/Thr (kinase domain), και την καρβοξυτελική επικράτεια (ρυθμιστική επικράτεια) αποτελούμενη από (αμινοξικά κατάλοιπα 299-386) η οποία συνδέεται με την υπομονάδα δ. Έχει επιλυθεί η τρισδιάστατη δομή του τριαδικού συμπλόκου με του ενζύμου με ATPNP και πεπτιδικό υπόστρωμα σε ευκρίνεια 2.6Å (Lowe et al., 1997). Η πρωτεϊνική κινάση PhK αποτελείται από 2 λοβούς τον N-αρχικό λοβό και τον C-τελικό λοβό όπου συνδέονται με αλληλουχία εύκαμπτης άρθρωσης αποτελούμενη από τα κατάλοιπα (Lys108-Gly109) σχηματίζοντας την καταλυτική σχισμή. Ο N-αρχικός λοβός αποτελείται κυρίως από β πτυχωτά φύλλα ενώ ο C-τελικός λοβός κυρίως από α έλικες (Lowe et al., 1997). Η εσοχή μεταξύ των 2 λοβών περιλαμβάνει το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 5).



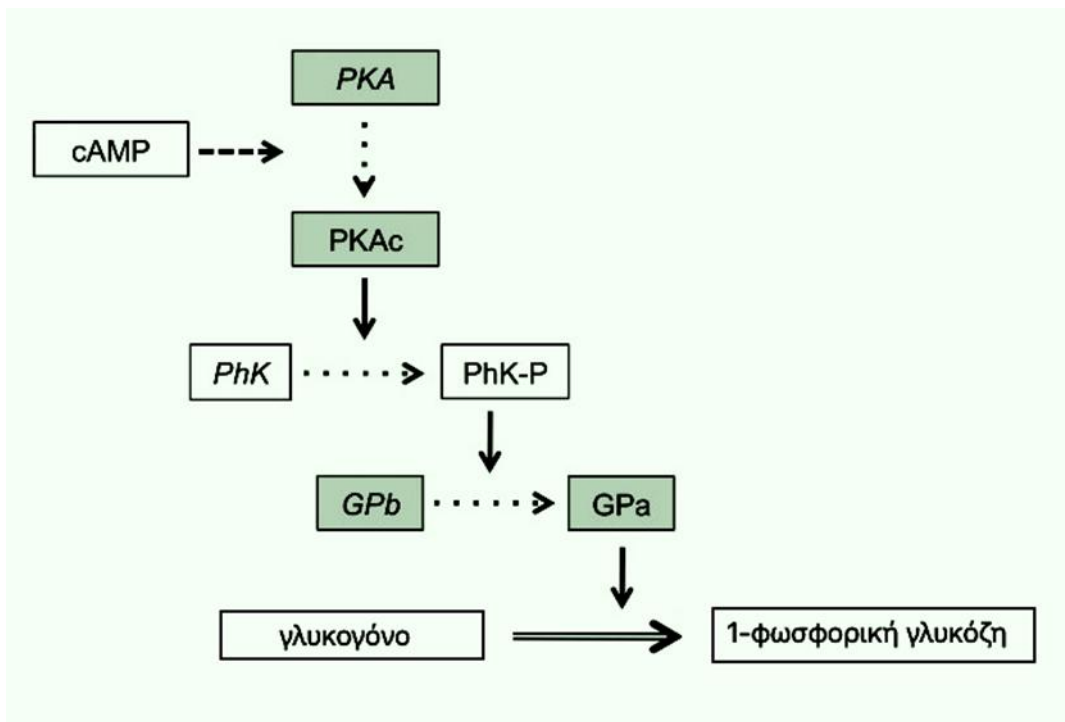
Εικόνα 5: Δομή της καταλυτικής γ-υπομονάδας από σκελετικό μυ κουνελιού (Lowe et al., 1997).

1.3 Ρύθμιση της δραστηριότητας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Η δραστηριότητα της PhK έχει μελετηθεί κυρίως σε θερμοκρασίες κοντά στους 30°C με την ενζυμική δράση της να αυξάνεται μέχρι τη θερμοκρασία των 40 °C, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες ξεκινάει η αδρανοποίηση της (Herrera et al., 2015). Η PhK είναι μια πρωτεϊνική κινάση, η οποία ενεργοποιείται από το AMP και διαδραματίζει ρόλο στην ομοιόσταση των κυττάρων των θηλαστικών καθώς συμβάλλει στη διατήρηση των επιπέδων του μορίου ATP. Η ενεργοποίηση της PhK δεν απαιτεί φωσφορυλίωση στο κέντρο ενεργοποίησης της, με αποτέλεσμα οι ρυθμιστικές υπομονάδες α , β , δ να διατηρούν την ενεργότητα της κινάσης μέχρι να έρθουν τα κατάλληλα σήματα τα οποία αναιρούν την αναστολή. Η ενεργοποίηση της PhK υπόκειται σε αρκετά επίπεδα ελέγχου προκειμένου να διασφαλιστεί η λειτουργία της μόνο όταν αυτή είναι απαραίτητη (Thompson et al., 2017). Το μόνο υπόστρωμα της PhK *in vivo* είναι η GP, ωστόσο, *in vitro* η PhK φωσφορυλιώνει με μειωμένη δραστηριότητα τη συνθάση του γλυκογόνου (GSK), την τροπονίνη I, την τροπονίνη T, τις υπομονάδες α και β καθώς άλλες πρωτεΐνες. *In vitro*, το pH αποτελεί ένα ακόμα ρυθμιστή της δραστηριότητας του συγκεκριμένου ενζύμου (Boulatnikov et al., 2008). Τόσο στο ήπαρ όσο και στους μύες η PhK καταλύει την Ca^{2+} -εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της ανενεργής φωσφορυλάσης β στο κατάλοιπο της σερίνης 14 και την μετατροπή της, στην ενεργή φωσφορυλάση α . Η ενεργή μορφή της φωσφορυλάσης καταλύει την φωσφορυλίωση του γλυκογόνου με αποτέλεσμα την παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης. Το γενικό μοτίβο της αλληλουχίας-στόχου είναι Arg/Lys-X-X-Ser-Val/Ile-Y, όπου X και Y είναι τυχαία αμινοξέα. Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργότητα του ενζύμου αυξάνεται όταν στη θέση του Y είναι η αργινίνη, κάτι που ισχύει στην περίπτωση της GP (Owen et al., 1995).

Η PhK παρουσία ασβεστίου σε pH 6.8 βρέθηκε ότι έχει πολύ μικρή δραστηριότητα ενώ σε pH 8.2 η δραστηριότητα αυξήθηκε σημαντικά, ωστόσο η παρουσία ασβεστίου ήταν απαραίτητη. Αξίζει να αναφερθεί ότι η ρύθμιση της PhK με φωσφορυλίωση ή με μειωμένη πρωτεόλυση επάγει την αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου σε pH 6.8, ενώ εντοπίζεται μικρή αλλαγή στη δραστηριότητα σε pH 8.2 (Liu et al., 2008). Τέλος, η κολοβωμένη μορφή του ενζύμου (PhK γ) έχει αποδειχθεί ότι έχει παρόμοιες κινητικές παραμέτρους με το ολοένζυμο και η δράση της εξαρτάται από μεταλλικά ιόντα, ωστόσο, δεν εξαρτάται από την παρουσία ιόντων ασβεστίου ή καλμοδουλίνης (Owen et al., 1995).

Η ρύθμιση της ενεργότητας του ενζύμου βρίσκεται κάτω από διττό έλεγχο και ελέγχεται με φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία ενεργοποιείται από ένα δεύτερο αγγελιοφόρο την κυκλική 3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) και περαιτέρω από τα ιόντα ασβεστίου (Soundarapandian et al., 2020). Αναλυτικότερα, όταν η αδρεναλίνη συνδεθεί σε έναν υποδοχέα συζευγμένο με G πρωτεΐνες (GPCR) ενεργοποιείται η αδενυλική κυκλάση (AC), η οποία καταλύει την αντίδραση μετατροπής του ATP σε cAMP. Το cAMP ενεργοποιεί την PKA, η οποία φωσφορυλιώνει την PhK, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή της. Με αντίστοιχο μηχανισμό επιδρά και η γλυκαγόνη στη ρύθμιση του συγκεκριμένου ενζύμου (Zhuolun Li, 2016).



Εικόνα 6. Απλοποιημένη απεικόνιση του μηχανισμού ρύθμισης και δράσης της PhK (do Amaral et al., 2013).

