

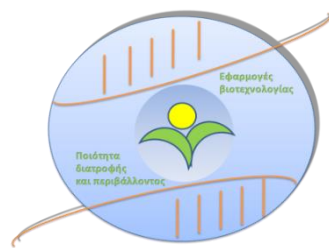


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών
του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**



Διπλωματική Μεταπτυχιακή Εργασία

“Βιοχημικές και δομικές μελέτες της
φωσφορυλάσης του αμύλου από γεώμηλα”

ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΙΩΑΝΝΟΥ

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2022

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΑΜΥΛΟΥ ΑΠΟ ΓΕΩΜΗΛΑ

BIOCHEMICAL AND STRUCTURAL STUDIES OF POTATO STARCH
PHOSPHORYLASE

Βιοχημικές και δομικές μελέτες της φωσφορυλάσης του αμύλου από γεώμηλα

ΟΝΟΜΑ : ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΙΩΑΝΝΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΕΩΝΙΔΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ : ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΛΕΩΝΙΔΑΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΠΕΡΣΕΦΟΝΗ ΓΙΑΝΝΟΥΛΗ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη	6
Abstract	7
1. Στοιχεία Θεωρίας	8
1.0 Εισαγωγή.....	8
1.1 Άμυλο	9
1.1.1 Μόρια αποθήκευσης ενέργειας : πολυσακχαρίτες.....	9
1.1.2 Το άμυλο.....	9
1.1.3 Το γλυκογόνο.....	13
1.1.4 Σύγκριση γλυκογόνου και αμύλου.....	13
1.1.5 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές του αμύλου και του γλυκογόνου	14
1.2 Μεταβολισμός του Αμύλου	15
1.2.1 Αναβολισμός του αμύλου.....	16
1.2.2 Καταβολισμός του αμύλου	17
1.3 Φωσφορυλάση του Αμύλου από γεώμηλα (PSP).....	17
1.3.1 Ισομορφές της PSP.....	18
1.3.2 Αλληλουχία αμινοξέων της PSP	19
1.3.3 Πρωτεολυτική αποικοδόμηση της PSP	20
1.3.4 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές της φωσφορυλάσης του αμύλου.....	21
2. Πειραματική διάταξη και μέθοδοι.....	23
2.1 Υγρή χρωματογραφία (LC)	23
2.1.1 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	25
2.1.2 Χρωματογραφία συγγένειας.....	28
2.1.3 Γενική μέθοδος απομόνωσης ενζύμων	30

2.2	SDS-PAGE – Περιγραφή και αρχή μεθόδου πειραματικής διαδικασίας.....	31
2.3	Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων.....	32
2.3.1	Κινητική Michaelis-Menten και διάγραμμα Lineweaver-Burk.....	32
2.3.2.	Αναστολή δραστηριότητας ενζύμων	35
2.3.3	Περιγραφή μεθόδου κινητικής της ενζυμικής αντίδρασης της PSP.....	36
2.3.4	Επεξεργασία των κινητικών δεδομένων	38
2.4	Κρυσταλλογραφία.....	39
2.4.1	Κρύσταλλος.....	39
2.4.2.	Ανάπτυξη κρυστάλλων	41
2.5	Οργανολογία και αντιδραστήρια	42
3	Αποτελέσματα	44
3.1	Ανάλυση SDS-PAGE απομόνωσης L-PSP	44
3.2	Προσδιορισμός της K_m	45
3.3	Προσδιορισμός της K_i	46
3.4	Παραγωγή κρυστάλλων L-PSP	48
4.	Συζήτηση.....	49
	Βιβλιογραφία.....	50

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το Μάρτιο μέχρι το Σεπτέμβριο του 2022. Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή Δρ. Δημήτριο Λεωνίδα, για την εμπιστοσύνη του να με επιλέξει να εκπονήσω την εργασία αυτή δίπλα στην εργαστηριακή του ομάδα. Ο ίδιος, πάντα πρόθυμος για επικοινωνία σχετικά με τη πρόοδο του πειραματικού και γραπτού σκέλους της διατριβής, είχε εξέχοντα καθοδηγητικό ρόλο με τις πάντα εύστοχες παρατηρήσεις του.

Θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Συμεών Κούλα, για την εξαιρετική καθοδήγηση και συνεργασία, αλλά και για την υπομονή και εμπύχωση του όλους αυτούς τους μήνες, ώστε μέσα από μια σειρά λαθών να καταφέρω να φτάσω στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω. Χωρίς την ακούραστη παρουσία του καθημερινά, τις οργανωτικές του ικανότητες και το ζήλο που εμπνέει, δεν θα ήταν δυνατό να επιτευχθεί η εργασία. Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, Αναστασία Τσαγκαράκου, Γεώργιο Στραβοδήμο, Χριστίνα Δράκου, Σεραφείμ Αλεξόπουλο, Διονύση Αντωνόπουλο, Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο, Φωτεινή Καλούση και Όλγα Παπαϊωάννου, για την άριστη καθημερινή συνύπαρξη και το πνεύμα συνεργασίας. Παρά τις δύσκολες συνθήκες, έδειχναν όλοι και όλες τον καλύτερό τους εαυτό στην αντιμετώπιση απροόπτων και δημιουργούσαν ένα φιλικό και ευχάριστο περιβάλλον εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, Χρήστο, Παναγιώτα και Σοφία, για τη ασταίρευτη βοήθεια και τη στήριξη σε ό,τι κάνω όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Η αυξανόμενη πίεση στις ερευνητικές και παραγωγικές δυνάμεις των τροφίμων, έχει στρέψει εδώ και πολλές δεκαετίες το ενδιαφέρον στις πρωτεΐνες, κυρίως λόγω της διατροφικής και λειτουργικής τους αξίας. Το γεώμηλο (*Solanum Tuberosum*) είναι πολύτιμη πηγή πρωτεϊνών για αρκετές κατηγορίες σκευασμάτων, όπως διατροφικά και φαρμακευτικά. Περίπου το 60-80% της ξηρής ύλης του γεώμηλου είναι το άμυλο, ενώ η απόδοση πρωτεϊνών του είναι μεγαλύτερη σε σχέση με άλλα φυτικά ανάλογα (Alting et al., 2011).

Η φωσφορυλάση είναι η βασική πρωτεΐνη – ένζυμο του μεταβολισμού που καταλύει την προσθήκη φωσφορικής ομάδας από ένα ορθοφωσφορικό ιόν σε ένα οργανικό μόριο – αποδέκτη. Η φωσφορυλάση του αμύλου από γεώμηλα ονομάζεται PSP (Potato Starch Phosphorylase) και απαντάται σε δύο ισομορφές : την πλαστιδική (L-PSP) και την κυτοσολική (H-PSP). Στα ανώτερα φυτά, η PSP παρουσιάζει κομβικό ρόλο στο μεταβολισμό του αμύλου. Ωστόσο, ο βιοχημικός μηχανισμός ρύθμισης της PSP στην αποικοδόμηση και τη σύνθεση του αμύλου είναι ακόμα ασαφής.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, μελετήθηκε η δομή και λειτουργία της πλαστιδικής μορφής της PSP. Αρχικά, έγινε απομόνωσή της από βολβούς πατάτας μέσω χρωματογραφίας συγγένειας και ιοντοανταλλαγής. Στη συνέχεια, ακολούθησαν ενζυμικές μελέτες, ώστε να προσδιοριστεί η σταθερά συγγένειας της L-PSP για τη 1-φωσφορική γλυκόζη (G1P) και η σταθερά αναστολής (K_i) για τον αναστολέα KS461 για τον οποίο έχουν διεξαχθεί μελέτες στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Τέλος, έγιναν προσπάθειες παραγωγής κρυστάλλων L-PSP σε διαφορετικές συνθήκες, με απώτερο στόχο τη χρήση τους σε πειράματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X για την εύρεση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης και των πιθανών κέντρων πρόσδεσης.

Λέξεις-κλειδιά : φωσφορυλάση, άμυλο, γεώμηλο, PSP, L-PSP, πλαστιδική, κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, κινητική ενζυμικών αντιδράσεων, Michaelis-Menden, K_m , K_i , χρωματογραφία, SDS-PAGE

Abstract

The increasing pressure on the research and production forces of food, have turned the interest in proteins for many decades, mainly because of their nutritional and functional value. The potato (*Solanum Tuberosum*) is a valuable source of proteins for several categories of preparations, such as nutritional and pharmaceutical. About 60-80% of potato dry matter is starch, while its protein yield is higher than other plant analogues (Alting et al., 2011).

Phosphorylase is a key protein – enzyme of metabolism that catalyzes the addition of a phosphate group from inorganic phosphate to an organic acceptor molecule. Potato starch phosphorylase is called PSP (Potato Starch Phosphorylase) and is found in two isoforms: the plastidic (L-PSP) and the cytosolic (H-PSP). In higher plants, PSP plays a pivotal role in starch metabolism. However, the biochemical mechanism of PSP regulation in starch degradation and synthesis is still unclear.

In the context of this thesis, the structure and function of the plastidial form of PSP was studied. Firstly, PSP was purified from potato tubers by affinity and ion exchange chromatography. Enzymatic studies then followed to determine the affinity constant of L-PSP for G1P and the inhibition constant (K_i) for the inhibitor KS461, which was previously studied for his action on glycogen phosphorylase. Finally, attempts were made to produce L-PSP crystals under different conditions, with the ultimate goal of using them in X-ray crystallography experiments to discover the three-dimensional structure of the protein.

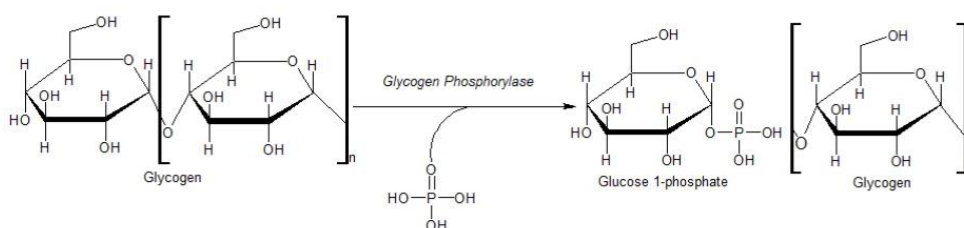
Keywords: phosphorylase, starch, potato, PSP, L-PSP, plastidic, X-ray crystallography, enzyme reaction kinetics, Michaelis-Menden, K_m , K_i , chromatography, SDS-PAGE

1. Στοιχεία Θεωρίας

1.0 Εισαγωγή

Η φωσφορυλάση είναι βασικό ένζυμο του μεταβολισμού που καταλύει την προσθήκη φωσφορικής ομάδας από ένα ορθοφωσφορικό ιόν σε ένα οργανικό μόριο - αποδέκτη. Η αντίδραση είναι γνωστή ως φωσφορόλυση και παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση υδατανθράκων, όπως το γλυκογόνο και το άμυλο. Το άμυλο είναι μια μορφή αποθήκευσης ενέργειας στα φυτά. Περιέχει δύο πολυμερή που αποτελούνται από κατάλοιπα γλυκόζης: την αμυλόζη (γραμμική) και την αμυλοπηκτίνη (διακλαδισμένη).

Το γλυκογόνο αποτελεί μια μορφή αποθήκευσης ενέργειας στα ζώα. Είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές που αποτελείται από μονάδες γλυκόζης. Μέσω της διαδικασίας της γλυκογονόλυσης (glycogenolysis) διασπάται σε 1-φωσφορική γλυκόζη (G1P) και γλυκογόνο_{n-1}. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (PG) διασπάει το γλυκογόνο με τη προσθήκη ορθοφωσφορικού ιόντος (P_i) προς απόδοση 1-φωσφορικής γλυκόζης. Η διάσπαση ενός δεσμού με τη προσθήκη του ορθοφωσφορικού είναι γνωστή ως φωσφορόλυση. Παράλληλα με τη δράση της φωσφορυλάσης παρατηρείται η δράση συνενζύμων, με κύριο το συνένζυμο PLP (Berg, Tymoczko & Stryer, 2012).



Εικ. 1 Γλυκογονόλυση (Berg, Tymoczko & Stryer, 2012)

Η γλυκογονόλυση (glycogenolysis) έχει ως αντιστρεπτή αντίδραση in vitro τη γ λ υ κ ο γ έ ν ε σ η (glycogenesis), μέσω της οποίας πρ

οστίθενται κατάλοιπα γλυκόζης στα μη αναγωγικά άκρα του γλυκογόνου. Το ένζυμο που καταλύει τη γλυκογένεση είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (PG). Γενικά, η φωσφορυλάση εντοπίζεται σε δύο αλληλομετατρέψιμες μορφές, την α (ενεργή) και β (ανενεργή) (Berg, Tymoczko & Stryer, 2012).

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι παρούσα σε όλα τα είδη, από μονοκύτταρους οργανισμούς και βακτήρια μέχρι φυτά και θηλαστικά και έχει εξέχοντα ρόλο στο μεταβολισμό (αναβολισμό και καταβολισμό) υδατανθράκων (Palm et al., 1990).

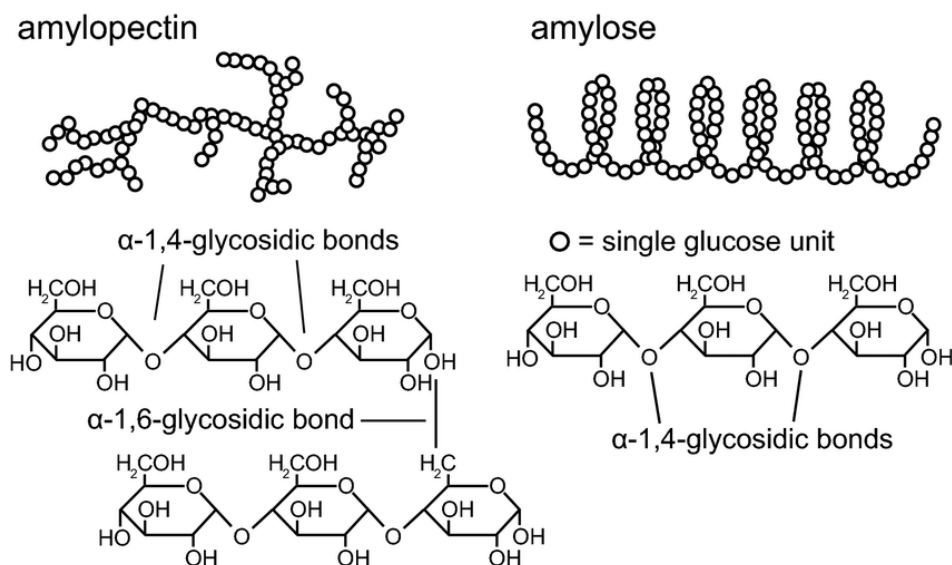
1.1 Άμυλο

1.1.1 Μόρια αποθήκευσης ενέργειας : πολυσακχαρίτες

Η αποθήκευση της περίσσειας γλυκόζης που δεν καταβόλιζεται ευθέως από τους οργανισμούς αποτελεί λειτουργία τεράστιας σημασίας για τη δημιουργία εφεδρικών δεξαμενών ενέργειας. Η γλυκόζη έχει μικρό χρόνο ημιζωής στη κυκλοφορία του αίματος και στη συνέχεια αποθηκεύεται αντί να αποβληθεί από τον οργανισμό, κάτι που εξελικτικά δίνει ισχυρό προβάδισμα. Η αποθήκευση γίνεται σε μεγάλα πολυμερή μόρια υδατανθράκων που ονομάζονται πολυσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες αποτελούνται από δεκάδες έως χιλιάδες μονοσακχαρίτες ενωμένους με γλυκοζίτικούς δεσμούς και διακρίνονται σε ομοπολυμερή και ετεροπολυμερή. Τα ομοπολυμερή ονομάζονται έτσι διότι αποδίδουν μόνο ένα είδος μονοσακχαρίτη (γλυκόζη) κατά την υδρόλυση. Τα πιο γνωστά και άφθονα ομοπολυμερή είναι το γλυκογόνο, το άμυλο και η κυτταρίνη. Το γλυκογόνο και το άμυλο αποτελούν σημαντικά ομοπολυμερή πολυσακχαριτών για την αποθήκευση ενέργειας σε πολλά είδη, όπως ευκαρυώτες, βακτήρια και αρχαία. Το γλυκογόνο απαντάται σε ζωικούς, ενώ το άμυλο σε φυτικούς οργανισμούς.