1.4 Η κινάση της φωσφορυλάσης ως μεταβολικός θεραπευτικός στόχος

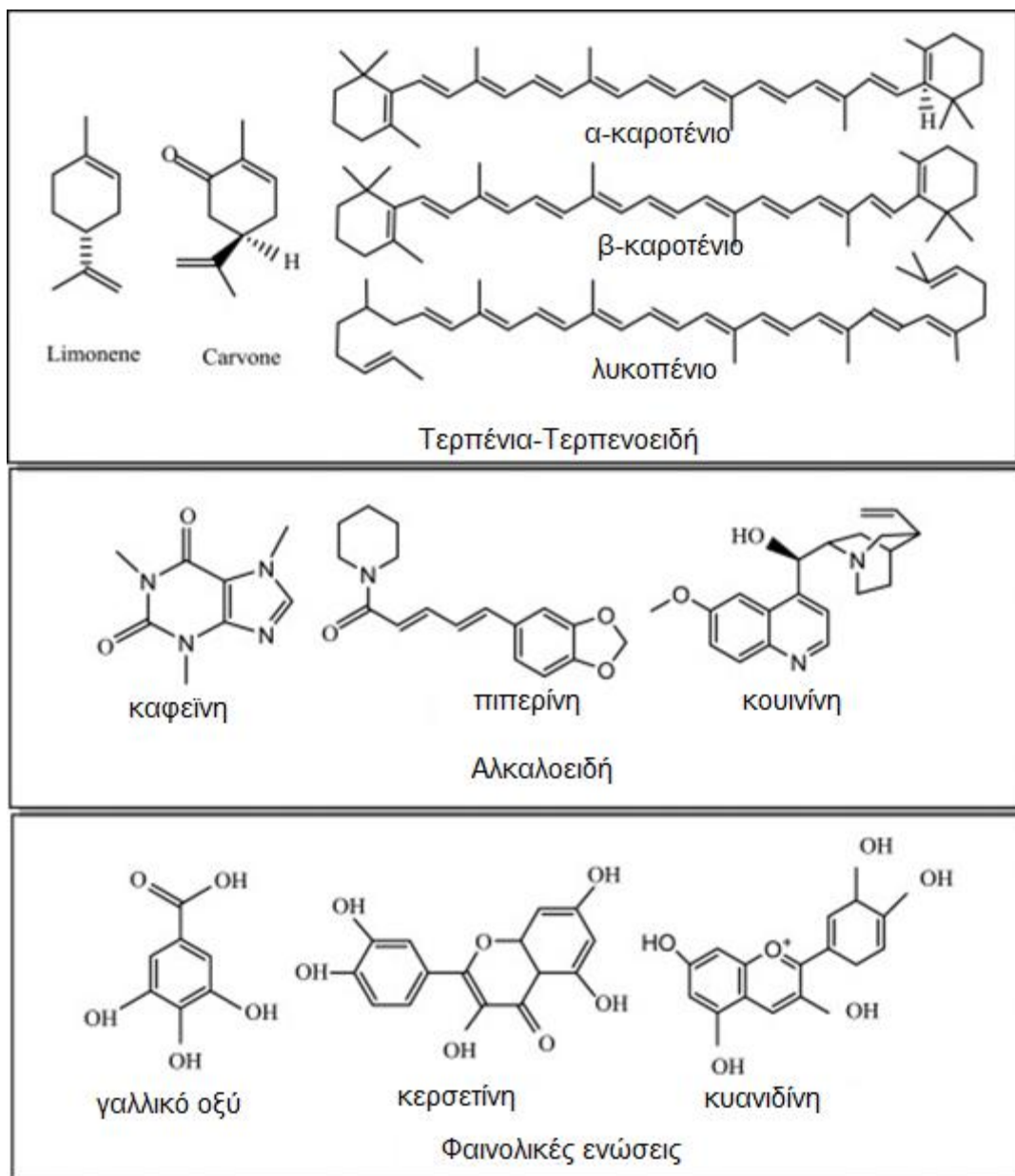
Η ανεπάρκεια της PhK προκαλεί τη νόσο αποθήκευσης γλυκογόνου τύπου IX (glycogen storage disease type IX, GSD IX). Οι δύο τύποι ανεπάρκειας της PhK είναι η ηπατική ανεπάρκεια PhK και η ανεπάρκεια PhK των μυών. Η ηπατική ανεπάρκεια του ενζύμου PhK χαρακτηρίζεται από πρώιμη παιδική εμφάνιση ηπατομεγαλίας, μειωμένη ανάπτυξη, και συχνά, αλλά όχι πάντα, κέτωση νηστείας και υπογλυκαιμία. Η υπογλυκαιμία μπορεί να προληφθεί με τη σύσταση συχνών γευμάτων κατά τη διάρκεια της ημέρας, πλούσια σε σύνθετους υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Όταν υπάρχει υπογλυκαιμία ή κέτωση, το σκεύασμα Polycose® ή ένας χυμός φρούτων χορηγείται από το στόμα με σκοπό την εξισορρόπηση των επιπέδων γλυκόζης. Οι ηπατικές εκδηλώσεις (π.χ. κίρρωση, ηπατική ανεπάρκεια, πυλαία υπέρταση) αντιμετωπίζονται ανάλογα με την εκδήλωση των συμπτωμάτων. Ενώ τα συμπτώματα και οι βιοχημικές ανωμαλίες της ηπατικής ανεπάρκειας PhK πιστεύεται ότι βελτιώνονται με την ηλικία, γίνεται προφανές ότι οι ασθενείς πρέπει να παρακολουθούνται για μακροχρόνιες επιπλοκές όπως η ηπατική ίνωση και η κίρρωση. Η ανεπάρκεια του ενζύμου της PhK των μυών είναι μια πιο σπάνια νόσος και χαρακτηρίζεται από μειωμένη αντοχή στη σωματική άσκηση, μυαλγία, μυϊκές κράμπες, μυοσφαιρινουρία και προοδευτική μυϊκή αδυναμία. Σε αυτή την περίπτωση συστήνεται φυσικοθεραπεία για τη διατήρηση της φυσικής κατάστασης του ατόμου και βελτίωση της δραστηριότητας των μυών ενώ είναι απαραίτητη η τήρηση ενός ειδικού προγράμματος διατροφής, το οποίο θα επιτυγχάνει τη βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα.

Η διάγνωση ανεπάρκειας της PhK πραγματοποιείται με βάση τα κλινικά ευρήματα, το οικογενειακό ιστορικό, την ανίχνευση παραλλαγών των γενετικών τόπων PHKA1, PHKA2, PHKB και PHKG2, οι οποίες προσδιορίζονται με μοριακό γενετικό έλεγχο (Herbert et al., 2011).

Η λειτουργία του ενζύμου της PhK έχει συσχετιστεί κυρίως με νόσους που σχετίζονται με την αποθήκευση του γλυκογόνου αλλά και με μια πληθώρα άλλων ασθενειών όπως η ψωρίαση, ο διαβήτης τύπου 2 καθώς και διάφοροι τύποι καρκίνου (Camus et al., 2012). Ο σχεδιασμός και η αξιολόγηση αναστολέων του συγκεκριμένου ενζύμου, όπως η ινδορουβίνη και ανάλογες με αυτή ενώσεις, έχουν μελετηθεί ως εναλλακτικές αντινεοπλασματικές θεραπείες καθώς μέσα από την παρεμπόδιση της δράσης της PhK επάγουν την ενεργοποίηση του μοναπατιού των κασπασών, το οποίο οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Begum et al., 2015) . Επιπλέον, το ένζυμο της PhK έχει μελετηθεί ως στόχος αντι-αγγειογενεσιακών θεραπειών (Camus et al., 2012). Αξίζει να αναφερθεί ότι οι περισσότεροι αναστολείς του ενζύμου, όπως η κουμαρίνη, φαίνεται να συνδέονται με αυτό στη θέση πρόσδεσης του μορίου ATP. Η δράση της κουμαρίνης ή ανάλογων ενώσεων με αυτή έναντι της PhK έχει αξιολογηθεί ως προς την αντιυπεργλυκαιμική αποτελεσματικότητα της μέσω της παρεμπόδισης της γλυκογονόλυσης στο ήπαρ, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Alexopoulos et al., 2022).

1.5 Βιοδραστικές ενώσεις

Ως βιοδραστική ένωση ονομάζεται το δραστικό συστατικό ενός φαρμάκου, το οποίο έχει μια βιολογική-φαρμακολογική δράση. Συνήθως χρησιμοποιούνται φυτοχημικά ή ζωικά συστατικά με αποδεδειγμένη δράση σε βιολογικά συστήματα, ζώα ή/και ανθρώπους, χωρίς να επεξηγείται εάν η δραστηριότητα είναι επιβλαβής ή ωφέλιμη (Frank et al., 2020). Σημαντικά παραδείγματα βιοδραστικών ενώσεων αποτελούν τα τερπένια, τα αλκαλοειδή και οι φαινολικές ενώσεις. Το παρακάτω σχήμα απεικονίζει τις χημικές δομές των κύριων βιοδραστικών ενώσεων που έχουν ενσωματωθεί σε ενεργές συσκευασίες τα τελευταία χρόνια (Khezerlou and Jafari, 2020).

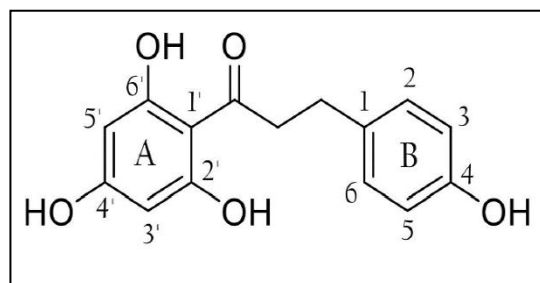


Εικόνα 7. Χημικοί τύποι κύριων βιοδραστικών ενώσεων (Khezerlou and Jafari, 2020).

Οι βιοδραστικές ενώσεις είναι σημαντικές για την ανθρώπινη υγεία καθώς βοηθάνε στη μείωση των παραγόντων κινδύνου για παθήσεις της καρδιάς και για αλλεργίες ενώ παρουσιάζουν συγχρόνως αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Khezerlou and Jafari, 2020). Οι βιοδραστικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική, τη διατροφή και τη χημεία, έχουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και η βελτίωση της σταθερότητας αυτών των ενώσεων έχει κερδίσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον (Rezaei et al., 2019). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά και προστατεύουν τα τρόφιμα από οξειδωτικές βλάβες (Khezerlou and Jafari, 2020).

1.5.1 Φλορετίνη

Η φλορετίνη είναι ένα φυσικό φλαβονοειδές, το οποίο κατατάσσεται στην κατηγορία των διυδροχαλκόνων. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 8, αποτελείται από μια δομή σκελετού C6-C3-C6 (δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται με μια αλυσίδα C3) (Boyer and Liu, 2004; Gosch et al., 2010; Le Marchand et al., 2000). Η φλορετίνη βρίσκεται κυρίως στα φρούτα όπως τα μήλα και τα αχλάδια. Έχει διάφορες φαρμακολογικές και βιολογικές δράσεις, χρήσιμες για την υγεία του ανθρώπου και χρησιμοποιείται ως συστατικό των καλλυντικών (Wang et al., 2014). Η φλορετίνη είναι ένα φαινυλοπροπανοειδές, το οποίο δεν έχει τον ετεροκυκλικό δακτύλιο άνθρακα και τον διπλό δεσμό α-β. Επομένως, αυτή η δομή της φλορετίνης την καθιστά ένα πολύ εύκαμπτο μόριο, το οποίο είναι σε θέση να συνδέεται αποτελεσματικά με βιολογικά μακρομόρια ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης που οδηγούν σε φαρμακολογικές δραστηριότητες. Ανάμεσα σε αυτές τις δραστηριότητες είναι οι αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές, αντικαρκινικές, αντιακές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, οιστρογόνες και αντιστεοκλαστογονικές δράσεις της συγκεκριμένης ένωσης ή/και των παραγώγων της (Chen et al., 2020). Αξίζει να αναφερθεί ότι το ενδιαφέρον των ερευνητών έχουν προσελκύσει οι αντικαρκινικές ιδιότητες του συγκεκριμένου μορίου. Σημαντικός αριθμός μελετών υποστηρίζει ότι η φλορετίνη αναστέλλει την εξάπλωση της ανθρώπινης λευχαιμίας, του καρκίνου των μαστών και της ουροδόχου κύστης (Kobori et al., 1997). Η φλορετίνη ασκεί επίσης ισχυρή ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που προκαλούν τον καρκίνο του ήπατος (Wang et al., 2014). Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι η φλορετίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία τόσο των όγκων όσο και των ασθενειών του ήπατος. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί την τελευταία δεκαετία εκτιμούν ότι μπορεί να αξιοποιηθεί ως ένας ακόμα χημειοθεραπευτικός παράγοντας (Wang et al., 2014).



Εικόνα 8. Χημική σύνθεση της φυσικής ένωσης Phloretin (Crespy et al., 2001).

Η φλορετίνη και τα παράγωγά της παίζουν σπουδαίο ρόλο στους τομείς της ανθρώπινης υγείας και έχουν γίνει το επίκεντρο της έρευνας για τα φυσικά προϊόντα. Αν και πολυάριθμες μελέτες δείχνουν ότι η φλορετίνη έχει αντικαρκινικές δράσεις, ωστόσο η διαλυτότητά της τόσο στα λιπίδια όσο και στο νερό είναι αρκετά χαμηλή κι έτσι ο στόχος της αλληλεπίδρασης της φλορετίνης είναι ασαφής και τα φαρμακοδυναμικά της αποτελέσματα δεν είναι βέλτιστα. Η αναστολή της διαμεμβρανικής μεταφοράς γλυκόζης μέσω των GLUT2 υποδοχέων (που απαντούν στο ήπαρ και στα β κύτταρα του παγκρέατος) είναι μια από τις επιδράσεις της φλορετίνης (Crespy et al., 2001). Επιπλέον, έχουν μελετηθεί οι αντικαρκινικές ιδιότητες των παραγώγων της φλορετίνης, όπως η φλοριζίνη και τα παράγωγά της. Η φλοριζίνη (φλορετίνη-2'-O-γλυκοσίδη) είναι το προϊόν της γλυκοζυλίωσης της φλορετίνης. Ανακαλύφθηκε πριν από περίπου 170 χρόνια, και έχει διερευνηθεί ευρέως στον τομέα της ιατρικής. Ως εκ τούτου, για τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας της φλορετίνης και τη διερεύνηση των αντικαρκινικών δράσεών των παραγώγων της σε σύγκριση με τη δοσεταζάλη,

επιτεύχθηκε η σύνθεση μιας σειράς παραγώγων φλορετίνης. Η αντικαρκινική τους δράση έχει αξιολογηθεί έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων των A549 (κυτταρική σειρά ανθρώπινου καρκίνου του πνεύμονα), SPC-A1 (κυτταρική σειρά ανθρώπινου μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα), EC109 (κυτταρική σειρά ανθρώπινου καρκίνου του οισοφάγου), MCF-7 (κυτταρική σειρά ανθρώπινου αδenoκαρκινώματος μαστού) και MDA-MB-231 (κυτταρική σειρά ανθρώπινου καρκίνου του μαστού) (Wang et al., 2014).

Προηγούμενες μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι η φλορετίνη εμφάνιζε δράση κυτταρικής αντι-τυροσινάσης σε ανθρώπινα επιδερμικά μελανοκύτταρα (Chen et al., 2020). Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι η φλορετίνη αναστέλλει σημαντικά τη δραστηριότητα της τυροσινάσης του μανιταριού *in vitro* και τα παράγωγα ή τα ανάλογα της έχει αποδειχθεί ότι έχουν δράση κατά της τυροσινάσης. Επιπλέον, η φλορετίνη βρέθηκε ότι δρα ως φυσικό υπόστρωμα της πολυφαινολοξειδάσης της ντομάτας με υψηλή συγγένεια (Chen et al., 2020).



Εικόνα 9. Η φλορετίνη αναστέλλει τη δραστηριότητα της τυροσινάσης (Chen et al., 2020).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της δραστηριότητας της φλορετίνης στη δραστηριότητα του ενζύμου της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, έως ένα πρώτο βήμα για τη διερεύνηση του πιθανού θεραπευτικού αποτελέσματος της συγκεκριμένης ένωσης στην ανάπτυξη αντιγλυκαιμικών παραγόντων.

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Υλικά - Όργανα

| Αντιδραστήρια | Εταιρεία |
|--|---------------|
| Glycogen 10 % (w/v) | Sigma Genosys |
| Dodecylsulfate Na salt (SDS) 1% (w/v) | SERVA |
| Διάλυμα φωσφορικών ιόντων (Pi) 1mM, pH= 6.8 | |
| Διάλυμα Adenosine Monophosphate (AMP) 100mM | Sigma Genosys |
| Διάλυμα Adenosine Triphosphate (ATP) 0.5 mM | Sigma Genosys |
| Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης ενζύμου φωσφορυλάσης (GPb), 50:50:1 , pH6.8 (50mM β-φωσφογλυκερόλης (βGP), 50mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA) | |
| Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης αναστολέα, Dimethyl Sulphoxide (DMSO) 2% (v/v) | Applichem |
| Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης της PhK (1x), (Hepes 200mM (4x), BSA 5mg/ml, dH ₂ O) | |
| Απιονισμένο ύδωρ (dH ₂ O) | |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | SERVA |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | Sigma Genosys |
| Calcium Chloride Dehydrate (CaCl ₂) | Merck |
| Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης Hepes 200mM (4x) pH 8.2 | SERVA |
| Magnesium Acetate, (CH ₃ COO) ₂ Mg | Applichem |
| Ρυθμιστικό διάλυμα (Tris), [τρις-(υδροξυμεθύλο)-αμινομεθάνιο]/HCl 0.001 M] | SERVA |
| Phloretin 0,1M in 100% DMSO | Sigma Genosys |
| Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) | Panreac |
| Ρυθμιστικό διάλυμα Triethanolamine (TEA) | Merck |
| Zinc acetate | Sigma Genosys |
| Ammonium molybdate | Sigma Genosys |
| L-AscorbicAcid | Sigma Genosys |
| A-D-Glucoze1-phosphate dipotassium salt hydrate (G1P) | Sigma Genosys |
| Caffeine | Sigma Genosys |
| Διάλυμα κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) 10 ng/μl | |
| Διάλυμα μυικής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP) 1,5 mg/ml | |

| Οργανολογία | Εταιρεία |
|---|----------------------------|
| Υδατόλουτρο-WiseBath | Wisd |
| Φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους UV 1600-PC | VWR |
| Κυψελίδα χαλαζία | Hellma Analytics |
| Δοκιμαστικοί σωλήνες/eppendorf/falcons (15mL) | |
| Ογκομετρικοί κύλινδροι | |
| Αναλυτικός ζυγός gr/mg | Kern |
| Αυτόματες πιπέτες (Gilson όγκων 0,1-2 μl, 2-20 μl, 20-200 μl, 200-1.000 μl) | Gilson, Eppendorf, Labmate |
| Συσκευή vortex | Vortex-Genie 2 |
| Πεχάμετρο (pH), μαγνητικός αναδευτήρας | Metrohm |
| Χρονόμετρο | Cell Signaling, ABSCIEX |
| Καταψύκτης-Πάγος | BIOBASE |
| Συσκευή φιλτραρίσματος | |

2.2 Παρασκευαστικές μέθοδοι

2.2.1 Απομόνωση της γ -καταλυτικής υπομονάδας της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου $rmPhKg_{trunc}$

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, η γ κολοβωμένη υπομονάδα της PhK ($PhKg_{trunc}$) εκφράστηκε μέσω σύζευξης στο N-τελικό άκρο του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST). Για την κατασκευή του πλασμιδίου $pGSTg_{trunc}$ χρησιμοποιήθηκε ο φορέας $pMWg_{trunc}$, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως εκμάγιο για την ενίσχυση της αλληλουχίας $PhKg_{trunc}$ με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) με εκκινητές τους GAMB5 (5'-CACGGATCCCATATGACCCGCGACGCGGCACTG -3') και GAM3C (5'-GGGCTCGAGGCGGGGGCCTCATGCC -3'), οι οποίοι αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma Genosys. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές σχεδιάστηκαν με στόχο να εισάγουν θέσεις περιορισμού για τα περιοριστικά ένζυμα BamH I (5'-άκρο) και Xho I (3'-άκρο) προκειμένου η επιθυμητή αλληλουχία να κλωνοποιηθεί στο φορέα $pGEX-6P-1$ (Amersham, Pharmacia), ο οποίος έφερε αντίστοιχες θέσεις περιορισμού. Η πρωτεΐνη εκφράστηκε σε κύτταρα B834 (DE3) $pLysS$ στους 18°C για χρονικό διάστημα 16 ωρών μετά την επαγωγή με ισοπρόπυλο β -D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG). Στη συνέχεια, ακολούθησε ο καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας με τη χρήση στηλών που είχαν ακινητοποιημένη σε ένα αδρανές υλικό (σεφαρόζη) τη γλουταθειόνη (Amersham, Pharmacia) και η διάσπαση της «ετικέτας» GST από την πρωτεάση 3C. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ένας δεύτερος κύκλος καθαρισμού της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας και τη χρωστικής cibacron blue (Sigma) ενώ ακολούθησε και καθαρισμός με στήλη συγγένειας που περιείχε γλουταθειόνη καθηλωμένη σε σεφαρόζη (Hayes et al., 2011). Στην κινάση ($PhKg_{trunc}$) που απομονώθηκε. Τέλος, εναποτέθηκε ίσος όγκος γλυκερόλης και αποθηκεύτηκε/διατηρήθηκε στους -20°C, 50% γλυκερόλη (v/v).