1.1.2 Το άμυλο

Το άμυλο είναι ενδεχομένως η πιο σημαντική διατροφική πηγή ενέργειας και αντιστοιχεί σε πάνω από 50% της συνολικής πρόσληψης υδατανθράκων για τον άνθρωπο. Η διάσπαση του αμύλου σε γλυκόζη θρέφει το φυτό σε περιόδους μειωμένης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Συχνά θεωρούμε τις πατάτες ως «αμυλούχο» τρόφιμο, ωστόσο υπάρχουν φυτά που περιέχουν πολύ μεγαλύτερο ποσοστό αμύλου (πατάτες 15%, σιτάρι 55%, καλαμπόκι 65% και ρύζι 75%).

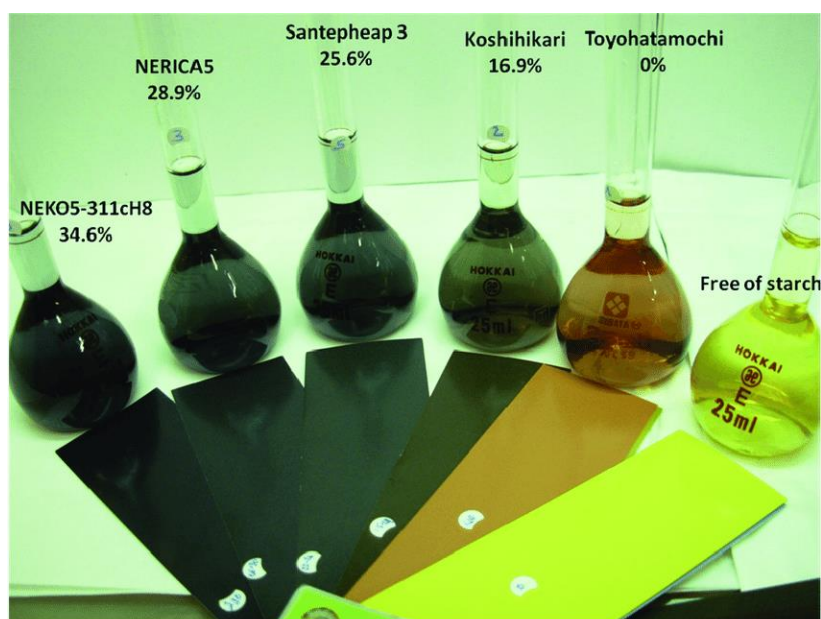


Εικ.2 Χημική δομή αμυλοπηκτίνης και αμυλόζης. Η αμυλοπηκτίνη είναι τριαδιάστατο διακλαδισμένο πολυμερές (αριστερά). Η αμυλόζη είναι γραμμικό πολυμερές που σχηματίζει έλικα στο χώρο (δεξιά) (Willfahrt et al., 2019).

Το άμυλο είναι ένα μείγμα δύο πολυμερών: αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης. Το φυσικό άμυλο αποτελείται από περίπου 10%-30% αμυλόζη και 70%-90% αμυλοπηκτίνη (Ball et al., 2012). Η αμυλόζη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται εξ ολοκλήρου από μονάδες α-D-γλυκόζης που ενώνονται με α-1,4-γλυκοζίτικους δεσμούς. Βέβαια, πειραματικά στοιχεία (Εικ.2) υποδεικνύουν ότι η τρισδιάστατη αμυλόζη δεν είναι μια ευθεία αλυσίδα μονάδων γλυκόζης, αλλά αντ' αυτού είναι τυλιγμένη σαν ελατήριο, με έξι μονομερή γλυκόζης ανά στροφή. Όταν περιελίσσεται με αυτόν τον τρόπο, η αμυλόζη έχει αρκετό χώρο στον πυρήνα της για να φιλοξενήσει ένα μόριο ιωδίου δημιουργώντας σύμπλοκο αμυλόζης-ιωδίου, που θα δώσει στο μόριο χαρακτηριστικό μπλε-ιώδες χρώμα.

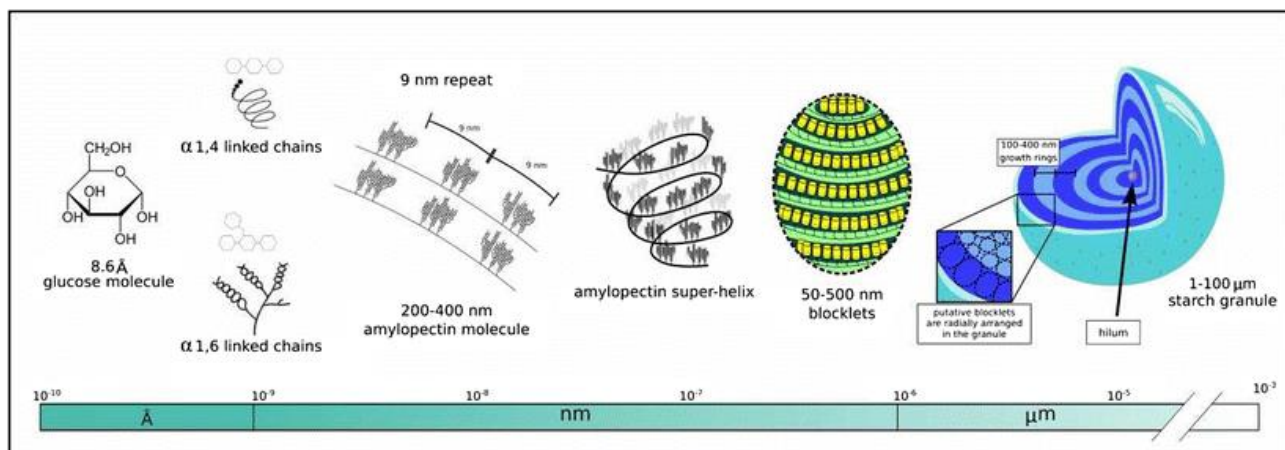
Η αμυλοπηκτίνη είναι ένας διακλαδισμένος πολυσακχαρίτης που η αλυσίδα του συντελείται από μονάδες γλυκόζης που συνδέονται με α-1,4- γλυκοζίτικους δεσμούς, οι οποίοι συνθέτουν την κύρια αλυσίδα, και με α-1,6- γλυκοζίτικους δεσμούς, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις διακλαδώσεις. Ένα μόριο αμυλοπηκτίνης μπορεί να περιέχει πολλές χιλιάδες μόρια γλυκόζης, με τα σημεία διακλάδωσης να εμφανίζονται περίπου κάθε 25-30 μόρια γλυκόζης. Οι διακλαδώσεις διαταράσσουν την ελικοειδή δομή της αμυλοπηκτίνης, και έτσι κατά την εφαρμογή ιωδίου δίνει ένα κοκκινωπό καφέ χρώμα.

Εφαρμοσμένη τεχνική αυτής της ιδιότητας είναι η ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση της σύστασης του αμύλου σε αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη (Εικ.3).



Εικ. 3 Γρήγορη μέθοδος ανίχνευσης αμυλόζης σε ποικιλίες ρυζιού με χρήση τυπικού χρωματολογίου βαθμονομημένο μέσω θερμιδομετρίας αμυλόζης-ιωδίου (Avaro et al., 2009).

Η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη σχηματίζουν στο χώρο κόκκους αμύλου μεγέθους μερικών δεκάδων μικρομέτρων (2-45 μ m) και έχουν τη μορφή σκόνης (Εικ. 4). Ο σχηματισμός των κοκκίων αυτών οφείλεται σε παράγοντες όπως οι ημικρυσταλλικές ιδιότητες της αμυλοπηκτίνης, αλλά και στην ομαδοποίηση και τη συχνότητα των α -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών. Η κρυσταλλική δομή των κοκκίων αμύλου είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στα φυτά. Οι ομάδες των εναλλασσόμενων περιοχών ημικρυσταλλίνης και άμορφου υλικού, δημιουργούν τα δαχτυλίδια ανάπτυξης (growth rings) που είναι παρόντα στα αποταμιευτικά άμυλα των ανωτέρων φυτών (Pilling & Smith, 2003). Αξίζει να αναφερθεί ότι η ακριβής θέση της αμυλόζης μέσα στους κόκκους δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως, αλλά θεωρείται ότι κατά κύριο λόγο είναι διασκορπισμένη ως ένα μονό ελικοειδές ή τυχαίο σπείραμα σε άμορφες, λιγότερο κρυσταλλικές περιοχές και συντίθενται σε μια προϋπάρχουσα μήτρα αμυλοπηκτίνης (Jenkins & Donald, 1995).



Εικ.4 Χωρική ανάπτυξη διαφόρων επιπέδων της δομής των κοκκίων αμύλου κατά σειρά κλίμακας από μεμονωμένες μονάδες γλυκόζης (περίπου 9 Å) έως πλήρη κοκκία αμύλου (κλίμακα μm) (Goren, Ashlock, & Tetlow, 2018).

Σχεδόν όλα τα φυτά , όπως και τα ετερότροφα παράγωγά τους επίσης, είναι ικανά να σχηματίσουν άμυλο. Το εγγενές άμυλο υπάρχει ως αδιάλυτα σωματίδια στο νερό με καθορισμένη ενδομοριακή και διαμοριακή τάξη. Η βιοσύνθεση αμύλου περιλαμβάνει τουλάχιστον πέντε διακριτές ομάδες αντιδράσεων: α) το σχηματισμό ενός δέκτη γλυκοζυλίου, β) τη σύνθεση ενός δότη γλυκοζυλίου, γ) τη μεταφορά γλυκόζης από τον δότη στον δέκτη (με σχηματισμό δεσμών α-1,4), δ) τη διακλάδωση μιας 1,4-συνδεδεμένης αλυσίδας γλυκάνης (με το σχηματισμό δεσμών α-1,6) και ε) τη φυσική διάταξη των αλυσίδων α-γλυκάνης (Fettke et al., 2009). Ανάλογα με το φυτικό ιστό στον οποίο συντίθεται λαμβάνει και διαφορετική μορφή: μεταβατική ή αποταμιευτική. Στα ανώτερα φυτά η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα στο στρώμα των χλωροπλαστών στα όργανα πηγής (μεταβατικό άμυλο) και στο στρώμα των μη πράσινων πλαστιδίων (σπόροι) στα όργανα βύθισης (αποταμιευτικό άμυλο).

Το μεταβατικό άμυλο συντίθεται κατά τη διάρκεια της ημέρας και αποικοδομείται το βράδυ απουσία φωτός σε σουκρόζη, ώστε να παρέχει άνθρακα και ενέργεια στο σώμα του φυτού απουσία φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, μέσω μη φωτοσυνθετικού μεταβολισμού. Το αποταμιευτικό άμυλο μπορεί να παράγεται από ριζόβιους ιστούς και να λειτουργεί ως αποθήκη άνθρακα για τις δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες ή μπορεί επίσης να εντοπίζεται στους σπόρους και να διασπάται κατά τη βλάστηση ώστε να παρέχει την απαραίτητη για την ανάπτυξη του φυτού ενέργεια (Tetlow, Morell &

Emes, 2004). Το αποταμιευτικό άμυλο, που παράγεται σε αμυλοπλάστες ενδοσπερμίων δημητριακών (ρύζι, καλαμπόκι, σιτάρι, κριθάρι), αντιπροσωπεύει πάνω από το 90% της παγκόσμιας αγοράς αμύλου. Το ποσοστό αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς αποτελεί μια φθηνή, φυσική, ανανεώσιμη πρώτη ύλη, του οποίου οι ποικίλες δομές αξιοποιούνται σε προϊόντα αγροδιατροφής, σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές (παραγωγή χαρτιού, βιοδιασπώμενα πλαστικά, προϊόντα κοσμητικής) και ως πηγή ανανεώσιμης ενέργειας μετά την μετατροπή του σε αιθανόλη, καθιστώντας το εξαιρετικά χρήσιμο προϊόν (Burrell, 2003).

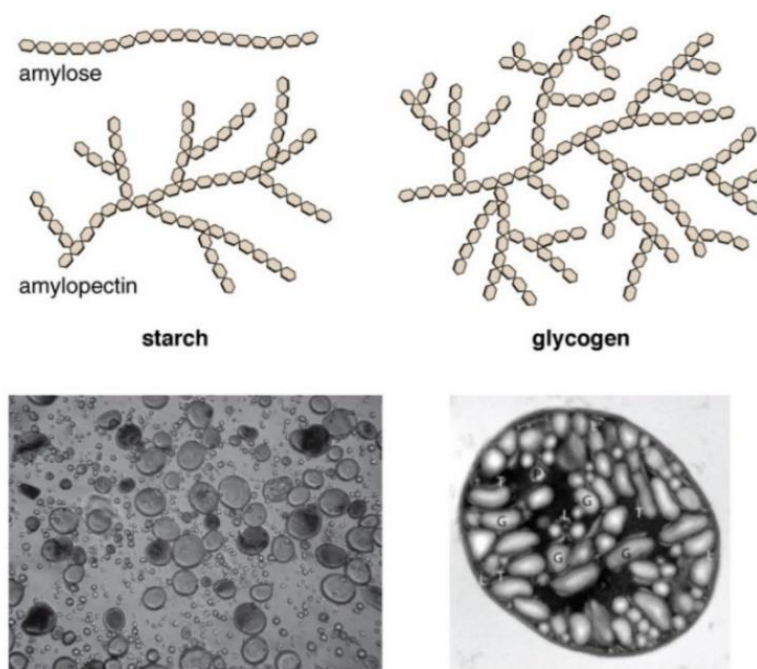
1.1.3 Το γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ο υδατάνθρακας αποθήκευσης ενέργειας για τα ζώα και τους μύκητες. Περιέχεται σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών σε μικρές ποσότητες πρακτικά, όμως τη μεγαλύτερη συγκέντρωση γλυκογόνου τη συναντάμε στο ήπαρ (4-8%) και στα κύτταρα των σκελετικών μυών (0.5-1%). Ταυτόχρονα, περίπου το 70% του συνολικού γλυκογόνου στο σώμα αποθηκεύεται στα μυϊκά κύτταρα. Έτσι, παρ' όλο που στο ήπαρ εμφανίζεται το μεγαλύτερο ποσοστό του (κατά βάρος), η μεγαλύτερη συνολική ποσότητα γλυκογόνου αποθηκεύεται στα μυϊκά κύτταρα (Ball et al., 2012).

Η χημική δομή του γλυκογόνου (Εικ. 5) είναι αρκετά πανομοιότυπη με αυτή της αμυλοπηκτίνης, με τη διαφορά ότι οι διακλαδώσεις είναι μικρότερες σε μέγεθος και εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα. Συγκεκριμένα, τα σημεία διακλάδωσης εμφανίζονται περίπου κάθε 8-12 μονάδες γλυκόζης, δηλαδή σχεδόν τρεις φορές συχνότερα απ' ό,τι στην αμυλοπηκτίνη. Επιπλέον, κατά την ανάμιξή του με ιώδιο δίνει ένα κοκκινωπό καφέ χρώμα, όπως και η αμυλοπηκτίνη.

1.1.4 Σύγκριση γλυκογόνου και αμύλου

Ενώ και τα δύο, το άμυλο και το γλυκογόνο, είναι χημικά πανομοιότυπα, σημαντικές διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες σχετίζονται με τη μοριακή οργάνωση των αλυσίδων γλυκάνης μέσα στα μόρια (Brust, Orzechowski & Fettke, 2020). Το άμυλο και το γλυκογόνο παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση ως προς την υδατοδιαλυτότητά τους. Το άμυλο αποτελείται από διακλαδισμένη αδιάλυτη στο νερό ημικρυσταλλική αμυλοπηκτίνη και αμυλόζη. Αντίθετα, το γλυκογόνο είναι ως επί το πλείστον υδατοδιαλυτό. Ακόμη, το άμυλο παρουσιάζει σχετικά υψηλή πυκνότητα περίπου 1,5 g/cm³, με το γλυκογόνο να εμφανίζει μικρότερη.



Εικ. 5 Απεικόνιση μορίων (πάνω) και μικροσκοπική απεικόνιση (κάτω) αμύλου και γλυκογόνου. Πηγή : Microbiology, 2021

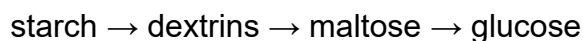
Ακόμα μια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο αφορά τα οργάνδια σύνθεσής τους. Το άμυλο συντίθεται σε ένα ειδικό οργάνδιο, τον αμυλοπλάστη, που εντοπίζεται στους αποθηκευτικούς ιστούς των φυτών. Αντίθετα, στους ζωικούς ιστούς, ο αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης, το γλυκογόνο, εναποτίθεται στο κυτταρόπλασμα σε μορφή κόκκων (Schneider et al., 1981).