2.3 Αναλυτικές μέθοδοι

2.3.1 Προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας της $rmPhKg_{trunc}$

Προσδιορισμός ειδικής δραστηριότητας της PhK

Η ειδική δραστηριότητα ενός ενζύμου (specific activity, $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) είναι μέγεθος που μετρά την ποσότητα, αλλά και την δραστηριότητα του. Ορίζεται ως τα mg του ενζύμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 min σε καθορισμένες συνθήκες. Για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας της $PhKg$ χρησιμοποιούμε έμμεση μέθοδο που στηρίζεται στη μέτρηση της ειδικής δραστηριότητας της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου προς την κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου.

Προσδιορισμός σταθεράς Michaelis-Menten (Km)

Κατά την διαδικασία απομονώνεται η κολοβωμένη γ -καταλυτική υπομονάδα της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου ($\text{rmPhKg}_{\text{trunc}}$) και υποβάλλεται σε ενζυμική κινητική μελέτη με σκοπό τον υπολογισμό της σταθεράς συγγένειας μεταξύ ενζύμου-υποστρώματος (K_m , Michaelis-Menten, V_{max}). Προκειμένου να εφαρμοστούν οι κινητικές μελέτες της PhK προετοιμάστηκαν ορισμένα ρυθμιστικά διαλύματα. Ακολούθως, η αραίωση της κινάσης PhK γίνεται με διάλυμα BSA 10mg/ml, Tris 200mM pH 8,2. Η τελική συγκέντρωση της στην αντίδραση είναι BSA 5mg/ml και του Tris 2mM. Στο ενζυμικό διάλυμα εμπεριέχεται και μια «μεταφορική πρωτεΐνη» η BSA ώστε να αποτραπεί η προσκόλληση της κινάσης ($\text{rmPhKg}_{\text{trunc}}$) στα τοιχώματα του δοκιμαστικού σωλήνα κατά τη διαδικασία του πειράματος. Ομοίως η αραίωση της φωσφορυλάσης GPb γίνεται σε διάλυμα 50:50:1 (50 mM β -φωσφογλυκερόλης, 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλης, 1 mM EDTA, 0.5 mM διθειοθρεϊτόλης), pH 6,8. Τέλος, ακολουθεί παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer 4x (Tris/HCl 200 mM, Hepes 200 mM, CaCl_2 2 mM, DTT 8 mM, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ 40 mM), pH 8,2 καθώς και του ρυθμιστικού διαλύματος TEA buffer (100mM TEA, 1mM EDTA, 2mM DTT), pH 6.8.

Παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα:

Buffer Hepes (4x), pH 8,2

- 200mM Tris/HCl (Tris (υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο)
- 200mM Hepes (4- (2-υδροξυαιθυλο) -1-πιπεραζινο-αιθανοσουλφονικό οξύ)
- 2mM CaCl_2 (Χλωριούχο ασβέστιο)
- 8mM DTT (Διθειοθρεϊτόλη)
- 40mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ (Οξικό μαγνήσιο)
- Με τελικό όγκο 20ml

Buffer αραίωσης κινάσης / Buffer (4x) \rightarrow (1x)

- BSA 10mg/ml \rightarrow 5mg/ml
- 200mM Tris/HCl (Tris (υδροξυμέθυλο)-αμινομεθάνιο)
- 200mM Hepes(4- (2-υδροξυαιθυλο) -1-πιπεραζινο-αιθανοσουλφονικό οξύ)
- 2mM CaCl_2 (Χλωριούχο ασβέστιο)
- 8mM DTT (Διθειοθρεϊτόλη)
- 40mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ (Οξικό μαγνήσιο)

Buffer TEA/Stop Buffer, pH 6,8

- 100mM TEA (stock 6,79M) Τριαιθανολαμίνη
- 1mM EDTA (stock 0,1M) Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
- 2mM DTT (Stock 200mM) Διθειοθρεϊτόλη
- Με τελικό όγκο 1L

Κινητικές μελέτες εφαρμόστηκαν αρχικά προκειμένου να βρεθούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις PhK και GPb που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα ελέγχου. Συγκεκριμένα, η βέλτιστη συγκέντρωση $\text{rmPhKg}_{\text{trunc}}$ επιβεβαιώθηκε μετά από δοκιμή 6 διαφορετικών συγκεντρώσεων 10 ng/μl, 2 ng/μl, 5 ng/μl, 1 ng/μl, 0,1 ng/μl και 0,5 ng/μl με το ATP να βρίσκεται σε κορεσμό (0.5 mM) και η τελική συγκέντρωση φωσφορυλάσης GPb να είναι στα 1,5 mg/ml. Στην συνέχεια, με βάση τις

απορροφήσεις που προέκυψαν από τη φωτομέτρηση στα 850nm, επιλέχθηκε πως η βέλτιστη συγκέντρωση της $rmPhkg$ θα πρέπει να είναι 1ng/μl. Οι αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

| Συστατικά | Αρχικές Συγκεντρώσεις | Τελικές Συγκεντρώσεις |
|-----------------|-----------------------|--|
| rmGPb | 75mg/ml | 1,5mg/ml, 0,5mg/ml, 2mg/ml |
| ATP | 0,1 M | 0,5mM |
| Hepes Buffer 4x | 4x | 1x |
| rmPhkgtrunc | 1,95mg/ml | 10 ng/μl, 2 ng/μl, 5 ng/μl, 1 ng/μl, 0,1 ng/μl και 0,5 ng/μl |

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης

Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σε σταθερή θερμοκρασία 30°C σε υδατόλουτρο. Ο όγκος των υποστρωμάτων της αντίδρασης ήταν συνολικά 200μL και περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (Hepes buffer), φωσφορυλάση του γλυκογόνου (rmGPb), και ATP. Τα υποστρώματα επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 30°C για 2-3 λεπτά. Μετά την επώαση, η αντίδραση αρχίζει με την ενσωμάτωση 20μL διαλύματος Phkg. Οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η δοκιμασία είναι: 200mM Tris/HCl pH 8,2, 200mM Hepes, 2mM CaCl₂, 8mM DTT, 40mM (CH₃COO)₂Mg, 5mg/ml BSA, 0,5mg/ml Gpb, ATP 0,5mM και PhKg 1ng/μl.

Κατόπιν, σε χρονικά διαστήματα 3min-6min-9min-12min, λαμβάνονται 20μL από τα υποστρώματα και αραιώνονται 50 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα (TEA buffer/Stop buffer). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνονται 2 πράγματα: το πρώτο είναι να σταματήσει η αντίδραση γεγονός που επιτυγχάνεται αραιώνοντας το ένζυμο, ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται αλλαγή του pH 8,2 σε 6,8 pH (ιδανικό pH για τη GPα), σταματώντας τη δράση του ενζύμου Phk καθώς το συγκεκριμένο ένζυμο έχει βέλτιστες ιδιότητες σε pH 8,2. Εν συνεχεία, προσδιορίζεται η ενζυμική δραστηριότητα της GPα - προϊόν της αντίδρασης- της PhKg. Στους ακόλουθους δυο πίνακες, παρατίθενται τα συστατικά που χρησιμοποιούνται στις ενζυματικές μελέτες ελέγχου καθώς και ο ρόλος τους.

| | |
|--------------------------|--|
| GPb | Μετατρέπεται σε GPα στην 1 ^η φάση της αντίδρασης και στη 2 ^η φάση πλέον (ως GPα) ενσωματώνει την G1P στο μόριο του γλυκογόνου προς σχηματισμό Glycogen(n+1) και Pi |
| ATP | Υπόστρωμα της κινάσης για τη μεταφορά γ-φωσφορικής ομάδας και τη φωσφορυλίωση της GPb |
| Buffer4x/Buffer Hepes | Tris 200mM pH 8,2, Hepes 200mM, CaCl ₂ 2mM, DTT 8mM, (CH ₃ COO) ₂ Mg 40Mm |
| PhK | Επάγει τη μετατροπή από την ανενεργό GPb στην ενεργό GPα μέσω φωσφορυλίωσης της Ser14 |

Πίνακας 2: Πρώτη Αντίδραση - Υπόστρωμα rmPhKg

| | |
|----------|--|
| G1P | Ενώνεται με το υπόστρωμα προς απόδοση Glycogen(n+1) και Pi από την GPα |
| Glycogen | Μετατρέπεται σε Glycogen(n+1) και Pi από την GPα |

| | |
|--------------|--|
| Caffeine/AMP | H Caffeine/AMP αφήνει ενεργό μόνο την GP _a και αναστέλλει τελείως την GP _b . Το AMP ενεργοποιεί πλήρως την μυική GP. |
|--------------|--|

Πίνακας 3: Δεύτερη Αντίδραση - Υπόστρωμα rmGP

Στο πρώτο βήμα παρασκευάζονται σε σωληνάκια τα ενζυμικά δείγματα με τελευταία την προσθήκη του ATP και επωάζονται (ώστε να γίνει η σύνδεση της κινάσης με τη φωσφορυλάση), σε υδατόλουτρο 30°C για περίπου 2-3 λεπτά. Στο μεταξύ προκαλείται ήπια ανακίνηση χτυπώντας μαλακά τον πάτο του σωλήνα κάθε φορά με το χέρι για την καλύτερη ανάμειξη των συστατικών. Σε κάθε περίπτωση, το ένζυμο κινάση (20μL) πρέπει να προστίθεται τελευταίο καθώς με αυτό τον τρόπο αρχίζει η αντίδραση. Στον Πίνακα 4 παραθέτονται οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της πρώτης αντίδρασης.

| | | | | |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|
| rmGP _b | 0,5mg/ml | 0,5mg/ml | 0,5mg/ml | 0,5mg/ml |
| ATP | 0,5mM | 0,5mM | 0,5mM | 0,5mM |
| Buffer4x | 1x | 1x | 1x | 1x |
| rmPhkg _{trunc} | 1ng/μl | 1ng/μl | 1ng/μl | 1ng/μl |

Πίνακας 4: Τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της πρώτης αντίδρασης

Το μίγμα της πρώτης αντίδρασης είχε τελικό όγκο 200μL. Κάθε τρία λεπτά δείγματα των 20μL λαμβάνονται από το μίγμα και εισάγονται σε eppendorf tubes που περιέχουν 980μL διάλυμα TEA, τα οποία διατηρούνταν στους 0°C (λουτρό-πάγου).

Η κινητική σταθερά Michaelis-Menten (K_m , mol), χρησιμοποιείται ως μέτρο της σχέσης σύνδεσης του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος που ισούται με το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας (V_{max}) πολλών ενζυμικών αντιδράσεων. Ο προσδιορισμός γίνεται με κινητική δοκιμή του ένζυμου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος.