1.1.5 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές του αμύλου και του γλυκογόνου

Εκτός από το φυσικό του ρόλο ως αποθήκη άνθρακα και ενέργειας για τους φυτικούς οργανισμούς από τους οποίους παράγεται, το άμυλο έχει πληθώρα άλλων εφαρμογών. Η κυριότερη είναι η χρήση των κόκκων αμύλου που βρίσκονται στους σπόρους των φυτών ως τροφή για θηλαστικά, όπως ο άνθρωπος. Η ιδιότητά του ως χαμηλής υδατοδιαλυτότητας βρώσιμο πολυμερές, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της τεχνολογίας, το καθιστούν ένα εξαιρετικό υλικό περίβλημα σε μικροκάψουλες που ενθυλακώνουν διάφορες δραστικές ουσίες και εισέρχονται στον οργανισμό (μικροενθυλάκωση). Ταυτόχρονα, είναι σημαντικό και για μη-εδώδιμες χρήσεις, όπως για τη παραγωγή κόλλας (Brust, Orzechowski & Fettke, 2020). Μια από τις πιο κοινές

χρήσης της κόλλας αμύλου είναι η παραγωγή κυματοειδούς χαρτονιού (Emblem & Hardwidge, 2012) μέσω της τεχνολογίας συσκευασιών.

Η πλήρης αποικοδόμηση του αμύλου, όπως θα δούμε και παρακάτω στην *ενότητα 1.2*, δίνει με διαδοχικά βήματα κατάλοιπα γλυκόζης. Μεταξύ αυτών, όμως, υπάρχουν ενδιάμεσα στάδια με τα οποία παράγεται δεξτρίνη και μαλτόζη :

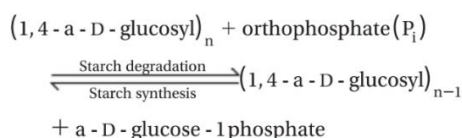


Οι δεξτρίνες είναι πολυσακχαρίτες γλυκόζης ενδιάμεσου μεγέθους. Λόγω της χαρακτηριστικής τους κολλώδους υφής κατά την επαφή τους με το νερό, οι δεξτρίνες χρησιμοποιούνται ως κόλλες σε γραμματόσημα, φακέλους και ετικέτες, αλλά και ως συνδετικά στοιχεία για να συγκρατούν τα χάπια και τα δισκία μαζί, καθώς και ως πάστες. Οι δεξτρίνες αφομοιώνονται πιο εύκολα από το άμυλο και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται εκτενώς στην εμπορική παρασκευή βρεφικών τροφών (Ball et al., 2012).

Ακόμα, το προϊόν της φωσφορόλυσης, η G1P, έχει μια σειρά από ιατρικές εφαρμογές, ειδικά στην καρδιοθεραπεία, καθώς είναι κυτταροστατική ένωση. Αναφέρεται επίσης ότι χρησιμοποιείται ως αντιβακτηριακός, αντιφλεγμονώδης και αντικαρκινικός παράγοντας (Shin, Shin & Lee, 2000). Η G1P μπορεί επίσης να αποτελέσει υπόστρωμα για τη χημική σύνθεση του γλυκουρονικού οξέος και τη παραγωγή τρεαλόζης (Takahashi, Wada & Konai, 1996).

1.2 Μεταβολισμός του Αμύλου

Η φωσφορυλάση του αμύλου (EC 2.4.1.1), από οποιαδήποτε φυτική πηγή και αν προέρχεται, συμμετέχει τόσο στην αποικοδόμηση όσο και στη σύνθεση του αμύλου μέσω της αντιστρεπτής αντίδρασης :



Εικ. 6 Φωσφορολυτική αντίδραση που καταλύεται από την φωσφορυλάση αμύλου (Rathore et al., 2009).

Η σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης είναι κοντά στη μονάδα. Επομένως, η κατεύθυνσή της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το λόγο $P_i/G1P$. Μεγάλη τιμή του λόγου θα οδηγήσει στην αποικοδόμηση της αλυσίδας της αμυλόζης μέσω φωσφορόλυσης (Schneider et al., 1981). Τα μη αναγωγικά άκρα των ολιγο- ή πολυσακχαριτών μπορούν να λειτουργήσουν τόσο ως δέκτες όσο και ως δότες καταλοίπων γλυκόζης. Το ελάχιστο μέγεθος ενός ολιγοσακχαρίτη που μπορεί να δράσει ως δέκτης και ως δότης καταλοίπων γλυκόζης είναι η μαλτοτετραόζη και η μαλτοπενταόζη αντίστοιχα (Rathore et al., 2009).

Ταυτόχρονα με τη φωσφορυλάση του αμύλου, υπάρχουν και άλλα διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια με ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτά για τη σύνθεση και την αποικοδόμηση του αμύλου. Ενδεικτικά θα δούμε στις παρακάτω ενότητες τη λειτουργία της πυροφωσφορυλάσης της ADP-γλυκόζης, της συνθάσης του αμύλου, του ενζύμου διακλάδωσης και του ενζύμου αποδιακλάδωσης, του ενζύμου D, καθώς και υδρολυτικά και φωσφορολυτικά.

1.2.1 Αναβολισμός του αμύλου

Η σύνθεση του αμύλου απαιτεί το σχηματισμό ενός διαλυτού προδρόμου που ονομάζεται ADP-γλυκόζη (ADP-Glc). Η ADP-Glc χρησιμοποιείται για την επιμήκυνση της αλυσίδας της α -1,4-συνδεδεμένης γλυκάνης από τις ADP-Glc γλυκοζυλοτρανσφεράσες, που ονομάζονται συνθάσες αμύλου (Starch synthases, SS) για τη σύνθεση αμυλοπηκτίνης και από τη συνθάση αμύλου συνδεδεμένη σε κοκκία (Granul Bound starch synthase, GBSS) για τη σύνθεση αμυλόζης. Οι α -1,4-συνδεδεμένες αλυσίδες γλυκόζης διαφορετικού μεγέθους που παράγονται από τις πολλαπλές ισομορφές των SS διακλαδώνονται με την εισαγωγή των α -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών από τα ένζυμα διακλάδωσης αμύλου (Starch branching enzyme, SBE). Τα ένζυμα αποδιακλάδωσης του αμύλου (Debranching enzyme, DBE) παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή τελικά υδατοδιαλυτών κοκκίων αμύλου με την αφαίρεση συγκεκριμένων σημείων διακλάδωσης στο υπό δημιουργία κοκκίο (Goren et al., 2018).

Διάφορα βασικά ένζυμα εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του αμύλου, συμπεριλαμβανομένης της πυροφωσφορυλάσης της ADP-γλυκόζης, της συνθάσης του αμύλου, του ενζύμου διακλάδωσης και του ενζύμου αποδιακλάδωσης (Lin, Chen et

al., 2012). Τα περισσότερα από τα ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του αμύλου έχουν πολλαπλές ισομορφές και πολλές φορές αλληλεπικαλυπτόμενη δράση (Goren et al., 2018).

1.2.2 Καταβολισμός του αμύλου

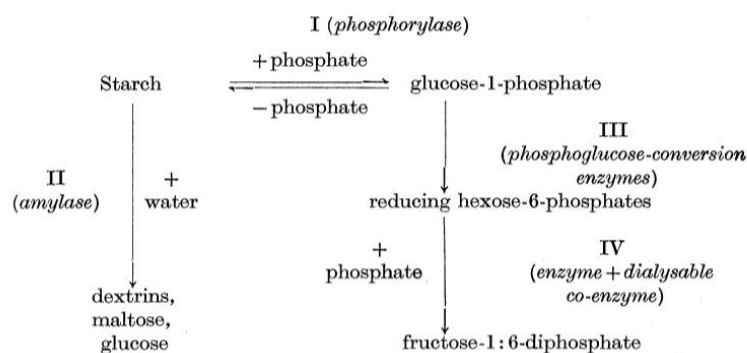
Η σημαντικότερη συμβολή στην αποικοδόμηση αμύλου προέρχεται από τις υδρολυτικές οδούς, παρόλο που από ενεργειακής άποψης (όσον αφορά την κατανάλωση ATP) είναι ευνοϊκότερη η αποικοδόμηση του αμύλου μέσω φωσφορόλυσης (Dauvillee et al., 2006). Η δυσκολία ανίχνευσης άλλων ενζυμικών δραστηριοτήτων κατά τις πρώιμες περιόδους ανάπτυξης του φυτού οδήγησε σε μια ψευδή αντίληψη ότι η φωσφορολυτική αποικοδόμηση του αμύλου είναι η κύρια διαδικασία διάσπασης του αμύλου. Η φωσφορολυτική αποικοδόμηση του αμύλου καταλύεται από τις φωσφορυλάσες του αμύλου (SP), αλλά στερείται *in vivo* στοιχείων. Από την άλλη πλευρά, η υδρόλυση του αμύλου καταλύεται κυρίως από τη β-αμυλάση (EC 3.2.1.2) και υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική αποικοδόμηση του αμύλου. Η μείωση της έκφρασης της χλωροπλαστικής ισομορφής της β-αμυλάσης στο διαγονιδιακό γεώμηλο οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό αποικοδόμησης του αμύλου (~ 8-30% ποσοστό αποικοδόμησης) σε σύγκριση με το ποσοστό αποικοδόμησης στο φυτό αγρίου τύπου (~50%) (Rathore et al., 2009).

1.3 Φωσφορυλάση του Αμύλου από γεώμηλα (PSP)

Ένα ένζυμο, η φωσφορυλάση, το οποίο καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή του αμύλου και των ανόργανων φωσφορικών σε 1-φωσφορική γλυκόζη (G1P), έχει βρεθεί ότι εμφανίζεται σε πολλά ανώτερα φυτά, καθώς και σε ορισμένα βακτήρια και άλγη. Η δράση του ενζύμου αυτού είναι η διάσπαση ή αποικοδόμηση του αμύλου προς σχηματισμό G1P. Η φωσφορυλάση του αμύλου από γεώμηλα ονομάζεται PSP (Potato Starch Phosphorylase).

Γενικά, οι φωσφορυλάσες των α-γλυκανών, όπως και η PSP, ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοζυλοτρανσφερασών. Οι γλυκοζυλοτρανσφεράσες (GTs) αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες ενζύμων του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Καταλύουν το σχηματισμό γλυκοζιτικών δεσμών μεταφέροντας το τμήμα σακχάρου από τον ενεργοποιημένο δότη σε συγκεκριμένα μόρια δέκτη (Coutinho et al., 2003).

Εκτός από το βασικό τους ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό των υδατανθράκων, οι φωσφορυλάσες γλυκάνης είναι χρήσιμοι καταλύτες στη σύνθεση υδατανθράκων, παρέχοντας G1P ως ενεργοποιημένο δότη γλυκόζης (Nidetzky et al., 1998). Η αναστρεψιμότητα των μετασχηματισμών: άμυλο + ανόργανο φωσφορικό > 1-φωσφορική γλυκόζη, φαίνεται από το γεγονός ότι η αντίδραση εξελίσσεται προς οποιαδήποτε κατεύθυνση έως ότου η αναλογία ανόργανου ορθοφωσφορικού/1-φωσφορικής γλυκόζης (Pi/G1P) αποκτήσει μια τιμή που δεν μεταβάλλεται σημαντικά από μεγάλες διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων ή του ενζύμου (Hanes, 1940).



Εικ.7 Αναπαράσταση κύριας και εναλλακτικών αντιδράσεων αμύλου και G1P (Hanes, 1940).

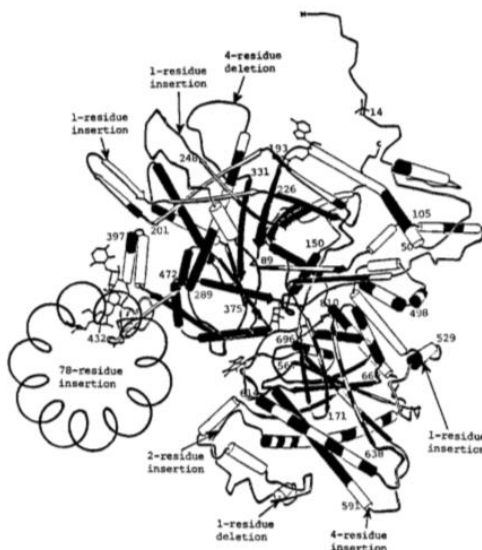
1.3.1 Ισομορφές της PSP

Τα φυτά εκφράζουν διαφορετικούς τύπους φωσφορυλάσης (Pho), οι οποίοι ταξινομούνται ως τύπου χαμηλής συγγένειας (Pho1, L-form SP ή L-SP, πλαστιδική) και τύπου υψηλής συγγένειας (Pho2, H-form SP ή H-SP, κυτοσολική), ανάλογα με τη συγγένεια πρόσδεσης προς το άμυλο. Στους κονδύλους και στα φύλλα της πατάτας (*Solanum tuberosum*) υπάρχουν δύο μορφές, η L και η H, που βρίσκονται στα πλαστίδια και στο κυτταρόπλασμα αντίστοιχα. Οι αμινοξικές αλληλουχίες των ισοενζύμων είναι εξαιρετικά συντηρημένες. Η L-PSP είναι μια διμερής πρωτεΐνη με το μονομερές της να έχει μοριακό βάρος 103.9 kDa. Η L-PSP είναι μεγαλύτερη από την H-PSP, καθώς περιέχει μια ένθεση 78 αμινοξέων (L78) κοντά στο κέντρο πρόσδεσης του γλυκογόνου, με αποτέλεσμα το ένζυμο να παρουσιάζει χαμηλή ομολογία με φωσφορυλάσες από άλλους οργανισμούς. Αυτή η ένθεση, που βρίσκεται κοντά στη θέση δέσμευσης των γλυκανών, θεωρείται ότι προκαλεί στερεοχημικό εμπόδιο και

μειώνει την αποτελεσματική σύνδεση του ενζύμου με μεγάλα, διακλαδισμένα υποστρώματα πολυγλυκανών, όπως το γλυκογόνο και το άμυλο (Mori et al., 1993). Αντίθετα, η H-PSP έχει μέγεθος μονομερούς περίπου 90 kDa και έχει υψηλή συγγένεια για γραμμικές και διακλαδισμένες γλυκάνες (Rathore et al., 2009).

1.3.2 Αλληλουχία αμινοξέων της PSP

Η πλήρης αλληλουχία αμινοξέων της φωσφορυλάσης α-γλυκάνης του γεώμηλου προσδιορίστηκε το 1986. Το μονομέρες αποτελείται από 916 κατάλοιπα στην ώριμη μορφή του με μοριακό βάρος 103.916 kDa. Η σύγκριση αλληλουχιών μεταξύ φωσφορυλασών που προέρχονται από κόνδυλο πατάτας, μυ κουνελιού και *Escherichia coli* αποκαλύπτει την παρουσία μιας διαφοροποιημένης χαρακτηριστικής περιοχής 78 αμινοξέων στη μέση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Με εξαίρεση αυτό το μεγάλο ένθετο τμήμα, το 51% και το 40% των αμινοξέων στη PSP είναι πανομοιότυπα με τα ένζυμα μύος του κουνελιού και *E. coli*, αντίστοιχα. Η ένθεση 78-αμινοξέων βρίσκεται μεταξύ της N-τελικής και C-τελικής περιοχής κοντά στη θέση αποθήκευσης του γλυκογόνου (Nakano & Fukui, 1986).



Εικ.8 Δομική σύγκριση μεταξύ μυών κουνελιού και φωσφορυλασών πατάτας. Οι περιοχές ισχυρής ομοιότητας εμφανίζονται με έντονο μαύρο χρώμα (Nakano & Fukui, 1986).

Η περιοχή ένθεσης L78 δεν έχει εντοπιστεί σε φωσφορυλάσες βακτηρίων και ζώων, αλλά ούτε και στην H-PSP ισομορφή της φωσφορυλάσης του αμύλου από γεώμηλα.

Οι Camirand et al. (1990) πρότειναν ότι η αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί το L78 μπορεί να προέρχεται από ένα ιντρόνιο. Έπειτα από εκτενείς μελέτες, καταγράφηκε το γονίδιο για την L-PSP, το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 966 αμινοξέων. Τα 50 από αυτά αποτελούν το N-τελικό μεταβατικό πεπτιδίο για τη μεταφορά μέσα στον αμυλοπλάστη, ενώ τα 916 αμινοξέα αποτελούν την ώριμη πρωτεΐνη. Παρόμοια το γονίδιο για την H-PSP κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 838 αμινοξέων, τα οποία αντιστοιχούν επίσης στην ώριμη πρωτεΐνη. Παρά τις διαφορές στις ενζυμικές τους ιδιότητες, η σύγκριση της αλληλουχίας των δύο ώριμων πρωτεϊνών εμφανίζει 63% ομολογία, εκτός από την περιοχή L78 (Mori et al., 1993).

Παρόμοιες μελέτες έγιναν προκειμένου να διερευνηθεί εάν τα ίδια ισοένζυμα, Phο1 και Phο2, υπάρχουν στα φύλλα της πατάτας με παραπλήσια αλληλουχία με αυτή των ισοενζύμων από τους βολβούς. Οι Sonnewald et al (1995) σύγκριναν τα αμινοξέα του ισοενζύμου τύπου L (Phο1) από κονδύλους και φύλλα πατάτας και εντόπισαν υψηλή ομολογία μεταξύ των πολυπεπτιδίων, φτάνοντας το 81-84% στα περισσότερα μέρη του πολυπεπτιδίου. Ωστόσο, οι περιοχές που περιέχουν το πεπτιδίο διέλευσης (αμινοξέα 1-81) και την αλληλουχία εισαγωγής (αμινοξέα 463-570) είναι πολύ διαφορετικές, φθάνοντας σε ταυτότητες μόνο 22% και 29% αντίστοιχα (Sonnewald et al., 1995).

1.3.3 Πρωτεολυτική αποικοδόμηση της PSP

Η PSP, όπως και τα περισσότερα ένζυμα, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην αποικοδόμηση, είτε λόγω πρωτεόλυσης είτε λόγω θερμοκρασίας. Το μεγαλύτερο μέρος του Phο1 που απομονώθηκε από ώριμους κονδύλους πατάτας τροποποιείται πρωτεολυτικά και εμφανίζει μια άθικτη ζώνη 110 kDa (P110) και μια ομάδα πρωτεολυμένων ζωνών (F50s) που είναι περίπου 50 kDa στην ανάλυση SDS-PAGE. Λόγω αυτού, η ένθετη περιοχή L78 του Phο1 έχει προταθεί ως η πρωτεολυτική θέση. Είναι ενδιαφέρον ότι το πρωτεολυτικά τροποποιημένο Phο1 εξακολουθεί να διατηρεί την τεταρτοταγή δομή του και παραμένει λειτουργικά καταλυτικά ενεργό (Lin, Chen et al., 2012).

Κάποιες μελέτες, που χρησιμοποιούν ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα για να κόψουν στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό τμήμα του Phο1, προσδιόρισαν τρεις κύριες θέσεις κοπής στο L78. Αυτό το ένθετο 78 αμινοξέων παρουσιάζει μοναδικά χαρακτηριστικά που εν

μέρει οφείλονται στις αποτελούμενες περιοχές PEST, που είναι πλούσιες σε προλίνη (P), γλουταμινικό οξύ (E), σερίνη (S) και θρεονίνη (T) (Lin, Chen et al., 2012).

Ακόμα μία ενδεχόμενη εφαρμογή του ένθετου L78 μπορεί να βασιστεί στη διαφοροποιημένη λειτουργία του πριν και μετά τη πρωτεόλυση στο σημείο αυτό. Πριν τη πρωτεόλυση, ο βρόχος L78 μπλοκάρει το ενεργό κέντρο με αποτέλεσμα να εμποδίζει την αποικοδόμηση του αμύλου, όμως ταυτόχρονα να είναι ικανό να συμμετάσχει στη σύνθεση του αμύλου. Αντίθετα, μετά την πρωτεολυτική αποικοδόμηση όταν το ένθετο 78 απουσιάζει, το ενεργό κέντρο είναι πλέον προσβάσιμο στους πολυσακχαρίτες και μπορεί να καταλύει την αποικοδόμηση του αμύλου μέσω φωσφορυλίωσης (Rathore et al., 2009). Συμπεραίνουμε ότι το L78 σε συνδυασμό με πρωτεόλυση μπορούν να λειτουργήσουν ως διακόπτης της L-PSP για σύνθεση ή αποικοδόμηση.

1.3.4 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές της φωσφορυλάσης του αμύλου

Η φωσφορυλάση του αμύλου είναι βιομηχανικά χρήσιμη και αποτελεί ένα προτιμώμενο ένζυμο μεταξύ όλων των φωσφορυλασών γλυκάνης για φωσφορολυτικές αντιδράσεις για την παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης και για την ανάπτυξη κατασκευασμένων ποικιλιών γλυκανών και αμύλου (Rathore et al., 2009). Ο λόγος γι' αυτό είναι το πλεονέκτημα απομόνωσής της έναντι άλλων ενζύμων, καθώς το άμυλο είναι φθινό και η ενζυμική αντίδραση με SP είναι πιο οικονομική. Μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλά βιοτεχνολογικά πεδία και τομείς που αφορούν την παραγωγή φαγητού, την κοσμητική, τη διάσπαση πλαστικών και τη φαρμακευτική. Η SP, επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της ποσότητας του ανόργανου φωσφόρου στο περιβάλλον αλλά και λειτουργώντας ως ανιχνευτής για το ανόργανο φώσφορο και σε παθολογικές καταστάσεις στους οργανισμούς (Rathore et al., 2009).

1	10	20	30
Ac-Thr-Leu-Ser-Glu-Lys-Ile-His-His-Pro-Ile-Thr-Glu-Gln-Gly-Gly-Glu-Ser-Asp-Leu-Ser-Ser-Phe-Ala-Pro-Asp-Ala-Ala-Ser-Ile-Thr-			
31	40	50	60
Ser-Ser-Ile-Lys-Tyr-His-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro-Val-Phe-Ser-Pro-Glu-Arg-Phe-Glu-Leu-Pro-Lys-Ala-Phe-Phe-Ala-Thr-Ala-Gln-Ser-			
61	70	80	90
Val-Arg-Asp-Ser-Leu-Leu-Ile-Asn-Trp-Asn-Ala-Thr-Tyr-Asp-Ile-Tyr-Glu-Lys-Leu-Asn-Met-Lys-Gln-Ala-Tyr-Tyr-Leu-Ser-Met-Glu-			
91	100	110	120
Phe-Leu-Gln-Gly-Arg-Ala-Leu-Leu-Asn-Ala-Ile-Gly-Asn-Leu-Glu-Leu-Thr-Gly-Ala-Phe-Ala-Glu-Ala-Leu-Lys-Asn-Leu-Gly-His-Asn-			
121	130	140	150
Leu-Glu-Asn-Val-Ala-Ser-Gln-Glu-Pro-Asp-Ala-Ala-Leu-Gly-Asn-Gly-Gly-Leu-Gly-Arg-Leu-Ala-Ser-Cys-Phe-Leu-Asp-Ser-Leu-Ala-			
151	160	170	180
Thr-Leu-Asn-Tyr-Pro-Ala-Trp-Gly-Tyr-Glu-Leu-Arg-Tyr-Lys-Tyr-Gly-Leu-Phe-Lys-Gln-Arg-Ile-Thr-Lys-Asp-Gly-Gln-Glu-Glu-Val-			
181	190	200	210
Ala-Glu-Asp-Trp-Leu-Glu-Ile-Gly-Ser-Pro-Trp-Glu-Val-Val-Arg-Asn-Asp-Val-Ser-Tyr-Pro-Ile-Lys-Phe-Tyr-Gly-Lys-Val-Ser-Thr-			
211	220	230	240
Gly-Ser-Asp-Gly-Lys-Arg-Tyr-Trp-Ile-Gly-Gly-Glu-Asp-Ile-Lys-Ala-Val-Ala-Tyr-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Tyr-Lys-Thr-Arg-Thr-			
241	250	260	270
Thr-Ile-Ser-Leu-Arg-Leu-Trp-Ser-Thr-Gln-Val-Pro-Ser-Ala-Asp-Phe-Asp-Leu-Ser-Ala-Phe-Asn-Ala-Gly-Glu-His-Thr-Lys-Ala-Cys-			
271	280	290	300
Glu-Ala-Gln-Ala-Asn-Ala-Glu-Lys-Ile-Cys-Tyr-Ile-Leu-Tyr-Pro-Gly-Asp-Glu-Ser-Glu-Glu-Gly-Lys-Ile-Leu-Arg-Leu-Lys-Gln-Gln-			
301	310	320	330
Tyr-Thr-Leu-Cys-Ser-Ala-Ser-Leu-Gln-Asp-Ile-Ile-Ser-Arg-Phe-Glu-Arg-Arg-Ser-Gly-Asp-Arg-Ile-Lys-Trp-Glu-Glu-Phe-Pro-Glu-			
331	340	350	360
Lys-Val-Ala-Val-Gln-Met-Asn-Asp-Thr-His-Pro-Thr-Leu-Cys-Ile-Pro-Glu-Leu-Met-Arg-Ile-Leu-Ile-Asp-Leu-Lys-Gly-Leu-Asn-Trp-			
361	370	380	390
Asn-Glu-Ala-Trp-Asn-Ile-Thr-Gln-Arg-Thr-Val-Ala-Tyr-Thr-Asn-His-Thr-Val-Leu-Pro-Glu-Ala-Leu-Glu-Lys-Trp-Ser-Tyr-Glu-Leu-			
391	400	410	420
Met-Gln-Lys-Leu-Leu-Pro-Arg-His-Val-Glu-Ile-Ile-Glu-Ala-Ile-Asp-Glu-Glu-Leu-Val-His-Glu-Ile-Val-Leu-Lys-Tyr-Gly-Ser-Met-			
421	430	440	450
Asp-Leu-Asn-Lys-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Thr-Thr-Met-Arg-Ile-Leu-Glu-Asn-Phe-Asp-Leu-Pro-Ser-Ser-Val-Ala-Glu-Leu-Phe-Ile-Lys-			
451	460	470	480
Pro-Glu-Ile-Ser-Val-Asp-Asp-Asp-Thr-Glu-Thr-Val-Glu-Val-His-Asp-Lys-Val-Glu-Ala-Ser-Asp-Lys-Val-Val-Thr-Asn-Asp-Glu-Asp-			
481	490	500	510
Asp-Thr-Gly-Lys-Lys-Thr-Ser-Val-Lys-Ile-Glu-Ala-Ala-Ala-Glu-Lys-Asp-Ile-Asp-Lys-Lys-Thr-Pro-Val-Ser-Pro-Glu-Pro-Ala-Val-			
511	520	530	540
Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Val-Arg-Met-Ala-Asn-Leu-Cys-Val-Val-Gly-Gly-His-Ala-Val-Asn-Gly-Val-Ala-Glu-Ile-His-Ser-Glu-Ile-Val-			
541	550	560	570
Lys-Glu-Glu-Val-Phe-Asn-Asp-Phe-Tyr-Glu-Leu-Trp-Pro-Glu-Lys-Phe-Gln-Asn-Lys-Thr-Asn-Gly-Val-Thr-Pro-Arg-Arg-Trp-Ile-Arg-			
571	580	590	600
Phe-Cys-Asn-Pro-Pro-Leu-Ser-Ala-Ile-Ile-Thr-Lys-Trp-Thr-Gly-Thr-Glu-Asp-Trp-Val-Leu-Lys-Thr-Glu-Lys-Leu-Ala-Glu-Leu-Gln-			
601	610	620	630
Lys-Phe-Ala-Asp-Asn-Glu-Asp-Leu-Gln-Asn-Glu-Trp-Arg-Glu-Ala-Lys-Arg-Ser-Asn-Lys-Ile-Lys-Val-Val-Ser-Phe-Leu-Lys-Glu-Lys-			
631	640	650	660
Thr-Gly-Tyr-Ser-Val-Val-Pro-Asp-Ala-Met-Phe-Asp-Ile-Gln-Val-Lys-Arg-Ile-His-Glu-Tyr-Lys-Arg-Gln-Leu-Leu-Asn-Ile-Phe-Gly-			
661	670	680	690
Ile-Val-Tyr-Arg-Tyr-Lys-Lys-Met-Lys-Glu-Met-Thr-Ala-Ala-Glu-Arg-Lys-Thr-Asn-Phe-Val-Pro-Arg-Val-Cys-Ile-Phe-Gly-Gly-Lys-			
691	700	710	720
Ala-Phe-Ala-Thr-Tyr-Val-Gln-Ala-Lys-Arg-Ile-Val-Lys-Phe-Ile-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Thr-Ile-Asn-His-Asp-Pro-Glu-Ile-Gly-Asp-			
721	730	740	750
Leu-Leu-Lys-Val-Val-Phe-Val-Pro-Asp-Tyr-Asn-Val-Ser-Val-Ala-Glu-Leu-Leu-Ile-Pro-Ala-Ser-Asp-Leu-Ser-Glu-His-Ile-Ser-Thr-			
751	760	770	780
Ala-Gly-Met-Glu-Ala-Ser-Gly-Thr-Ser-Asn-Met-Lys-Phe-Ala-Met-Asn-Gly-Cys-Ile-Gln-Ile-Gly-Thr-Leu-Asp-Gly-Ala-Asn-Val-Glu-			
781	790	800	810
Ile-Arg-Glu-Glu-Val-Gly-Glu-Glu-Asn-Phe-Phe-Leu-Phe-Gly-Ala-Gln-Ala-His-Glu-Ile-Ala-Gly-Leu-Arg-Lys-Glu-Arg-Ala-Asp-Gly-			
811	820	830	840
Lys-Phe-Val-Pro-Asp-Glu-Arg-Phe-Glu-Glu-Val-Lys-Glu-Phe-Val-Arg-Ser-Gly-Ala-Phe-Gly-Ser-Tyr-Asn-Tyr-Asp-Asp-Leu-Ile-Gly-			
841	850	860	870
Ser-Leu-Glu-Gly-Asn-Glu-Gly-Phe-Gly-Arg-Ala-Asp-Tyr-Phe-Leu-Val-Gly-Lys-Asp-Phe-Pro-Ser-Tyr-Ile-Glu-Cys-Gln-Glu-Lys-Val-			
871	880	890	900
Asp-Glu-Ala-Tyr-Arg-Asp-Gln-Lys-Arg-Thr-Thr-Met-Ser-Ile-Leu-Asn-Thr-Ala-Gly-Ser-Tyr-Lys-Phe-Ser-Ser-Asp-Arg-Thr-Ile-			
901	910	916	
His-Glu-Tyr-Ala-Lys-Asp-Ile-Trp-Asn-Ile-Glu-Ala-Val-Glu-Ile-Ala			

Εικ. 9 Πλήρης αμινοξική αλληλουχία της PSP (Nakano & Fukui, 1986).