Ο ενζυμικός προσδιορισμός στις κινητικές μελέτες της PhK_g γίνεται μέσω δύο σταδίων, που το κάθε ένα αποτελείται από δύο διαφορετικές αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση, του πρώτου σταδίου, η κινάση φωσφορυλάσης (PhK) με υπόστρωμα το ATP φωσφορυλιώνει την φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) μετατρέποντάς την από την ανενεργό μορφή «β» στην ενεργό μορφή «α». Η πρώτη αντίδραση τερματίζεται μέσω αραίωσης 20μL της αντίδρασης, σε 980μL TEA buffer με ταυτόχρονα ήπια ανάδευση. Στην συνέχεια, προστίθενται 100μL από την εν λόγω αντίδραση στην δεύτερη αντίδραση (δεύτερο στάδιο).

rabbit muscle Glycogen Phosphorylase b

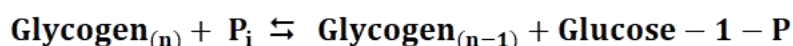


rabbit muscle Phosphorylase Kinase(Ser14)

rabbit muscle Glycogen Phosphorylase a

2.3.2 Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της GPα

Κατά το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης πραγματοποιείται προσδιορισμός της δραστηριότητας της GPα. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει την φωσφορολυτική αντίδραση αποικοδόμησης του γλυκογόνου $\text{Glycogen}_{(n)}$, προς απόδοση $\text{Glycogen}_{(n-1)}$ και glucose-1-P (G1P).



Η αντίστροφη πορεία της παραπάνω αντίδρασης ακολουθείται κατά την δεύτερη αντίδραση του assay, δηλαδή γίνεται ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο πολυμερές του γλυκογόνου με αποτέλεσμα να προκύπτει γλυκογόνο με ένα ή/και περισσότερα κατάλοιπα γλυκόζης, όπου έχουμε και ταυτόχρονη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών (P_i) από την G1P. Με φασματοφωτομέτρηση αυτών των ιόντων και ποσοτικό προσδιορισμό με τη μέθοδο ασκορβικού οξέος μετράμε την απορρόφηση στα 850nm που προκαλεί το σύμπλοκο με το φωσφορικό. Το τέλος της αντίδραση επιτυγχάνεται με εναπόθεση 40 μL , της δεύτερης αντίδρασης, σε 10 μL SDS 1% (w/v) και επακολουθεί ισχυρή μηχανική δίνη με χρήση vortex.

Αναλυτικότερα, στο επόμενο στάδιο της αντίδρασης, λαμβάνονται 100 μL από το διάλυμα αραίωσης (TEA) και εναποτίθενται στο δεύτερο υπόστρωμα όγκου 100 μL μίγματος που εμπεριείχε -τελικές ποσότητες- AMP 20 μM , G1P 20mM, Glycogen 0,4% και Caffeine 1mM μετά από επώαση του τελευταίου για ~3min σε ορισμένη θερμοκρασία 30°C. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η σύσταση του G1Pmix.

| Αρχικές ποσότητες και συγκεντρώσεις | Τελικές συγκεντρώσεις (Final) |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| G1P 400mM | G1P 20mM |
| Glycogen 10% (w/v) | Glycogen 0,4% (w/v) |
| Caffeine 50mM | Caffeine 1mM |
| AMP 0,1M | AMP 20 μM |
| Προσθήκη dH ₂ O | dH ₂ O 8,980 |
| Τελικός όγκος | 10ml |

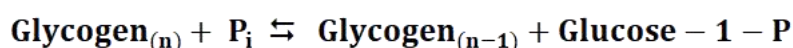
Πίνακας 5: Τρόπος παρασκευής G1P 20mM, από G1P 400mM

Μετά το πέρας των ακολουθιών και της δεύτερης αντίδρασης, 40 μL του συγκεκριμένου μίγματος μεταφέρονται σε 10 μL διαλύματος SDS 1% (w/v) (παρουσία απορρυπαντικού τα ένζυμα αποδιατάσσονται και καθίστανται αδρανή). Το επόμενο βήμα ήταν φασματοφωτομετρικός

προσδιορισμός των ορθοφωσφορικών (Pi), που είναι το προϊόν της αντίδρασης, με τη χρήση της μεθόδου ασκορβικού οξέος. Εκτός από τα δείγματα, έγινε προσδιορισμός και σε τυφλούς μάρτυρες, που περιείχαν μόνο SDS και ορθοφωσφορικά (Pi). Για το μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε τυφλός μάρτυρας που περιείχε SDS και dH₂O. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός φωσφόρου (προϊόν αντίδρασης) στα δείγματα γίνεται προσθέτοντας 700mL διαλύματος ασκορβικού οξέος σε κάθε δείγμα, με την μέθοδο που περιεγράφηκε παρακάτω. Αφού επώασθηκαν για 15min μετρήθηκε η απορρόφηση στα 850nm. Για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκε τετράγωνη κυψελίδα χαλαζία-κρυσταλλικό πυρίτιο- διαστάσεως 1cm. Τα τυφλά φωσφορικών (10μL SDS 1%w/v + 10μL Pi 1mM + 30μL dH₂O) προσδιορίζονται πάντα τελευταία.

2.3.3 Προσδιορισμός φωσφορικών ιόντων-Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Η αρχή του πειράματος εκμεταλλεύεται την αντίθετη από την κάτωθι αντίδραση :



Με επίδραση του ενζύμου φωσφορυλάση (GP), μόρια της 1-φωσφορικής γλυκόζης προστίθενται στο γλυκογόνο και παράγονται ορθοφωσφορικά ιόντα (Pi) των οποίων είναι δυνατή η φωτομέτρηση. Η φασματοφωτομετρία, ως μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού διαφόρων ουσιών, στηρίζεται στη μέτρηση της σχετικής απορρόφησης ακτινοβολίας που περνά από διάλυμα ουσίας, και από αυτήν την μέτρηση γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της επιθυμητής ουσίας προς προσδιορισμό. Τα ορθοφωσφορικά αντιδρούν με σύμπλοκα, όπως το μολυβδαινικό αμμώνιο (ammonium molybdate) και δίνουν ενώσεις όπου απορροφούν στο ορατό και υπεριώδες τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Αν σε δείγμα που περιέχει ανιόντα προστεθεί ammonium molybdate προκύπτουν πράσινου χρώματος σύμπλοκα, τα οποία παρουσιάζουν απορρόφηση σε ένα μήκος κύματος 850 nm (Saheki et al, 1985).

Υλικά:

- Διάλυμα μολυβδαινίου, V_{τελ}=80ml. Το διάλυμα αποτελείται από μολυβδαινικό αμμώνιο (Ammonium molybdate 1.5gr) 15 mM και οξικό ψευδάργυρο (Zinc acetate 1.75gr) 100 mM σε τελικό όγκο 80 ml με την προσθήκη αποσταγμένου νερού. Η ρύθμιση του pH σε pH 5.0 γίνεται με ατμίζων HCl 10M.
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος (L-Ascorbic Acid) 10% (w/v). Διάλουμε 2gr σε V_{τελ}=20ml αποσταγμένου ύδατος και αναδεύουμε με μαγνητάκι ανάδευσης μέχρις ομογενοποίησης. Η ρύθμιση του pH σε pH 5.0 γίνεται με NaOH 10M.

Διαδικασία:

Τα διαλύματα ρυθμίζονται σε pH 5 το διάλυμα ασκορβικού οξέος, με χρήση πυκνού NaOH και το διάλυμα μολυβδαινίου με χρήση πυκνού HCl, και αποθηκεύονται σε αδιαφανή γυάλινα σκουρόχρωμα δοχεία στους 4°C. Η ρύθμιση του pH είναι απαραίτητη ώστε να αποφεύχουν ανεπιθύμητες παραλληλες αντιδράσεις.

Με ανάμιξη των διαλυμάτων μολυβδαινίου προς ασκορβικού οξέος με αναλογία όγκου 4:1 αντίστοιχα προκύπτει το τελικό αντιδραστήριο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετά από 15

λεπτά και μέχρι την χρήση του φυλάσσεται μακριά από το φως.

Από την κινητική μελέτη προκύπτουν δείγματα στα οποία προστίθενται 700μl από το διάλυμα φωτομέτρησης και επέρχεται ισχυρή μηχανική ανάδευση (vortex). Η προθέρμανσή των δειγμάτων γίνεται για 15' στους 30°C και ακολουθεί η φωτομέτρηση σε ένα μήκος κύματος 850 nm.

2.3.4 Προσδιορισμός σταθεράς IC_{50} του αναστολέα Phloretin έναντι της PhK α

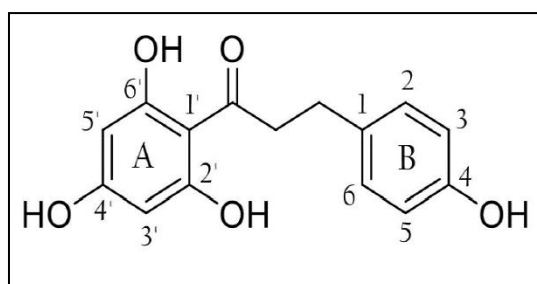
Η επεξεργασία κινητικών πειραματικών δεδομένων έγινε με τη βοήθεια υπολογιστικού προγράμματος Grafit.

Ο υπολογισμός της σταθεράς IC_{50} έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{ποσοστό αναστολής} = \frac{sa_{\text{control}} - sa_i}{sa_{\text{control}}} * 100\%$$

Αυτά μετατρεπόμενα σε ποσοστά δραστηριότητας εισάγονται στο GraFit για εξαγωγή της γραφικής παράστασης $\text{ποσοστό αναστολής} = f[I]$, από την οποία προσδιορίζεται η IC_{50} ως η συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί μείωση της ενεργότητας του ενζύμου στο 50 %. Η αποδοχή της προσδιοριζόμενης τιμής επιβεβαιώνεται από την ύπαρξη τιμών εκατέρωθεν αυτής που δίνουν μείωση από 10%-50% και 50%-90%.