2. Πειραματική διάταξη και μέθοδοι

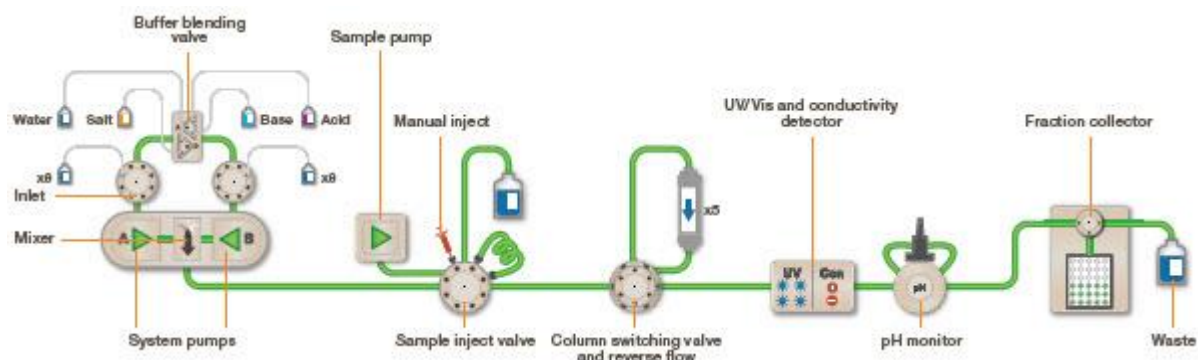
2.1 Υγρή χρωματογραφία (LC)

Η χρωματογραφία είναι μια χημική αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού ενός μίγματος στα συστατικά του με σκοπό την ανάλυση ή την προετοιμασία του για επιπλέον μελέτες (Przybycien et al., 2004). Το μείγμα διαλύεται σε ένα ρευστό διαλύτη (αέριο ή υγρό) που ονομάζεται κινητή φάση, ο οποίος το μεταφέρει μέσω ενός συστήματος (στήλης, τριχοειδούς σωλήνα, πλάκας ή φύλλου) στο οποίο έχει σταθεροποιηθεί ένα υλικό που ονομάζεται *στατική φάση*. Τα διάφορα συστατικά του μίγματος έχουν διαφορετικές συνάφειες με το υλικό της στατικής φάσης και διατηρούνται προσδεδεμένα με αυτό για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Μέσω της *κινούμενης φάσης*, τα συστατικά ταξιδεύουν με διαφορετικές ταχύτητες μέσα στο ρευστό διαλύτη και προκαλείται ο διαχωρισμός τους. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορική κατάτμηση μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης (McMurry, 2011). Τα κύρια φαινόμενα είναι η προσρόφηση, η ανταλλαγή ιόντων και η διάλυση σε μια στατική μήτρα ή διαλύτη. Οι 36 διάφορες μορφές χρωματογραφίας περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα από αυτά τα φαινόμενα, ενώ κατά την διάρκεια μιας χρωματογραφικής ανάλυσης λαμβάνουν χώρα δύο ή περισσότερα φαινόμενα (Clark John M. Jr, 2005).

Το είδος της χρωματογραφίας στο οποίο χρησιμοποιούνται υγρές κινητές φάσεις ονομάζεται *υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)*. Στην υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός συμβαίνει στη στήλη που αποτελεί την στατική φάση. Ο όγκος και το σχήμα της στήλης εξαρτάται από την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται, αλλά και από την χρωματογραφική μέθοδο που χρησιμοποιείται. Η στατική φάση πακετάρεται στη στήλη και όσο το δείγμα διέρχεται από τη στατική φάση, συμβαίνει ο διαχωρισμός. Τα κυριότερα είδη χρωματογραφίας είναι: χρωματογραφία συγγένειας, χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, χρωματογραφία μοριακής διήθησης, χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (Clark John M. Jr, 2005).

Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας για την απομόνωση της PSP από κονδύλους πατάτας, χρησιμοποιήσαμε κυρίως την υγρή χρωματογραφία ή Fast Protein Liquid

Chromatography (FPLC). Η FPLC είναι μια μορφή χρωματογραφίας μέσης πίεσης που αναπτύχθηκε αρχικά για τον καθαρισμό πρωτεϊνών με υψηλή ανάλυση και αναπαραγωγιμότητα. Το χαρακτηριστικό γνώρισμά του είναι ότι η στατική φάση αποτελείται από σφαιρίδια μικρής διαμέτρου (κυρίως διασταυρούμενη αгарόζη) που είναι «πακεταρισμένα» σε γυάλινες ή πλαστικές στήλες και έχουν υψηλή ικανότητα φόρτωσης. Οι ρητίνες για FPLC διατίθενται σε μεγάλη γκάμα μεγεθών σωματιδίων και επιφανειών πρόσδεσης, οι οποίες επιλέγονται με βάση την εφαρμογή τους (Pontis, 2017).



Εικ. 10 Τυπική διάταξη FPLC. Μια διαδρομή ροής δείγματος που απεικονίζει τα στοιχεία του συστήματος χρωματογραφίας μέσης πίεσης NGC. Η εικόνα λαμβάνεται από το λογισμικό ChromLab™ του συστήματος NGC.

Δεδομένου ότι η FPLC χρειάζεται μόνο μια σχετικά χαμηλή πίεση για να φτάσει τους υψηλούς ρυθμούς ροής στους οποίους εκτελούνται οι διαχωρισμοί, ο κίνδυνος μετουσίωσης των πρωτεϊνών που προκαλείται από δυνάμεις διάτμησης μειώνεται. Επιπλέον, τα μηχανικά εξαρτήματα είναι ανθεκτικά σε διαβρωτικά ρυθμιστικά διαλύματα και δεν υπάρχει μόλυνση ή αδρανοποίηση για τα εξαρτήματα που μας ενδιαφέρουν. Βάση του μεγάλου εύρους των στηλών που διατίθενται στην αγορά, μπορεί να εφαρμοστεί μια ποικιλία τρόπων διαχωρισμού χρησιμοποιώντας αυτήν την τεχνική: αποκλεισμός μεγέθους, υδρόφοβη αλληλεπίδραση, χρωματοεστίαση, ανταλλαγή ιόντων και χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (Moreno-Arribas & Polo, 2003).



Εικ. 11 Akta™ Pure FPLC Chromatography system

2.1.1 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Η απομόνωση πρωτεϊνών μέσω χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις ιόντων και εξαρτάται από την ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ αντιθέτων φορτίων. Τα μόρια διαφέρουν σημαντικά στις ιδιότητες του φορτίου τους και παρουσιάζουν διαφορετικούς βαθμούς αλληλεπίδρασης με τα φορτισμένα μέσα χρωματογραφίας σύμφωνα με τις διαφορές που υπάρχουν στο συνολικό τους φορτίο, την πυκνότητα του φορτίου και την κατανομή του επιφανειακού φορτίου. Το καθαρό επιφανειακό φορτίο των μορίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούνται από πολλά διαφορετικά αμινοξέα που περιέχουν ασθενείς όξινες και βασικές ομάδες, το καθαρό επιφανειακό φορτίο θα αλλάξει σταδιακά καθώς αλλάζει το pH του περιβάλλοντος, δηλαδή οι πρωτεΐνες είναι επαμφοτερίζοντα μόρια.

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι η σχέση μεταξύ καθαρού επιφανειακού φορτίου και pH είναι μοναδική για μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Σε ένα διαχωρισμό με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, οι αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φορτισμένων μορίων και αντιθέτως φορτισμένων μέσων χρωματογραφίας ελέγχονται για να ευνοηθούν η δέσμευση ή η έκλυση συγκεκριμένων μορίων και να επιτευχθεί διαχωρισμός. Μια πρωτεΐνη που δεν έχει καθαρό φορτίο σε ένα ισοδύναμο pH με το ισοηλεκτρικό σημείο της (pI) δεν θα

αλληλεπιδρά με ένα φορτισμένο μέσο. Εν τούτοις, σε ένα pH πάνω από το pI, μία πρωτεΐνη θα δεσμεύεται σε ένα θετικά φορτισμένο μέσο ή ανιοανταλλάκτη και, σε ένα pH κάτω από το pI, μία πρωτεΐνη θα δεσμεύεται σε ένα αρνητικά φορτισμένο μέσο ή κατιοντοανταλλάκτη. Εκτός από την αλληλεπίδραση ανταλλαγής ιόντων, μπορούν να συμβούν και άλλοι τύποι δέσμευσης, αλλά αυτά τα φαινόμενα είναι πολύ μικρά και οφείλονται κυρίως στις δυνάμεις Van der Waals και τις μη πολικές αλληλεπιδράσεις. Ένα μέσο χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής περιλαμβάνει μια μήτρα σφαιρικών σωματιδίων υποκατεστημένων με ιονικές ομάδες που είναι αρνητικά ή θετικά φορτισμένες. Η μήτρα είναι συνήθως πορώδης για να δώσει μια υψηλή εσωτερική επιφάνεια. Το μέσο συσκευάζεται σε μια στήλη και η στήλη εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο γεμίζει τους πόρους της μήτρας και τον χώρο μεταξύ των σωματιδίων (Healthcare, 2010a).

- Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος (buffer)

Προπαρασκευαστικό βήμα πριν την έναρξη της τεχνικής είναι η παρασκευή των κατάλληλων buffer. Το ρυθμιστικό pH και η ιοντική ισχύς είναι ζωτικής σημασίας για όλες τις μορφές ιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας. Είναι καλύτερο να αναπροσαρμόζεται το pH του ρυθμιστικού διαλύματος μετά τη ρύθμιση της συγκέντρωσης του άλατος και να διασφαλίζεται ότι τα αντίθετα ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος είναι συμβατά. Τα ιόντα ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να έχουν το ίδιο φορτίο με τη ρητίνη.

- Εξισορρόπηση

Το πρώτο βήμα είναι η εξισορρόπηση της στατικής φάσης στις επιθυμητές συνθήκες εκκίνησης. Όταν επιτευχθεί ισορροπία, όλες οι φορτισμένες ομάδες της στατικής φάσης δεσμεύονται με ανταλλάξιμα αντίθετα φορτισμένα ιόντα, όπως χλώριο ή νάτριο. Το pH και η ιοντική ισχύς του διαλύματος εξισορρόπησης επιλέγονται έτσι ώστε να διασφαλίζεται ότι, όταν το δείγμα φορτωθεί, οι πρωτεΐνες στόχοι θα δεσμευτούν στο μέσο και θα απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες πρωτεΐνες. Συνήθως χρειάζεται 3-5 φορές τον όγκο της στήλης από ρυθμιστικό διάλυμα.

- Φόρτωση του δείγματος, σύνδεση στη στήλη και πλύση

Το δεύτερο βήμα είναι η εισαγωγή του δείγματος και η πλύση. Ο στόχος σε αυτό το βήμα είναι να δεσμευτούν τα μόρια-στόχοι και να απομακρυνθούν όλα τα μόρια που δεν έχουν συνδεθεί. Το ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος θα πρέπει να έχει το ίδιο pH και την ίδια ιοντική ισχύ με το διάλυμα εξισορρόπησης προκειμένου να δεσμεύσει όλες τις φορτισμένες πρωτεΐνες στόχους. Αντίθετα, φορτισμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται σε ιονικές ομάδες του υλικού της στήλης και συγκεντρώνονται στη στήλη. Οι μη φορτισμένες πρωτεΐνες ή εκείνες με το ίδιο φορτίο περνούν μέσω της στήλης με ταχύτητα ίδια με τη ροή του ρυθμιστικού διαλύματος, και εκλύονται κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά την εισαγωγή του δείγματος, ανάλογα με τον συνολικό όγκο του δείγματος που φορτώθηκε.

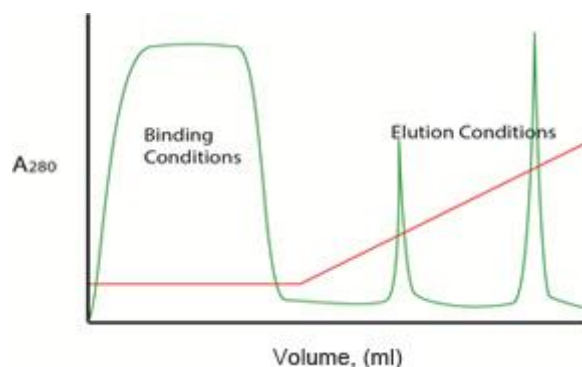
- Έκλυση

Αφού εφαρμοστεί όλο το δείγμα και η στήλη πλυθεί με διάλυμα εξισορρόπησης, οι συνθήκες μεταβάλλονται για να εκλυσθούν οι δεσμευμένες πρωτεΐνες. Πιο συχνά, οι πρωτεΐνες εκλύονται αυξάνοντας την ιοντική ισχύ (συγκέντρωση άλατος) του διαλύματος ή αλλάζοντας το pH. Καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνει, τα ιόντα των αλάτων (τυπικά Na^+ ή Cl^-) ανταγωνίζονται τους προσδεμένους παράγοντες στις φορτισμένες ομάδες της επιφάνειας του υλικού της στήλης και ένα ή περισσότερα προσδεμένα συστατικά θα αρχίσουν να εκλύονται και να κινούνται προς τα κάτω στη στήλη. Οι πρωτεΐνες με το χαμηλότερο καθαρό φορτίο στο επιλεγμένο pH θα είναι οι πρώτες που εκλύονται από τη στήλη καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνεται. Παρομοίως, οι πρωτεΐνες με το υψηλότερο φορτίο σε ένα ορισμένο pH θα διατηρηθούν με μεγάλη δύναμη και θα εκλυσθούν τελευταίες. Όσο υψηλότερο είναι το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης, τόσο μεγαλύτερη είναι η ιοντική ισχύς που απαιτείται για την έκλυση. Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει η διαβάθμιση της συγκέντρωσης του παράγοντα έκλυσης, οι πρωτεΐνες εκλύονται σε διαφορετικό στάδιο σε πιο καθαρή και συμπυκνωμένη μορφή.

- Καθαρισμός της στήλης και επανεξισορρόπηση

Μια τελική πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος αναγεννά τη στήλη και απομακρύνει ότι έχει μείνει ισχυρά προσδεμένο στη στήλη. Αυτό οδηγεί σε πλήρη

ανάκτηση της δεσμευτικής ικανότητας της στήλης ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά. Τέλος, η στήλη επανα-εξισορροπείται στο αρχικό διάλυμα πριν χρησιμοποιηθεί ξανά (Healthcare, 2010a).



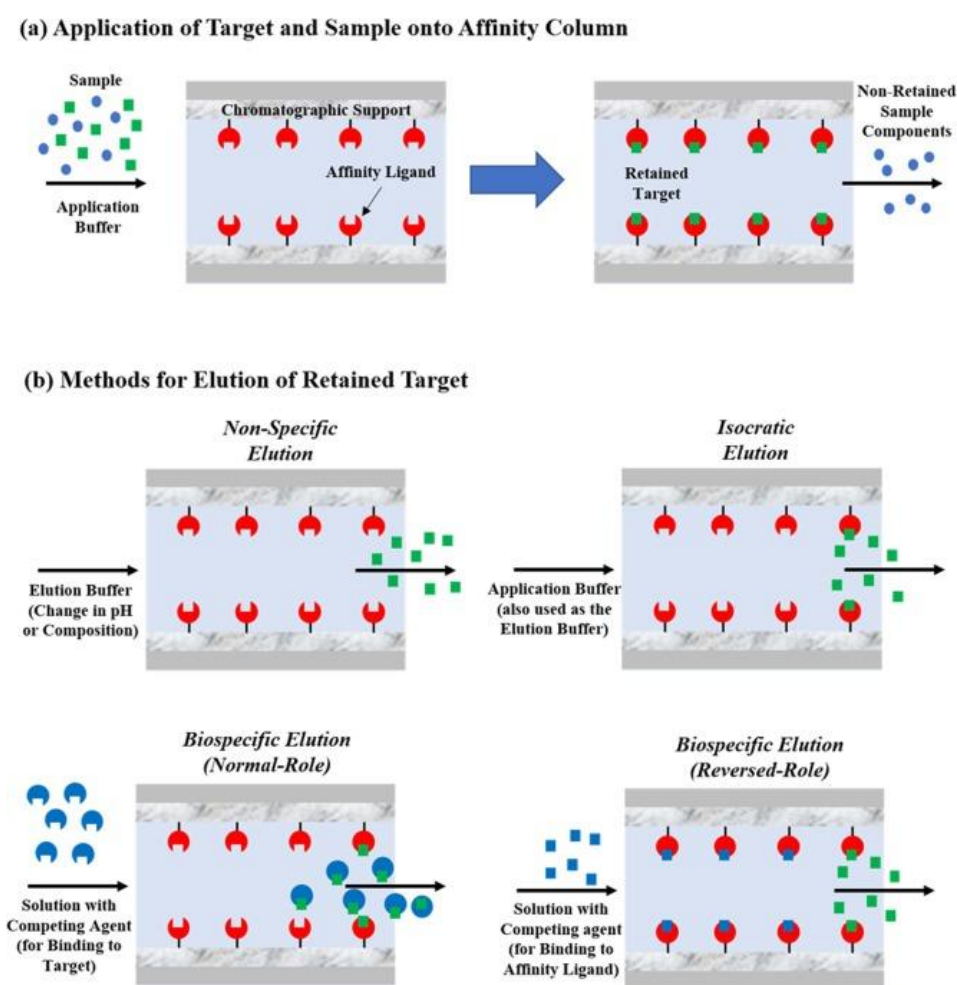
Εικ. 12 Σχεδιαγράμματα που απεικονίζουν διαχωρισμό πρωτεϊνών με μια τυπική στήλη ανταλλαγής κατιόντων. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης κατά την έκλουση παρουσιάζεται με πράσινο χρώμα και η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος κατά τις φάσεις δέσμευσης και έκλουσης παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα. [Πηγή : Biorad.com]

2.1.2 Χρωματογραφία συγγένειας

Χρωματογραφία συγγένειας χαρακτηρίζεται η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας στην οποία χρησιμοποιείται ένας βιολογικός ή βιομημητικός παράγοντας για την επιλεκτική κατακράτηση συμπληρωματικών ενώσεων και τον διαχωρισμό τους. Η λειτουργία της βασίζεται στην ειδική αναγνωριστική σύνδεση μεταξύ πολλών βιολογικών μορίων, όπως μια ορμόνης με τον υποδοχέα της ή μεταξύ αντισωμάτων με άλλα αντισώματα ή αντιγόνα. Ο παράγοντας σύνδεσης (affinity ligand) τοποθετείται μαζί με το στήριγμά του μέσα στη στήλη σχηματίζοντας ένα στερεό υπόστρωμα. Η χρωματογραφία συγγένειας είναι σχετικά απλή στην εκτέλεση και είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τον διαχωρισμό βιολογικών μακρομορίων (Hage, 2013) και έχει χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες για την απομόνωση και τον καθαρισμό συγκεκριμένων στόχων, εκμεταλλευόμενη την επιλεκτική και αναστρέψιμη δέσμευση που εμφανίζεται σε πολλές βιολογικές αλληλεπιδράσεις (Rodriguez et al., 2020).