Ο υπολογισμός της IC_{50} προαπαιτεί κινητική μελέτη του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή του IC_{50} και για συγκεκριμένη συγκέντρωση υποστρώματος ATP. Στην παρούσα διπλωματική εξετάστηκε ο αναστολέας, με την ονομασία Φλορετίνη η οποία είναι ένα φυσικό φλαβονοειδές. Διάφορες συγκεντρώσεις της ένωσης που δοκιμάστηκαν για τον προσδιορισμό της IC_{50} , συγκεκριμένα ήταν: 2μM, 8μM, 20μM, 40μM. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η χημική δομή της ένωσης που μελετάται.



Εικόνα 10: Δομή της ένωσης Phloretin που εξετάστηκε για την εκτίμηση της ανασταλτικής της δράσης έναντι της $mPhK_{\text{trunc}}$ (Crespy et al., 2001).

Για το σκοπό του πειράματος και τον προσδιορισμό της IC_{50} του αναστολέα έγιναν κινητικές μελέτες σε προτεινόμενη συγκέντρωση (50μM) Phr. Οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνουν χώρα οι αντιδράσεις είναι: αναστολέας Phr 50μM, ATP 0,5mM, $mGPb$ 0,5mg/ml, PhK 1ng/μl. Παράλληλα,

παρήχθησαν (control) x2 -τυφλού μάρτυρα- όπου αντί για αναστολέα Phr εισήχθη ίσος όγκος DMSO 2% (v/v). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιζόμενη θερμοκρασία 30°C που επιτυγχάνεται με χρήση υδατόλουτρου και ο συνολικός όγκος της ενζυμικής αντίδρασης ήταν 200 μL. Παρασκευάστηκαν υποστρώματα όγκου 150 μL, ρυθμιστικού διαλύματος αντίδρασης (4x buffer) και φωσφορυλάση του γλυκογόνου (rmGPb). Επιπροσθέτως, εισήχθη αναστολέας Phr 4μL, ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος DMSO να είναι 2% και τέλος γίνεται η ένθεση 13,2 μL ATP με τελική συγκέντρωση 0,5mM τα οποία επώαστηκαν για 3 λεπτά στους 30°C πριν ξεκινήσει η αντίδραση με την προσθήκη 20μL PhK. Στους ακόλουθους πίνακες (Πίνακες 6,7) φαίνονται οι αναλογίες των υποστρωμάτων και των συστατικών της αντίδρασης.

| | | | | | | |
|---|-----------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Control | Control | 2μM | 8μM | 20μM | 40μM |
| DMSO 2% | 4μl | 4μl | - | - | - | - |
| αναστολέας | - | - | 4μl (100μM σε 100%) | 4μl (400μM σε 100%) | 4μl (1mM σε 100%) | 4μl (2mM σε 100%) |
| H ₂ O | 26μl H ₂ O | 26μl H ₂ O | 26μl H ₂ O | 26μl H ₂ O | 26μl H ₂ O | 26μl H ₂ O |
| Mix (buffer4x,rmGPb,ATP, dH ₂ O) | 150μl mix | 150μl mix | 150μl mix | 150μl mix | 150μl mix | 150μl mix |
| κινάση | 20μl | 20μl | 20μl | 20μl | 20μl | 20μl |

Πίνακας 6: Ποσότητες των υποστρωμάτων

| Συστατικά | Αρχικές Συγκεντρώσεις | Τελικές Συγκεντρώσεις |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| rmGPb | 75mg/ml | 0,5mg/ml |
| ATP | 0,1 M | 0,5mM |
| Hepes Buffer 4x | 4x | 1x |

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις των συστατικών της αντίδρασης

Σε μια σειρά πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν πυκνά stock συγκεντρώσεων του αναστολέα Phloretin:2mM (σε 100% DMSO), 100μM (σε 100% DMSO), 400μM (σε 100% DMSO) και 1mM (σε 100% DMSO), όπου υπόκεινται σε αραιώση ώστε με λήψη 4μl από αυτά, να έχουμε τελική συγκέντρωση του αναστολέα: 2μM, 8μM, 20μM και 40μM αντίστοιχα. Η αντίδραση διεξήχθη σε σταθερή θερμοκρασία 30°C με χρήση υδατόλουτρου. Ο συνολικός όγκος των υποστρωμάτων ήταν 200μL και περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (buffer αραιώσης αναστολέων DMSO), H₂O, mix το οποίο εμπεριέχει GPb φωσφορυλάση του γλυκογόνου, ATP τριφωσφορική αδενοσίνη, buffer 4x και H₂O καθώς και διάφορες συγκεντρώσεις αναστολέα (controlx2 - 2μM- 8μM- 20μM- 40μM). Ο χρόνος επώασης των υποστρωμάτων στο υδατόλουτρο στους 30°C -προκειμένου να γίνει σύνδεση ενζύμων- ήταν 3' λεπτά. Η προσθήκη 20μL διαλύματος Phkg που γίνεται μετά την επώαση καθορίζει την έναρξη της αντίδρασης.

Σε αυτό το σημείο, κάθε 3 λεπτά πάρθηκαν δείγματα των 20 μL από το μίγμα της αντίδρασης και εισάχθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 980 μL διάλυμα TEA, τα οποία διατηρούνταν σε χαμηλή θερμοκρασία με τη χρήση λουτρού-πάγου. Το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης, έγινε με λήψη 100 μL του διαλύματος TEA και προσθήκη 100μL διαλύματος που εμπεριέχει AMP 20μM, G1P 20mM, Glycogen 0,4% και Caffeine 1mM (τελικές συγκεντρώσεις), τα οποία επώαστηκαν προηγουμένως στους 30°C επί ~3 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση και της δεύτερης αντίδρασης, 40 μL του συγκεκριμένου μίγματος προστέθηκαν σε 10 μL διαλύματος SDS 1% (w/v), διότι παρουσία απορρυπαντικού τα ένζυμα αποδιατάσσονται και καθίστανται αδρανή. Για μεγαλύτερη σιγουριά

έγινε χρήση vortex για την ανάδευση ώστε να επιτευχθεί η ολοκληρωτική αποδιάταξη των ενζύμων. Τέλος, με τεχνικές που διαθέτουμε στο εργαστήριο γίνεται προσδιορισμός ορθοφωσφορικών ιόντων -προϊόν της αντίδρασης- με φασματοφωτομετρία, με τη μέθοδο ανάλυσης διαλύματος ασκορβικού οξέος. Για μηδενισμό του φωτόμετρου χρησιμοποιήθηκε τυφλός μάρτυρας που περιείχε SDS και dH₂O. Πέρα από τα δείγματα, έγινε προσδιορισμός και σε τυφλούς μάρτυρες, που περιείχαν μόνο SDS και ορθοφωσφορικά (Pi).

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Με τον όρο IC_{50} (half maximal inhibitory concentration), ορίζεται η τιμή της συγκέντρωσης του αναστολέα που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου στο 50%. Κατά τον πειραματικό προσδιορισμό της, πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν ότι η τιμή της IC_{50} εξαρτάται και από την συγκέντρωση του ενζύμου, και από την συγκέντρωση του αναστολέα και από την συγκέντρωση του υποστρώματος αλλά και από τις συνθήκες όπου διενεργείται το πείραμα (Cer et al., 2009).

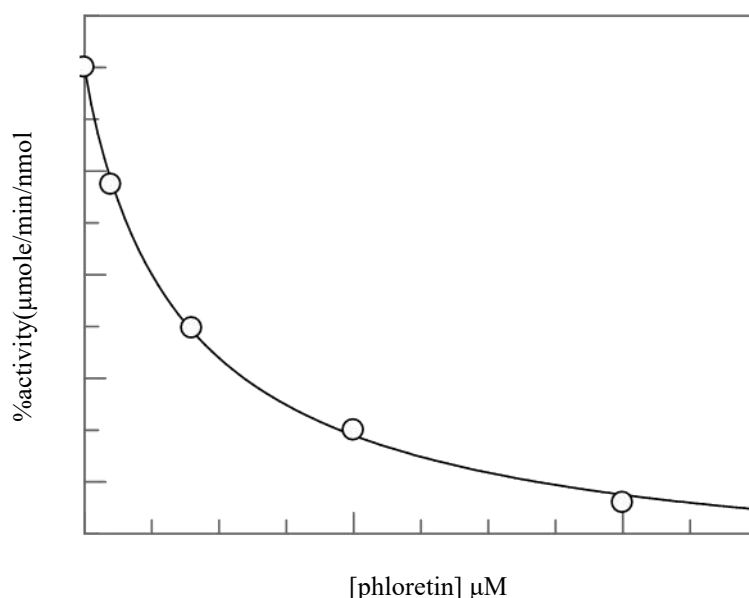
Η ανάλυση από τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων καθώς και η τέλεση των γραφημάτων έγινε με το πρόγραμμα Grafit.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα από το πρόγραμμα GraFit

| Συγκέντρωση αναστολέα (μM) | Δραστηριότητα αναστολέα: V_0 (μmol/min/nmol) | % activity |
|----------------------------|---|------------|
| 0 | 1,99 | 100 |
| 2 | 1,54 | 77,4 |
| 8 | 0,99 | 49,7 |
| 20 | 0,6055 | 30 |
| 40 | 0,32 | 16 |

Πίνακας 9: Υπολογισμός της τιμής IC_{50}

| Parameter | Value | Std.Error |
|-----------|-------|-----------|
| IC_{50} | 7.72 | ±0.25 |



Εικόνα 11: Καμπύλη της % αναστολής της δραστηριότητας του ενζύμου ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της ένωσης Phloretin στις συγκεντρώσεις 2μM, 8μM, 20μM, 40μM. Η IC_{50} υπολογίστηκε στα 7.72 ± 0.25 μM.

Με βάση τα αποτελέσματα η φλορετίνη αναστέλλει την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και η σταθερά IC_{50} υπολογίστηκε σε 7.72 ± 0.25 μM. Σε σύγκριση με άλλους αναστολείς του ενζύμου, η φλορετίνη έχει υψηλότερη IC_{50} με ανάλογα σταυροσπορίνης (KT5720 K_i nM) και ινδιρουβίδης (τιμές IC_{50} 0,17–0,36 μM) όπου αποτελούν έως τώρα τους πιο ισχυρούς αναστολείς της PhK (Alexopoulos et al., 2022) αλλά καλύτερη σε σχέση με ανάλογα κουμαρίνης η GB-P2-4'α που μελετήθηκε πρόσφατα από το εργαστήριο μας και εμφάνισε αναστολή με τιμή IC_{50} $102,6 \pm 1,7$ μM. Τέλος, η υπό μελέτη ένωση θα πρέπει να αξιολογηθεί περαιτέρω και θα πρέπει να υπολογισθεί και η σταθερά αναστολής K_i ενώ η κρυσταλλογραφική μελέτη του συμπλόκου της φλορετίνης με την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου θα παρέχει πληροφορίες για τον τρόπο σύνδεσης του μορίου στο ένζυμο.