Αρχικά, ένα διάλυμα που περιέχει τον στόχο που μας ενδιαφέρει διέρχεται μέσω μιας στήλης που περιέχει έναν ακινητοποιημένο παράγοντα σύνδεσης ικανό να δεσμεύσει

το στόχο (Εικ. 13). Αυτό το βήμα εκτελείται με τη παρουσία ενός ρυθμιστικού διαλύματος που επιτρέπει τη δημιουργία της σύνδεσης. Η προκείμενη αλληλεπίδραση είναι επιλεκτικής φύσης, με αποτέλεσμα ο παράγοντας σύνδεσης να εντοπίσει και να συγκρατήσει το στόχο, ενώ παράλληλα επιτρέπει σε όλες τις υπόλοιπες ενώσεις που υπάρχουν στο δείγμα να διέλθουν μέσα από τη στήλη. Ωστόσο, λόγω της ισχυρής δέσμευσης που υπάρχει συχνά μεταξύ του στόχου και του παράγοντα σύνδεσης, ο στόχος διατηρείται εντός της στήλης έως ότου μεταβληθούν η κινητή φάση ή οι χρωματογραφικές συνθήκες. Αυτή η παραλλαγή των συνθηκών συχνά επιτυγχάνεται με τη διέλευση ενός ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης μέσω της στήλης (Hage, 2013).



Εικ. 13 Αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας της χρωματογραφίας συγγένειας. Παρουσιάζονται (α) τα στάδια εφαρμογής/πλύσης του δείγματος και (β) παραδείγματα μεθόδων έκλουσης (Rodriguez et al., 2020).

Οι τρεις τύποι έκλουσης που παρουσιάζονται στην εικόνα 13, είναι η μη-ειδική έκλουση, η ισοκρατική έκλουση και η βιοειδική έκλουση. Οι μέθοδοι για βιοειδική έκλουση μπορούν περαιτέρω να χωριστούν σε έκλουση κανονικού ρόλου, στην οποία ένας ανταγωνιστικός παράγοντας δεσμεύεται στον στόχο και σε έκλουση αντίστροφου ρόλου, στην οποία ο ανταγωνιστικός παράγοντας δεσμεύεται στον ακινητοποιημένο παράγοντα σύνδεσης (Rodriguez et al., 2020). Καθώς ο στόχος εκλούεται από τη στήλη, συλλαμβάνεται για περαιτέρω χρήση (προετοιμασία) ή παρακολουθείται από έναν ανιχνευτή (ανάλυση). Η στήλη στη συνέχεια καθαρίζεται, αφήνεται να αναγεννηθεί στο buffer εφαρμογής της ώστε να είναι έτοιμη για την εφαρμογή του επόμενου δείγματος (Hage, 2013).

2.1.3 Γενική μέθοδος απομόνωσης ενζύμων

Η απομόνωση πρωτεϊνών και ενζύμων μπορεί να συμβεί είτε από φυσική πηγή (π.χ. καρπούς, ρίζες φυτών) είτε από ανασυνδυασμένα κύτταρα μικροοργανισμών που εκφράζουν την επιθυμητή πρωτεΐνη. Ο τρόπος διαχωρισμού επιλέγεται συνήθως σύμφωνα με δύο κριτήρια: α) συμβατότητα με το δείγμα και με το σύστημα ανίχνευσης, β) ικανότητα διάκρισης της αναλυόμενης ουσίας-στόχου και των υπόλοιπων συστατικών (Method Selection).

Η γενική διαδικασία που υιοθετείται για τον καθαρισμό ενός ανασυνδυασμένου παραγόμενου ενζύμου αφορά την επιλογή βιολογικής πρώτης ύλης (π.χ. στελέχη βακτηρίων), τη μέθοδο ομογενοποίησης και μια αλληλουχία συνδυασμένων μεθόδων διαχωρισμού. Μετά τη διάσπαση των κυττάρων (πχ μέσω sonicator), το ομογενοποίημα πρέπει να διαυγαστεί (συνήθως με φυγοκέντρηση) για να απορριφθεί το ίζημα και να ληφθεί το υπερκείμενο, το οποίο, εκτός από πρωτεΐνες, περιέχει πολλές άλλες ουσίες υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους. Τα μικρά μόρια μπορούν να απομακρυνθούν με διαπίδυση (dialysis) ή με φιλτράρισμα (φυγοκέντρωσης, γέλης). Ωστόσο, σε παρασκευάσματα μεγάλης κλίμακας, τα ογκώδη ομογενοποιημένα δεν είναι εύκολο να διαυγαστούν με φυγοκέντρηση και γι' αυτό χρησιμοποιούνται άλλες προκαταρκτικές τεχνικές για την απομάκρυνση σωματιδίων, ανεπιθύμητων πρωτεϊνών και μη πρωτεϊνικών μορίων, όπως η καθίζηση με άλατα, οργανικούς διαλύτες, ρύθμιση του pH ή θερμική επεξεργασία. Επίσης, η επιλεκτική απομάκρυνση νουκλεϊκών οξέων (ισχυρά φορτισμένα μόρια που μπορεί να μην διαχωριστούν κατά τον καθαρισμό) με

προσθήκη στρεπτομυκίνης, διυδροστρεπτομυκίνης ή θειικής πρωταμίνης και χλωριούχου μαγγανίου μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί ως προκαταρκτικό στάδιο (Pontis, 2017).

Η σειρά των σταδίων διαχωρισμού καθορίζεται από τον αρχικό όγκο και την αρχή της μεθόδου που πρέπει να υιοθετηθεί. Είναι σημαντικό, εφόσον είναι εφικτό, ο αρχικός μεγάλος όγκος του ακατέργαστου εκχυλίσματος να μειωθεί στο πρώτο βήμα για να διατηρηθεί η ενζυμική δραστηριότητα, η οποία είναι συνήθως πιο ασταθής σε αραιωμένα διαλύματα. Η διαδικασία διαχωρισμού κλασμάτων θα πρέπει να παρακολουθείται με μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας μετά από κάθε βήμα, κατά προτίμηση με απλή και γρήγορη μέθοδο. Για να βελτιστοποιηθεί η αλληλουχία των μεθόδων, κάθε βήμα θα πρέπει πρώτα να εκτελείται σε μικρή κλίμακα και στη συνέχεια να κλιμακώνεται (Pontis, 2017).

2.2 SDS-PAGE – Περιγραφή και αρχή μεθόδου πειραματικής διαδικασίας

Η ηλεκτροφόρηση γέλης δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE) είναι μια τεχνική υψηλής ανάλυσης που χρησιμοποιείται συνήθως για τον διαχωρισμό του μείγματος πρωτεϊνών σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Το SDS PAGE περιλαμβάνει τη χρήση πολυακρυλαμιδίου ως γέλης και δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS) ως ιοντικού απορρυπαντικού για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών, ως εκ τούτου, ονομάζεται έτσι. Αυτή η τεχνική αναπτύχθηκε από τον Ulrich K. Laemmli (Masoodi et al., 2021).

Στην παρούσα εργασία, έγινε χρήση ηλεκτροφόρησης σε γέλη πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), για τον έλεγχο καθαρότητας του απομονωμένου με προηγούμενες χρωματογραφικές μεθόδους δείγματος από κονδύλους πατάτας. Ο διαχωρισμός στην SDS PAGE ανάλυση βασίζεται στο μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Για τη βαθμονόμηση της γέλης χρησιμοποιήσαμε ειδικό marker της εταιρίας Biorad™. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στη γέλη αυξάνεται γραμμικά από πάνω προς τα κάτω με αποτέλεσμα το μέγεθος των πόρων να μειώνεται όσο μεγαλώνει η απόσταση που διανύουν οι πρωτεΐνες. Καθώς οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος της γέλης από περιοχές με μεγάλους πόρους σε περιοχές με μικρούς πόρους, ο ρυθμός μετατόπισής τους μειώνεται. Έτσι, οι μικρότερες πρωτεΐνες

κινούνται γρηγορότερα και περισσότερο, ενώ οι μεγαλύτερες κινούνται πιο αργά, καθώς το μεγαλύτερο μέγεθος αυξάνει την τριβή και μειώνει την κινητικότητα.

Για την κατασκευή της γέλης για την ανίχνευση της L-PSP με μοριακό βάρος 104 kDa ακολουθήσαμε τη συνταγή που παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

	Φάση διαχωρισμού (15ml) (Resolving Gel) 10%	Φάση επιστοίβαξης (3ml) (Stacking Gel) 5%
H ₂ O	5,9 ml	2,1 ml
30% acrylamide mix	5,0 ml	0,5 ml
1.5M Tris (pH=8.8)	3,8 ml	-
1.0M Tris (pH=6.8)	-	0,38 ml
10% SDS	0,15 ml	0,03 ml
10% Ammonium Persulfate	0,15 ml	0,03 ml
TEMED	0,006 ml	0,003 ml

Πίνακας 1. Αναλογία συστατικών για τη παραγωγή πηκτωμάτων για SDS-PAGE ανάλυση.

2.3 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που λειτουργούν ως βιολογικοί καταλύτες για την επιτάχυνση χημικών αντιδράσεων. Για πολλά ένζυμα η ταχύτητα κατάλυσης (V₀) ορίζεται ως ο αριθμός μορίων προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο. Μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν τη ταχύτητα κατάλυσης είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος (S).

2.3.1 Κινητική Michaelis-Menten και διάγραμμα Lineweaver-Burk

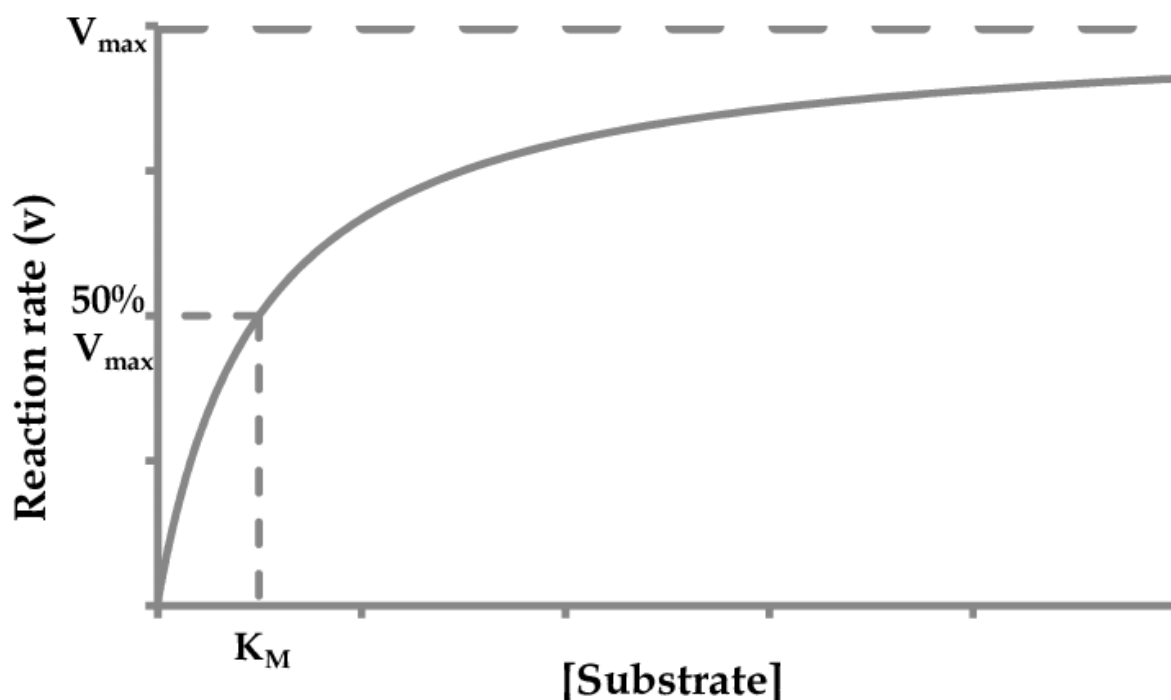
Το 1913, περίπου έναν αιώνα πριν, οι Michaelis-Menten δημοσίευσαν την πλέον διαδεδομένη και κλασσική μελέτη “Die Kinetik der Invertinwirkung”, όπου απέδειξαν ότι ο ρυθμός μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος (Johnson et al., 2011). Για τις μελέτες τους χρησιμοποίησαν την ιμβερτάση ως καταλυτικό ένζυμο και παρήγαγαν την εξίσωση Michaelis – Menten :

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

, όπου V_o : η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, V_{max} : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, $[S]$: η συγκέντρωση του υποστρώματος και K_m : η σταθερά Michaelis – Menten. Η K_m έχει μονάδες συγκέντρωσης και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος. Ο μαθηματικός ορισμός της K_m είναι :

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

, όπου k_1, k_2, k_{-1} : οι σταθερές ταχύτητας αντιδράσεων.



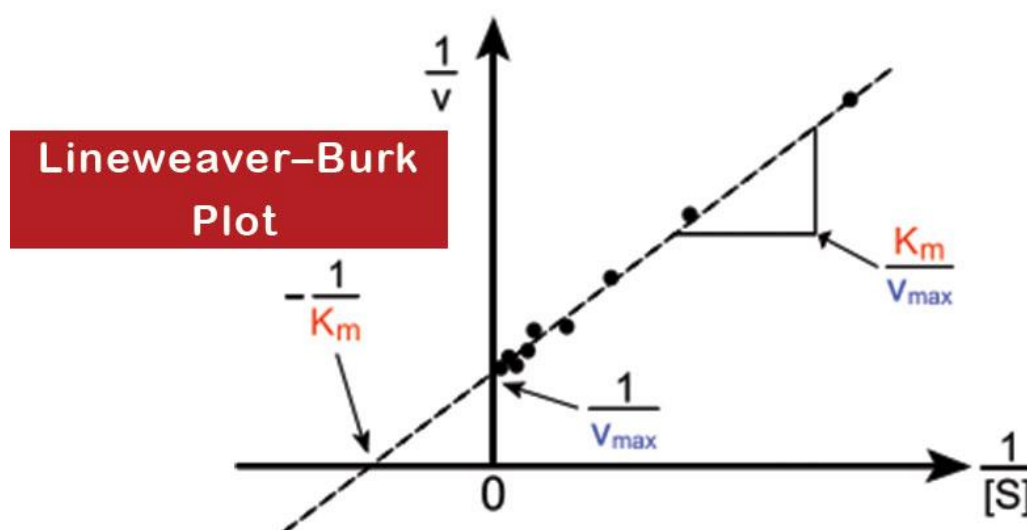
Εικ. 14 Γραφική παράσταση της υπερβολικής εξίσωσης Michaelis – Menten που απεικονίζει το ρυθμό κατάλυσης σε σχέση με τη συγκέντρωση υποστρώματος (Walsh, 2012).

Όπως προκύπτει από το παραπάνω διάγραμμα, όταν $[S]=K_m$, τότε $V_o=V_{max}/2$. Δηλαδή, η K_m είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η $[S]$ είναι πολύ μικρότερη από την K_m ,

$V_0 = (V_{max}/K_m) \cdot [S]$, δηλαδή η ταχύτητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η $[S]$ είναι πολύ μεγαλύτερη από την K_m , $V_0 = V_{max}$, δηλαδή η ταχύτητα είναι μέγιστη, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του υποστρώματος (Berg, Tymoczko & Stryer, 2012).

Ωστόσο, οφείλει να αναφερθεί ότι με τον παραπάνω τρόπο η V_{max} υπολογίζεται μόνο προσεγγιστικά, αφού αυτή προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Ο υπολογισμός της K_m και V_{max} σήμερα επιτυγχάνεται με τη χρήση προγραμμάτων προσομοίωσης δεδομένων με τη βοήθεια υπολογιστή. Πριν από την εμφάνιση αυτών, για ακριβέστερο υπολογισμό της σταθεράς Michaelis, γινόταν χρήση μετασχηματισμένης εξίσωσης Michaelis-Menten ώστε να δίνει διάγραμμα ευθείας γραμμής (Εικ. 15). Ο λόγος για την εξίσωση Lineweaver-Burk ή διπλού αντιστρόφου, η οποία προκύπτει από την αντιστροφή και των δύο πλευρών της εξίσωσης Michaelis-Menten:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$



Εικ. 15 Το διάγραμμα διπλού αντιστρόφου της ενζυμικής κινητικής παράγεται παριστάνοντας γραφικά το $1/V_0$ ως συνάρτηση του $1/[S]$ (Chang, 2005).

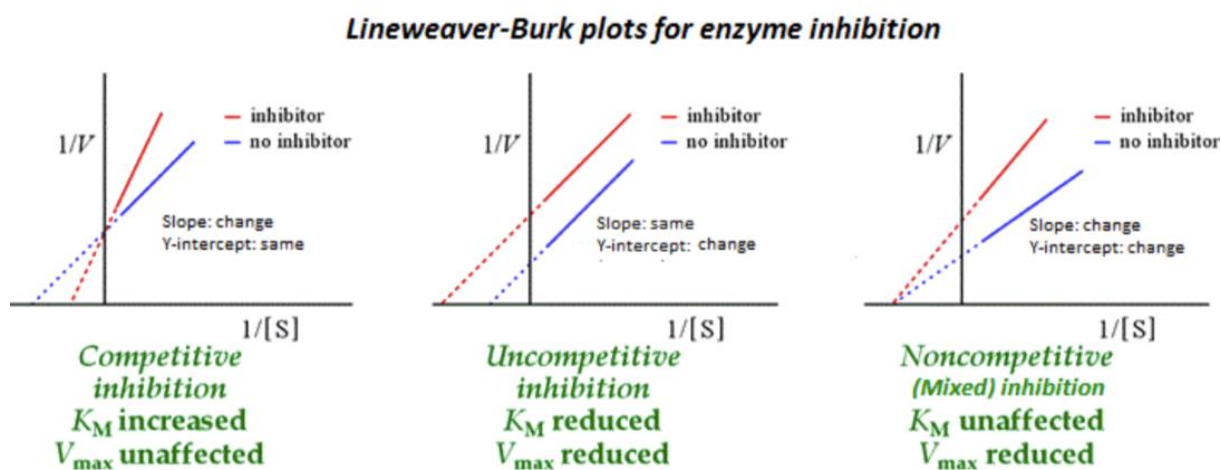
Το διάγραμμα παράγει μια ευθεία γραμμή που τέμνει τον άξονα y στο $1/V_{max}$ και φέρει κλίση K_m / V_{max} . Το σημείο τομής με τον άξονα x είναι $-1 / K_m$. (Berg, Tymoczko & Stryer, 2012)

2.3.2. Αναστολή δραστικότητας ενζύμων

Οι αναστολείς είναι ειδικά μικρά μόρια ή ιόντα που προσδένονται στα ένζυμα και επηρεάζουν τη δραστικότητά τους. Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Η διαφορά τους έγκειται στη ταχύτητα διαχωρισμού του συμπλόκου ενζύμου – αναστολέα (ESI). Η αντιστρεπτή αναστολή χαρακτηρίζεται από ταχύ διαχωρισμό συμπλόκου και διακρίνεται σε συναγωνιστική, ασυναγωνιστική ή μη συναγωνιστική. Για να προσδιοριστεί αν ένας αναστολέας παρουσιάζει συναγωνιστική, ασυναγωνιστική ή μη συναγωνιστική αναστολή, οι μετρήσεις των ταχυτήτων της κατάλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα έχουν σκοπό τη διάκριση μεταξύ των τριών τύπων αναστολής. Η εξίσωση Lineweaver - Burk μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να ενσωματώνει την επίδραση των αναστολέων ως εξής:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right)$$

, όπου: [I]: η συγκέντρωση του αναστολέα, K_i : η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ένζυμου-αναστολέα.



Εικ. 16 Διαγράμματα Lineweaver-Burk με και χωρίς την παρουσία αναστολέων α) συναγωνιστικού β) ασυναγωνιστικού γ) μη συναγωνιστικού. Πηγή : Bizz1111 CC0 1.0 Universal (CC0 1.0) Public Domain Dedication.

2.3.3 Περιγραφή μεθόδου κινητικής της ενζυμικής αντίδρασης της PSP

Η ενζυμική κινητική μελέτη της PSP βασίζεται στην αμφίδρομη πορεία της αντίδρασης της PSP. Συγκεκριμένα, μελετήσαμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, δηλαδή προς τη σύνθεση του γλυκογόνου, όπου έχουμε την ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης (G1P) στο γλυκογόνο. Έτσι, προκύπτει γλυκογόνο με ένα επιπλέον κατάλοιπο γλυκόζης με παράλληλη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων (Pi) από την G1P. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά ώστε να ποσοτικοποιηθούν. Τα ορθοφωσφορικά ιόντα σχηματίζουν σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία Zn^{2+} , το οποίο απορροφά ισχυρά την υπεριώδη ακτινοβολία. Μετά από αναγωγή με το ασκορβικό οξύ, παράγεται χρωμοφόρο σύμπλοκο που απορροφά σε μήκος κύματος 850 nm. Να σημειωθεί ότι έγινε χρήση γλυκογόνου αντί για άμυλο, καθώς το άμυλο είναι δυσδιάλυτο στο νερό και στο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης. Επομένως, επιλέξαμε έναν άλλο πολυσακχαρίτη, όπως είναι το γλυκογόνο, για να εξαγάγουμε ασφαλή αποτελέσματα.

Πρώτο βήμα της μεθόδου, είναι η δημιουργία των buffers του διαλύματος φωτομέτρησης, το οποίο είναι μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100 mM οξικού ψευδαργύρου και 10% w/v ασκορβικό οξύ με pH 5.0. Ετοιμάζουμε μαζί σε ένα bicker το μολυβδαινικό αμμώνιο και τον οξικό ψευδάργυρο και ρυθμίζουμε το pH του με HCl στο 5. Ετοιμάζουμε και το ασκορβικό οξύ σε ξεχωριστό bicker και ρυθμίζουμε με NaOH για pH = 5. Αργότερα, τα διαλύματα θα αναμιχθούν σε αναλογία 4:1 και θα παραμείνουν για 15-20 min σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Επίσης, παρασκευάσθηκε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 1 (Assay Buffer 1) που περιέχει 400 mM KCl, 4 mM DTT, 4 mM EDTA. Από αυτό με αραίωση προκύπτει το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 2 (Assay Buffer 2) με 270 mM KCl, 2.7 mM DTT, 2.7 mM EDTA. Με το Assay Buffer 2 θα ετοιμαστούν στη συνέχεια τα stock της G1P.

Δεύτερο βήμα είναι η δημιουργία των stock από G1P, η οποία θα αποτελέσει το υπόστρωμα της αντίδρασης. Παρασκευάζουμε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις των 13,5 mM / 18 mM / 27 mM / 45 mM / 67,5 mM / 90 mM G1P. Το κάθε ένα σωληνάριο περιέχει ταυτόχρονα 270 mM KCl και ο συνολικός όγκος του διαλύματος είναι 200 μ L. Τα stock διατηρούνται για λίγες μέρες στο ψυγείο σε θερμοκρασία -20° C.

Αφού έχουμε ετοιμάσει τα buffer και το stock, ξεκινάμε να γεμίζουμε 24 σωληνάρια με 10 μL SDS (1% w/v) στο καθένα. Ετοιμάζουμε 4 σωληνάρια για κάθε συγκέντρωση G1P με ονομασία A1, A2, A3, A4 / B1, B2, B3, B4 και ούτω καθεξής. Προσέχουμε το διάλυμα SDS να είναι σε θερμοκρασία δωματίου και να είναι σε πλήρως υγρή μορφή, χωρίς μικροκρυστάλλους. Έπειτα, ακολουθεί η προετοιμασία των υποστρωμάτων της αντίδρασης όπου σε 6 σωληνάρια επισημασμένα ως A, B, Γ, Δ, Ε, Στ τοποθετούμε με την πιπέτα 40 μL από το κάθε stock της G1P και 104 μL H_2O , έτσι ώστε ο συνολικός όγκος στο κάθε σωληνάριο να είναι 144 μL .

Τέλος, ετοιμάζεται το ενζυμικό διάλυμα συνολικού όγκου 240 μL , το οποίο περιέχει :

- 24 μL γλυκογόνο
- 180 μL Assay Buffer 1
- 30 μL H_2O
- 6 μL PSP

Αφού προστεθεί και το ένζυμο, το οποίο προστίθεται τελευταίο, τοποθετούμε το ενζυμικό διάλυμα στο υδατόλουτρο στους 30° C για 15 min. Από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου, βρέθηκε ότι οι βέλτιστες συνθήκες της ανάστροφης ενζυμικής αντίδρασης της PSP είναι θερμοκρασία 30°C και pH=6. Επομένως, αυτές επιλέχθηκαν για την παρούσα εργασία. Όταν έχουν περάσει 12 min από τη στιγμή που τοποθετήσαμε για επώαση το ενζυμικό διάλυμα, τοποθετούμε στο υδατόλουτρο τα υποστρώματα για 3 min.

Με το πέρας των 15 λεπτών, λαμβάνονται 36 μL από το ενζυμικό διάλυμα και προστίθενται στα 144 μL διαλύματος κάθε υποστρώματος με χρονική απόσταση 20 s. Τη χρονική στιγμή, όπου $t=0$, που προστίθεται το ενζυμικό διάλυμα στο υπόστρωμα A, ξεκινά η ενζυμική αντίδραση η οποία εξελίσσεται σε όγκο αντίδρασης 180 μL . Στη συνέχεια του πειράματος λαμβάνονται 40 μL από το κάθε μίγμα της αντίδρασης ανά 5, 10, 15, 20 min, και αποθέτονται σε 10 μL SDS 1% (w/v) με έντονη ανάδευση μέσω vortex. Κατά την επαφή του όγκου της ενζυμικής αντίδρασης με το SDS, η αντίδραση σταματάει.

Καθώς τα δείγματα είναι έτοιμα, παρασκευάζουμε ειδικά διαλύματα που παίζουν το ρόλο «τυφλού μάρτυρα» κατά τη διάρκεια της φωτομέτρησης. Παρασκευάζονται 4

διαλύματα με τις αναλογίες που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, το καθένα εις διπλούν :

Τυφλό H₂O	10μL SDS 1 (w/v) + 40 μL dH ₂ O
Τυφλό ενζυμικού διαλύματος	10μL SDS 1% (w/v) + 32μL dH ₂ O + 8μL ενζυμικού διαλύματος
Τυφλό G1P	10μL SDS 1% (w/v) + 31.1μL dH ₂ O + 8.9μL από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση G1P
Τυφλό ορθοφωσφορικών	10μL SDS 1% (w/v) + 30μL dH ₂ O + 10μL Pi 1mM

Πίνακας 2. Διαλύματα φωτομέτρησης που παίζουν ρόλο «τυφλού μάρτυρα».

Λίγο πριν ξεκινήσουμε τη φωτομέτρηση, ετοιμάζεται το διάλυμα φωτομέτρησης με τα ρυθμιστικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν στην εκκίνηση της διαδικασίας. Τα διαλύματα αναμιγνύονται σε αναλογία 4:1 και παραμένουν για 15-20 min σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της επώασης του διαλύματος φωτομέτρησης, προσθέτουμε 500 μL από αυτό σε κάθε δείγμα, καθώς και στα τυφλά, και τοποθετούμε στο υδατόλουτρο για 20 min σε θερμοκρασία 30°C.

Οι μετρήσεις στο φωτόμετρο γίνονται για μήκος κύματος 850 nm με τη χρήση ειδικής κυψελίδας στην οποία φορτώνεται κάθε φορά το δείγμα.

Με την παραπάνω διαδικασία, έγινε συλλογή δεδομένων για τον προσδιορισμό της Km και της Ki. Για τον προσδιορισμό της Ki, επαναλάβαμε τη διαδικασία 5 συνολικά φορές, κάθε φορά για διαφορετική συγκέντρωση αναστολέα KS461 διαλυμένη σε DMSO..

2.3.4 Επεξεργασία των κινητικών δεδομένων

Η επεξεργασία των κινητικών δεδομένων και η παραγωγή των απαραίτητων διαγραμμάτων έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα GraFit (Staines, 1998).

Προκειμένου να υπολογιστούν οι κινητικές παράμετροι (Km, Vmax, Ki) υπολογίστηκε αρχικά η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε. Αυτή ορίζεται ως τα μολ υποστρώματος που καταναλώνονται

ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε mg πρωτεΐνης, δηλαδή $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

Για να υπολογιστεί η ειδική δραστηριότητα πρώτα υπολογίζονται τα μmol ορθοφωσφορικών ιόντων που παρήχθησαν από την αντίδραση. Για το λόγο αυτό είχαμε παρασκευάσει ένα πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων το οποίο είχε συγκέντρωση 0.25 mM . Τα 0.25 mM ορθοφωσφορικών ιόντων αντιστοιχούσαν σε $0.01 \mu\text{mol}$ ορθοφωσφορικών ιόντων, διότι: $0.25 \text{ mM} = 0.25 \text{ mmol}/\text{L} = 0.25 \mu\text{mol}/\text{mL}$. Άρα στα $1000 \mu\text{L}$ περιέχονταν $0.25 \mu\text{mol}$ ορθοφωσφορικών ιόντων. Επομένως, σε $40 \mu\text{L}$ που ήταν ο όγκος του τυφλού των ορθοφωσφορικών ιόντων που φωτομετρήθηκε υπήρχαν $0.01 \mu\text{mol}$ ορθοφωσφορικών ιόντων. Αν υποθεθεί ότι το τυφλό των ορθοφωσφορικών ιόντων είχε απορρόφηση A, τότε αυτή η απορρόφηση δηλώνει την παρουσία $0.01 \mu\text{mol}$ ορθοφωσφορικών ιόντων. Με αυτό τον τρόπο υπολογίσθηκε η ποσότητα των ορθοφωσφορικών ιόντων σε μmol για κάθε δείγμα. Αν υποθέσουμε ότι μία μέτρηση έδωσε απορρόφηση B. Για να υπολογίσουμε μόνο τα μmol ορθοφωσφορικών ιόντων που υπήρχαν μέσα στο δείγμα έπρεπε να αφαιρέσουμε τις απορροφήσεις που προήλθαν από το ενζυμικό διάλυμα και την G1P. Έτσι, η απορρόφηση των ορθοφωσφορικών ιόντων ισούταν με

$$(B - \text{Abs. τυφλού. ενζ.} - \text{Abs. τυφλού. G1P} = \text{Abs. φωσφορικών} = C)$$

Εφόσον γνωρίζουμε ότι τα $0.01 \mu\text{mol}$ έδωσαν απορρόφηση A, τότε τα μmol των ορθοφωσφορικών ιόντων στο δείγμα ισούταν με:

$$\frac{c \cdot 0,01}{A} \text{ ή } \frac{B}{A \cdot 100} = \mu\text{mol ορθοφωσφορικών ιόντων στο άγνωστο διάλυμα}$$

Έπειτα, υπολογίσαμε την ειδική δραστηριότητα χρησιμοποιώντας μη γραμμική εξίσωση λαμβάνοντας υπόψη το ανώτατο όριο υδρόλυσης και ένα συντελεστή f.