Η παρούσα διπλωματική μελέτη αποτελεί μέρος της γενικότερης έρευνας που διεξάγεται στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, που έχει ως ορόσημο την ανάπτυξη και τον χαρακτηρισμό υπογλυκαιμικών ουσιών, η προέλευση των οποίων είναι από φυτικά εκχυλίσματα. Απώτερος στόχος, είναι ο σχεδιασμός νέων εν δυνάμει φαρμάκων που θα έχουν ως πρότυπο συστατικά φυσικών ενώσεων με υπογλυκαιμική δράση που θα υποστηρίζει την προοπτική μιας εναλλακτικής θεραπείας πάνω στην ορθή ρύθμιση του ενζύμου της κινάσης της φωσφορυλάσης του ήπατος και ελέγχου των μεταβολικών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα στα πρώτα στάδια του σακχαρώδους διαβήτη. Κατά συνέπεια, η αναζήτηση επιπλέον βιοδραστικών ενώσεων από φυτικά εκχυλίσματα με πιθανή υπογλυκαιμική δράση είναι ελκυστική και αποτελεί πρόκληση για μελλοντικές προσπάθειες.

4. Βιβλιογραφία

- Adeva-Andany MM, González-Lucán M, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C, Ameneiros-Rodríguez E. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin.* 2016 Feb 27;5:85-100. doi: 10.1016/j.bbacli.2016.02.001
- Murray B, Rosenbloom C. Fundamentals of glycogen metabolism for coaches and athletes. *Nutr Rev.* 2018 Apr 1;76(4):243-259. doi: 10.1093/nutrit/nuy001
- Agius L. Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism. *Mol Aspects Med.* 2015 Dec;46:34-45. doi: 10.1016/j.mam.2015.09.002.
- Alexopoulos S, Gkouskou A, Stravodimos G, Tsagkarakou AS, Tsialtas I, Katounis D, Psarra AM, Leonidas D, Brahmacharib G, Hayesc JM, Skamnaki V. The druggability of the ATP binding site of glycogen phosphorylase kinase probed by coumarin analogues. *Current Research in Chemical Biology* 2022 Feb 26;2:100022. <https://doi.org/10.1016/j.crchbi.2022.100022>
- Bollen M, Keppens S, Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J.* 1998 Nov 15;336 (Pt 1)(Pt 1):19-31. doi: 10.1042/bj3360019. PMID: 9806880; PMCID: PMC1219837.
- Boulatnikov IG, Nadeau OW, Daniels PJ, Sage JM, Jeyasingham MD, Villar MT, Artigues A, Carlson GM. The regulatory beta subunit of phosphorylase kinase interacts with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry.* 2008 Jul 8;47(27):7228-36. doi: 10.1021/bi800681g. Epub 2008 Jun 13
- Herrera JE, Thompson JA, Rimmer MA, Nadeau OW, Carlson GM. Activation of Phosphorylase Kinase by Physiological Temperature. *Biochemistry.* 2015 Dec 29;54(51):7524-30. doi: 10.1021/acs.biochem.5b01032. Epub 2015 Dec 14.
- Boyer, J., Liu, R.H., 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J.* 3, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-3-5/FIGURES/4>
- Browner MF, Fletterick RJ. Phosphorylase: a biological transducer. *Trends Biochem Sci.* 1992 Feb;17(2):66-71. doi: 10.1016/0968-0004(92)90504-3.
- Brushia RJ, Walsh DA. Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure. *Front Biosci.* 1999 Sep 15;4:D618-41. doi: 10.2741/brushia.
- Camus S, Quevedo C, Menéndez S, Paramonov I, Stouten PF, Janssen RA, Rueb S, He S, Snaar-Jagalska BE, Laricchia-Robbio L, Izipisua Belmonte JC. Identification of phosphorylase kinase as a novel therapeutic target through high-throughput screening for anti-angiogenesis compounds in zebrafish. *Oncogene.* 2012 Sep 27;31(39):4333-42. doi: 10.1038/onc.2011.594.
- Carrière C, Jonic S, Mornon JP, Callebaut I. 3D mapping of glycogenosis-causing mutations in the large regulatory alpha subunit of phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Nov;1782(11):664-70. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.09.011
- Cer RZ, Mudunuri U, Stephens R, Lebeda FJ. IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jul;37(Web Server issue):W441-5.
- Chebotareva NA, Meremyanin AV, Makeeva VF, Eronina TB, Kurganov BI. Glycogen phosphorylase b and phosphorylase kinase binding to glycogen under molecular crowding conditions. Inhibitory effect of FAD. *Biochemistry (Mosc).* 2009 May;74(5):562-8. doi: 10.1134/s0006297909050125.
- Chen, J., Li, Q., Ye, Y., Huang, Z., Ruan, Z., Jin, N., 2020. Phloretin as both a substrate and inhibitor of tyrosinase: Inhibitory activity and mechanism. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 226, 117642. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2019.117642>
- Crespy V, Aprikian O, Morand C, Besson C, Manach C, Demigné C, Rémésy C. Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *J Nutr.* 2001 Dec;131(12):3227-30.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 1995 Dec 21-28;378(6559):785-9. doi: 10.1038/378785a0
- do Amaral MC, Lee RE Jr, Costanzo JP. Enzymatic regulation of glycogenolysis in a subarctic population of the wood frog: implications for extreme freeze tolerance. *PLoS One.* 2013 Nov 13;8(11):e79169.
- Egbuna C, Awuchi CG, Kushwaha G, Rudrapal M, Patrick-Iwuanyanwu KC, Singh O, Odoh UE, Khan J, Jeevanandam J, Kumarasamy S, Chukwube VO, Narayanan M, Palai S, Găman MA, Uche CZ, Ogaji DS, Ezeofor NJ, Mtewa AG, Patrick-Iwuanyanwu CC, Kesh SS, Shivamallu C, Saravanan K, Tijjani H, Akram M, Ifemeje JC, Olisah MC, Chikwendu CJ. Bioactive Compounds Effective Against Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Curr Top Med Chem.* 2021;21(12):1067-1095. doi: 10.2174/1568026621666210509161059. PMID: 33966619.

- Ellingwood SS, Cheng A. Biochemical and clinical aspects of glycogen storage diseases. *J Endocrinol.* 2018 Sep;238(3):R131-R141. doi: 10.1530/JOE-18-0120.
- François J, Hers HG. The control of glycogen metabolism in yeast. 2. A kinetic study of the two forms of glycogen synthase and of glycogen phosphorylase and an investigation of their interconversion in a cell-free extract. *Eur J Biochem.* 1988 Jun 15;174(3):561-7. doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14135.x.
- Frank J, Fukagawa NK, Bilia AR, Johnson EJ, Kwon O, Prakash V, Miyazawa T, Clifford MN, Kay CD, Crozier A, Erdman JW, Shao A, Williamson G. Terms and nomenclature used for plant-derived components in nutrition and related research: efforts toward harmonization. *Nutr Rev.* 2020 Jun 1;78(6):451-458. doi: 10.1093/nutrit/nuz081..
- Gosch, C., Halbwirth, H., Stich, K., 2010. Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* 71, 838–843. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2010.03.003>
- Graves D, Bartleson C, Biorn A, Pete M. Substrate and inhibitor recognition of protein kinases: what is known about the catalytic subunit of phosphorylase kinase? *Pharmacol Ther.* 1999 May-Jun;82(2-3):143-55. doi: 10.1016/s0163-7258(98)00049-7.
- Hayes JM, Skamnaki VT, Archontis G, Lamprakis C, Sarrou J, Bischler N, Skaltsounis AL, Zographos SE, Oikonomakos NG. Kinetics, in silico docking, molecular dynamics, and MM-GBSA binding studies on prototype indirubins, KT5720, and staurosporine as phosphorylase kinase ATP-binding site inhibitors: the role of water molecules examined. *Proteins.* 2011 Mar;79(3):703-19.
- Herbert M, Goldstein JL, Rehder C, Austin S, Kishnani PS, Bali DS. Phosphorylase Kinase Deficiency. 2011 May 31 [updated 2018 Nov 1]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Mirzaa GM, Amemiya A, editors. *GeneReviews*[®]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022. PMID: 21634085.
- Huang WY, Cai YZ, Zhang Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr Cancer.* 2010;62(1):1-20. doi: 10.1080/01635580903191585.
- Kelsall IR, Munro S, Hallyburton I, Treadway JL, Cohen PT. The hepatic PP1 glycogen-targeting subunit interaction with phosphorylase a can be blocked by C-terminal tyrosine deletion or an indole drug. *FEBS Lett.* 2007 Oct 2;581(24):4749-53. doi: 10.1016/j.febslet.2007.08.073. Epub 2007 Sep 6.
- Khezerlou, A., Jafari, S.M., 2020. Nanoencapsulated bioactive components for active food packaging. *Handb. Food Nanotechnol.* 493–532. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815866-1.00013-3>
- Kobori, M., Shinmoto, H., Tsushida, T., Shinohara, K., 1997. Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells by inhibition of glucose transmembrane transport. *Cancer Lett.* 119, 207–212. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00271-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00271-1)
- Le Marchand, L., Murphy, S.P., Hankin, J.H., Wilkens, L.R., Kolonel, L.N., 2000. Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 154–160. <https://doi.org/10.1093/JNCI/92.2.154>
- Lin D, Xiao M, Zhao J, Li Z, Xing B, Li X, Kong M, Li L, Zhang Q, Liu Y, Chen H, Qin W, Wu H, Chen S. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules.* 2016 Oct 15;21(10):1374. doi: 10.3390/molecules21101374
- Liu W, Nadeau OW, Sage J, Carlson GM. Physicochemical changes in phosphorylase kinase induced by its cationic activator Mg(2+). *Protein Sci.* 2013 Apr;22(4):444-54. doi: 10.1002/pro.2226. Nadeau OW, Carlson GM, Gogol EP. A Ca(2+)-dependent global conformational change in the 3D structure of phosphorylase kinase obtained from electron microscopy. *Structure.* 2002 Jan;10(1):23-32. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00678-5.
- Lowe, E.D., Noble, M.E., Skamnaki, V.T., Oikonomakos, N.G., Owen, D.J., Johnson, L.N., 1997. The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition. *EMBO J.* 16, 6646. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/16.22.6646>
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002 Dec 6;298(5600):1912-34. doi: 10.1126/science.1075762..
- Mariadoss AVA, Vinyagam R, Rajamanickam V, Sankaran V, Venkatesan S, David E. Pharmacological Aspects and Potential Use of Phloretin: A Systemic Review. *Mini Rev Med Chem.* 2019;19(13):1060-1067. doi: 10.2174/1389557519666190311154425. PMID: 30864525.
- Martins, S., Aguilar, C.N., Garza-Rodriguez, I. de la, Mussatto, S.I., Teixeira, J.A., 2010. Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from *Larrea tridentata* by microwave-assisted extraction. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85, 1142–1147. <https://doi.org/10.1002/JCTB.2412>
- Mao W, Fan Y, Wang X, Feng G, You Y, Li H, Chen Y, Yang J, Weng H, Shen X. Phloretin ameliorates diabetes-induced endothelial injury through AMPK-dependent anti-EndMT pathway. *Pharmacol Res.* 2022 Apr 4;179:106205. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106205. Epub ahead of print. PMID: 35381340.

- Mathieu C, Dupret JM, Rodrigues Lima F. The structure of brain glycogen phosphorylase—from allosteric regulation mechanisms to clinical perspectives. *FEBS J.* 2017 Feb;284(4):546-554.
- Migocka-Patrzałek M, Elias M. Muscle Glycogen Phosphorylase and Its Functional Partners in Health and Disease. *Cells.* 2021 Apr 13;10(4):883. doi: 10.3390/cells10040883.
- Migocka-Patrzałek M, Elias M. Muscle Glycogen Phosphorylase and Its Functional Partners in Health and Disease. *Cells.* 2021 Apr 13;10(4):883. doi: 10.3390/cells10040883
- Minsat, L., Peyrot, C., Brunissen, Fanny, Renault, J.-H., Allais, Florent, Brunissen, F ;, Renault, J.-H.;, Allais, F, Hossain, M., 2021. Synthesis of Biobased Phloretin Analogues: An Access to Antioxidant and Anti-Tyrosinase Compounds for Cosmetic Applications. *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 512 10, 512. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10040512>
- Mohammad LS. Glycogen Metabolism. Al- Bayan University College of Dentistry (presentation), 2021 doi:10.13140/RG.2.2.27087.00165
- Moncany ML, Plas C. Interaction of glucagon and epinephrine in the regulation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent glycogenolysis in the cultured fetal hepatocyte. *Endocrinology.* 1980 Dec;107(6):1667-75. doi: 10.1210/endo-107-6-1667..
- Ortmeyer HK. Relationship of glycogen synthase and glycogen phosphorylase to protein phosphatase 2C and cAMP-dependent protein kinase in liver of obese rhesus monkeys. *Obes Res.* 1997 Nov;5(6):613-21. doi: 10.1002/j.1550-8528.1997.tb00583.x..
- Paredes-Flores MA, Mohiuddin SS. Biochemistry, Glycogenolysis. 2021 Nov 15. In: StatPearls . Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan—.
- Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2017 Oct;13(10):572-587. doi: 10.1038/nrendo.2017.80Ragolia L, Begum N. Protein phosphatase-1 and insulin action. *Mol Cell Biochem.* 1998 May;182(1-2):49-58.
- Priddy TS, Middaugh CR, Carlson GM. Electrostatic changes in phosphorylase kinase induced by its obligatory allosteric activator Ca²⁺. *Protein Sci.* 2007 Mar;16(3):517-27.
- Rath VL, Ammirati M, LeMotte PK, Fennell KF, Mansour MN, Danley DE, Hynes TR, Schulte GK, Wasilko DJ, Pandit J. Activation of human liver glycogen phosphorylase by alteration of the secondary structure and packing of the catalytic core. *Mol Cell.* 2000 Jul;6(1):139-48.
- Rimmer MA, Nadeau OW, Artigues A, Carlson GM. Structural characterization of the catalytic γ and regulatory β subunits of phosphorylase kinase in the context of the hexadecameric enzyme complex. *Protein Sci.* 2018 Feb;27(2):485-497. doi: 10.1002/pro.3340.
- Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J.* 2012 Feb 1;441(3):763-87. doi: 10.1042/BJ20111416Llaverro F, Arrazola Sastre A, Luque Montoro M, Martín MA, Arenas J, Lucia A, Zugaza JL. Small GTPases of the Ras superfamily and glycogen phosphorylase regulation in T cells. *Small GTPases.* 2021 Mar;12(2):106-113. doi: 10.1080/21541248.2019.1665968.
- Rubio-Villena C, Sanz P, Garcia-Gimeno MA. Structure-Function Analysis of PPP1R3D, a Protein Phosphatase 1 Targeting Subunit, Reveals a Binding Motif for 14-3-3 Proteins which Regulates its Glycogenic Properties. *PLoS One.* 2015 Jun 26;10(6):e0131476. doi: 10.1371/journal.pone.0131476.
- Ruiz-López MA, Barrientos-Ramírez L, García-López PM, Valdés-Miramontes EH, Zamora-Natera JF, Rodríguez-Macias R, Salcedo-Pérez E, Bañuelos-Pineda J, Vargas-Radillo JJ. Nutritional and Bioactive Compounds in Mexican Lupin Beans Species: A Mini-Review. *Nutrients.* 2019 Aug 2;11(8):1785. doi: 10.3390/nu11081785. PMID: 31382375; PMCID: PMC6723436.
- Saadaoui I, Rasheed R, Abdulrahman N, Bounnit T, Cherif M, Al Jabri H, Mraiche F. Algae-Derived Bioactive Compounds with Anti-Lung Cancer Potential. *Mar Drugs.* 2020 Apr 8;18(4):197. doi: 10.3390/md18040197. PMID: 32276401; PMCID: PMC7230368.
- Saheki S, Takeda A, Shimazu T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Anal Biochem.* 1985 Aug 1;148(2):277-81.
- Shanmugam KR, Shanmugam B, Subbaiah GV, Ravi S, Reddy KS. Medicinal Plants and Bioactive Compounds for Diabetes Management: Important Advances in Drug Discovery. *Curr Pharm Des.* 2021;27(6):763-774. doi: 10.2174/1381612826666200928160357. PMID: 32988345.
- SM, J., K, M.K., E, A., 2019. Production of a natural color through microwave-assisted extraction of saffron tepal's anthocyanins. *Food Sci. Nutr.* 7, 1438–1445. <https://doi.org/10.1002/FSN3.978>
- Soundarapandian MM, Juliana CA, Chai J, Haslett PA, Fitzgerald K, De León DD. Activation of Protein Kinase A (PKA) signaling mitigates congenital hyperinsulinism associated hypoglycemia in the Sur1^{-/-} mouse model. *PLoS One.* 2020 Jul 31;15(7):e0236892. doi: 10.1371/journal.pone.0236892.
- Thompson JA, Carlson GM. The regulatory α and β subunits of phosphorylase kinase directly interact

with its substrate, glycogen phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 8;482(2):221-225. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.044Owen DJ, Noble ME, Garman EF, Papageorgiou AC, Johnson LN. Two structures of the catalytic domain of phosphorylase kinase: an active protein kinase complexed with substrate analogue and product. *Structure.* 1995 May 15;3(5):467-82. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00180-0.

- Vénien-Bryan C, Jonic S, Skamnaki V, Brown N, Bischler N, Oikonomakos NG, Boisset N, Johnson LN. The structure of phosphorylase kinase holoenzyme at 9.9 angstroms resolution and location of the catalytic subunit and the substrate glycogen phosphorylase. *Structure.* 2009 Jan 14;17(1):117-27Liu W, Priddy TS, Carlson GM. Physicochemical changes in phosphorylase kinase associated with its activation. *Protein Sci.* 2008 Dec;17(12):2111-9. doi: 10.1110/ps.037895.108
- Vénien-Bryan C, Lowe EM, Boisset N, Traxler KW, Johnson LN, Carlson GM. Three-dimensional structure of phosphorylase kinase at 22 Å resolution and its complex with glycogen phosphorylase b. *Structure.* 2002 Jan;10(1):33-41. doi: 10.1016/s0969-2126(01)00691-8
- Wang, L., Li, Z.W., Zhang, W., Xu, R., Gao, F., Liu, Y.F., Li, Y.J., 2014. Synthesis, Crystal Structure, and Biological Evaluation of a Series of Phloretin Derivatives. *Molecules* 19, 16447. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES191016447>
- Watson KA, Mitchell EP, Johnson LN, Son JC, Bichard CJ, Orchard MG, Fleet GW, Oikonomakos NG, Leonidas DD, Kontou M, et al. Design of inhibitors of glycogen phosphorylase: a study of alpha- and beta-C-glucosides and 1-thio-beta-D-glucose compounds. *Biochemistry.* 1994 May 17;33(19):5745-58.
- Wilkinson, D.A., Norcum, M.T., Fitzgerald, T.J., Marion, T.N., Tillman, D.M., Carlson, G.M. Proximal regions of the catalytic gamma and regulatory beta subunits on the interior lobe face of phosphorylase kinase are structurally coupled to each other and with enzyme activation. *J. Mol. Biol.*1997;265, 319–329
- Zhuolun Li. Structural studies of two biological macromolecular complexes : FANCD2/FANCI and Phosphorylase Kinase by cryo electron microscopy. *Biophysics.* Université Pierre et Marie Curie Paris VI, 2016. English. ffNNT : 2016PA066030ff. fftel-01359233f
- Zimmermann C, Wagner AE. Impact of Food-Derived Bioactive Compounds on Intestinal Immunity. *Biomolecules.* 2021 Dec 18;11(12):1901. doi: 10.3390/biom11121901. PMID: 34944544; PMCID: PMC8699755.