2.4 Κρυσταλλογραφία

2.4.1 Κρύσταλλος

Ένας κρύσταλλος είναι μια επαναλαμβανόμενη σε τρεις διαστάσεις διάταξη (χωρίς κενά) μοναδιαίων κυψελίδων, που οικοδομεί ένα κρυσταλλικό πλέγμα και κατασκευάζεται με τη μετατόπιση των μοναδιαίων κυψελίδων σε τρεις διαστάσεις,

ώστε να γεμίσει ένας όγκος. Η μονάδα που περιγράφει έναν κρύσταλλο είναι η μοναδιαία κυψελίδα. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιλαμβάνει όλα τα άτομα των μοτίβων του κρυσταλλικού πλέγματος και της ασύμμετρης μονάδας. Οι ακμές της μοναδιαίας κυψελίδας ορίζουν ένα σύνολο μοναδιαίων διανυσματικών αξόνων a , b και c , με τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας να απεικονίζονται στα αντίστοιχα μήκη τους a , b και c .

Η μοναδιαία κυψελίδα κατασκευάζεται με τη μετατόπιση του επαναλαμβανόμενου μοτίβου (τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος) και το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος παράγεται με την εφαρμογή των πράξεων συμμετρίας στην ασύμμετρη μονάδα. Τα μόρια σε ένα κρύσταλλο τοποθετούνται με τάξη, δηλαδή κανονικά, συμμετρικά και επαναλαμβανόμενα (Kensal E. van Holde, 2006). Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί για τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας. Οι περιορισμοί που τίθενται για τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας επιτρέπουν την κατασκευή 14 μοναδικών κρυσταλλικών πλεγμάτων. Αυτά είναι τα κρυσταλλικά πλέγματα Bravais. Ο συνδυασμός των 32 τύπων συμμετρίας μαζί με τα 14 κρυσταλλικά πλέγματα Bravais περιγράφουν όλες τις πιθανές μορφολογίες των κρυστάλλων που παράγουν τις μορφές και τη συμμετρία 230 διαφορετικών ομάδων χώρου, όπου κάθε ομάδα χώρου καθορίζει μοναδικά τον αριθμό των ασύμμετρων μονάδων, που συναποτελούν τη μοναδιαία κυψελίδα του κρυστάλλου.

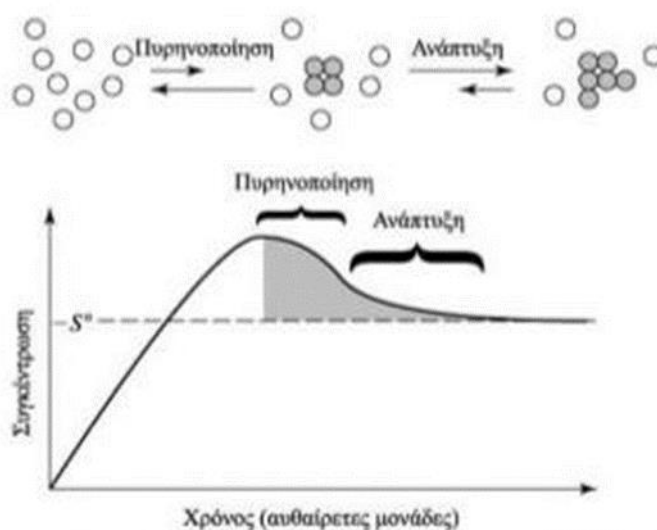
Bravais lattice	Parameters	Simple (P)	Volume centered (I)	Base centered (C)	Face centered (F)
Triclinic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} \neq \alpha_{23} \neq \alpha_{31}$				
Monoclinic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$ $\alpha_{12} \neq 90^\circ$				
Orthorhombic	$a_1 \neq a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Tetragonal	$a_1 = a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Trigonal	$a_1 = a_2 = a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} < 120^\circ$				
Cubic	$a_1 = a_2 = a_3$ $\alpha_{12} = \alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				
Hexagonal	$a_1 = a_2 \neq a_3$ $\alpha_{12} = 120^\circ$ $\alpha_{23} = \alpha_{31} = 90^\circ$				

Εικ. 17 Τα δεκατέσσερα πλέγματα Bravais σε τρεις διαστάσεις. Πηγή: D.V.Anghel, Bravais lattice table, 2003

2.4.2. Ανάπτυξη κρυστάλλων

Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου συμβαίνει σε δύο διακριτά βήματα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 18 :

- 1) ένα βήμα χαμηλής πιθανότητας για την πυρήνωση.
- 2) ένα βήμα υψηλής πιθανότητας για την αύξηση (ή διάδοση) του μεγέθους του κρυστάλλου.



Εικ. 18 Ο μηχανισμός της κρυστάλλωσης (Kensal E. van Holde, 2006).

Το στάδιο της πυρήνωσης απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη. Η απαραίτητη αυτή δύναμη για την πυρήνωση προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή αρκετά υψηλότερη από την εγγενή τους διαλυτότητα (υπερκορεσμός). Η επακόλουθη προσθήκη μορίων στις κρυσταλλικές επιφάνειες λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τον υπερκορεσμό, κοντά στην εγγενή διαλυτότητα. Κατά συνέπεια, η αύξηση είναι μια σειρά βημάτων μικροϊσορροπίας για τα μακρομόρια του διαλύματος που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του κρυσταλλικού πλέγματος. Η πυρήνωση είναι το σημαντικότερο από τα δύο βήματα. Εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, ο πυρήνας δε σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δε μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλαπλούς πυρήνες, που θα εξαντλήσουν γρήγορα τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μία

πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Πρέπει να υπάρξει μία ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν αρκούντως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παρέχουν υψηλής ευκρίνειας δεδομένα περίθλασης ακτίνων Χ. Άρα το διάλυμα των μακρομορίων πρέπει να συμπυκνωθεί με έναν πολύ καλά ελεγχόμενο τρόπο (Kensal E. van Holde, 2006).

2.5 Οργανολογία και αντιδραστήρια

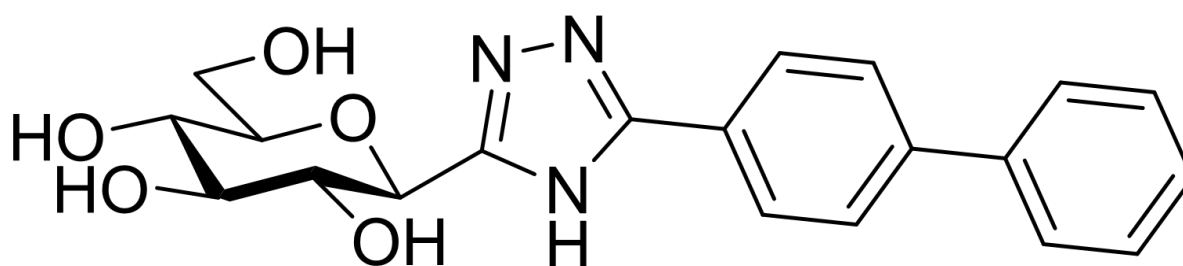
Τεχνική	Όργανο	Εταιρία
FPLC	ÄKTA Purifier (FPLC)	GE Healthcare
Στήλη ιοντοανταλλαγής	Sepharose 6B – β-cyclodextrin	Sigma Aldrich
Στήλη συγγένειας	DEAE Cellulose XK 50/20	GE Healthcare
Φυγοκέντρηση	Φυγόκεντρος - Z36HK	HermLe
Διαπίδυση	Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Μέτρηση του pH	Πεχάμετρο	Metrohm
Ηλεκτροφόρηση	Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (mini gel)	BioRad
Φωτομέτρηση	Φωτόμετρο	VWR
Ενζυμική κινητική	Υδατόλουτρο	Wisd
Buffer preparation	Πεχάμετρο	Metrohm

Πίνακας 3. Συνολική οργανολογία πειραματικής διάταξης.

Αντιδραστήριο	Φορέας Παραγωγής
Acetic acid (CH ₃ COOH)	Sds
α-D-glucose-1-Phosphate	Sigma
Acrylamide	Serva
Ammonium Molybdate	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Bis acrylamide	Serva

Bromophenole blue	Research Organics
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycogen from oyster type II	Sigma
KS461	Debrecen University
L-Ascorbic acid	Sigma
NaCl	Scharleu
NaH ₂ PO ₄	Merck
SDS	Serva
Sodium citrate	Applichem
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra Pure	Applichem
Zinc acetate	Sigma

Πίνακας 4. Σύνολο αντιδραστηρίων πειραματικής διαδικασίας.



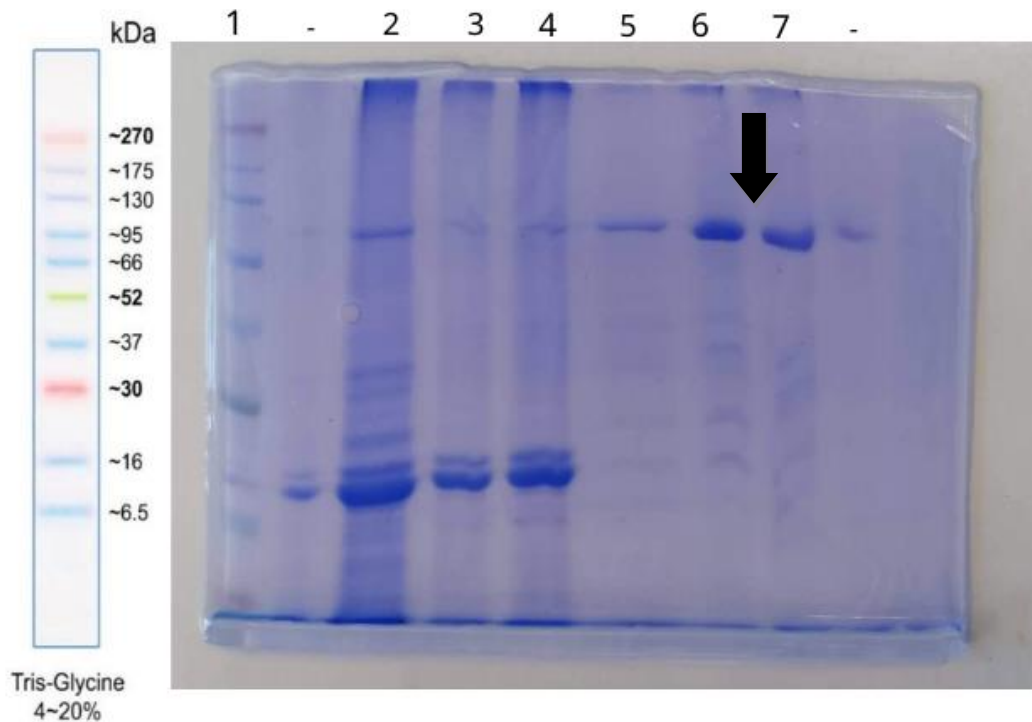
Εικ. 19 Χημική δομή αναστολέα KS461.

3 Αποτελέσματα

3.1 Ανάλυση SDS-PAGE απομόνωσης L-PSP

Η απομόνωση της L-PSP έγινε με τροποποιήσεις στο πρωτόκολλο των Kamogawa και Fukui (Kamogawa et al., 1968). Το πρωτόκολλο και τα χρωματογραφικά δεδομένα δεν παρουσιάζονται (Koulas et al., unpublished data).

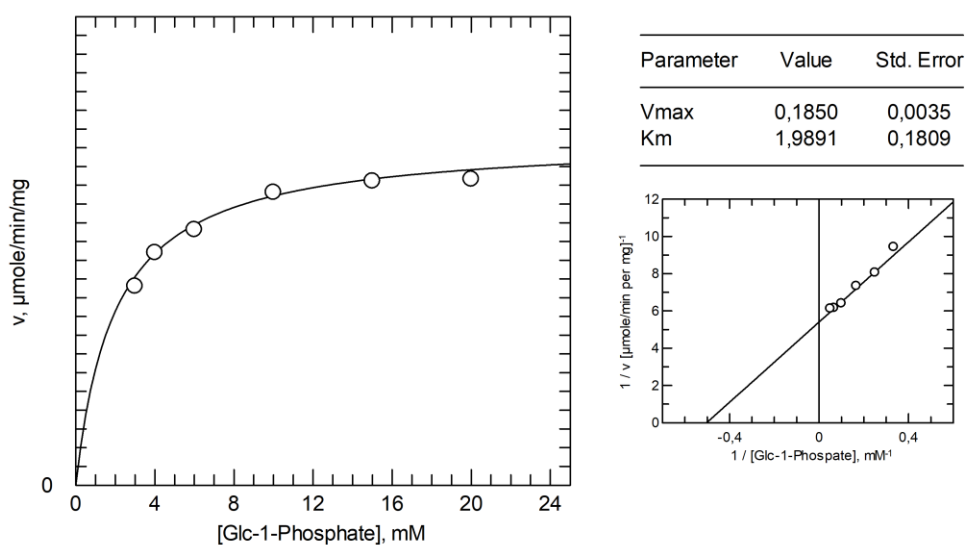
Στη συνέχεια, παρουσιάζεται η γέλη πολυακρυλαμιδίου, η οποία εκτελέστηκε με τη χρήση της τεχνικής SDS – PAGE, για τον έλεγχο καθαρότητας του απομονωμένου ενζύμου με το πέρας της διαδικασίας καθαρισμού και διαχωρισμού.



Εικ. 20 SDS - PAGE με κλίμακα από τον marker "Biorad" που χρησιμοποιήθηκε για βαθμονόμηση μοριακού βάρους σε kDa. Από τα αριστερά παρουσιάζονται στις θέσεις 1. Marker "Biorad", 2. Input, 3. Flow-Through, 4. Flow-Through, 5. Wash Unbound 6. Κλάσμα 1, 7. Κλάσμα 2. Με το βέλος επισημαίνεται η ύπαρξη του ενζύμου στα τελικά κλάσματα και υποδεικνύεται η υψηλή καθαρότητα του δείγματος.

3.2 Προσδιορισμός της K_m

Ακολουθώντας τη πειραματική διαδικασία όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 2.3, καταλήξαμε σε συλλογή πειραματικών δεδομένων τα οποία αναλύθηκαν μέσω του λογισμικού GraFit. Προέκυψε η τιμή $K_m = 1,99 \pm 0,18$ mM και η τιμή $V_{max} = 0,185 \pm 0,003$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.



Εικ. 21 Διάγραμμα προσδιορισμού της V_{max} και K_m της L- PSP έναντι της G1P που προκύπτει από την ανάλυση δεδομένων μέσω του GraFit.

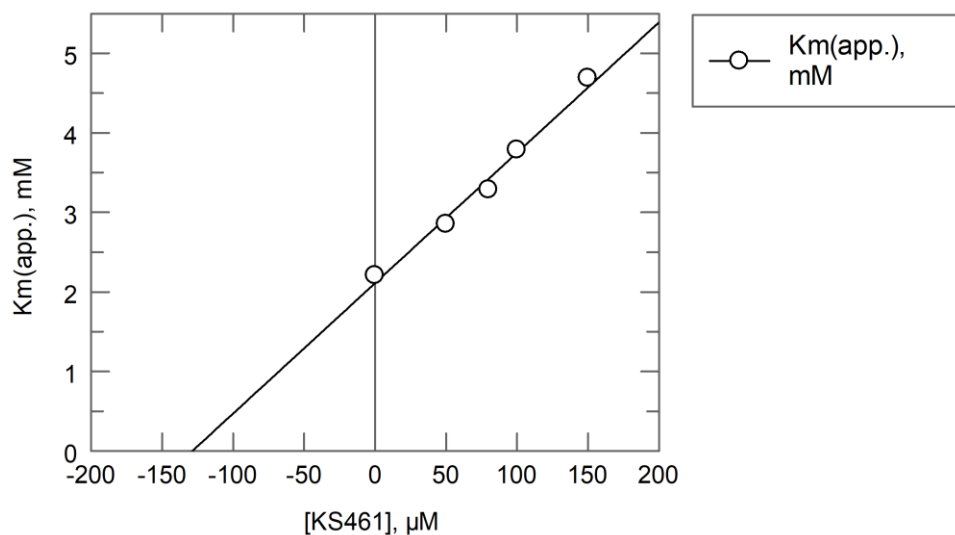
3.3 Προσδιορισμός της K_i

Για τον προσδιορισμό της K_i , υπολογίστηκαν οι $K_m(\text{app})$ για 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα KS461. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της εργασίας είναι :

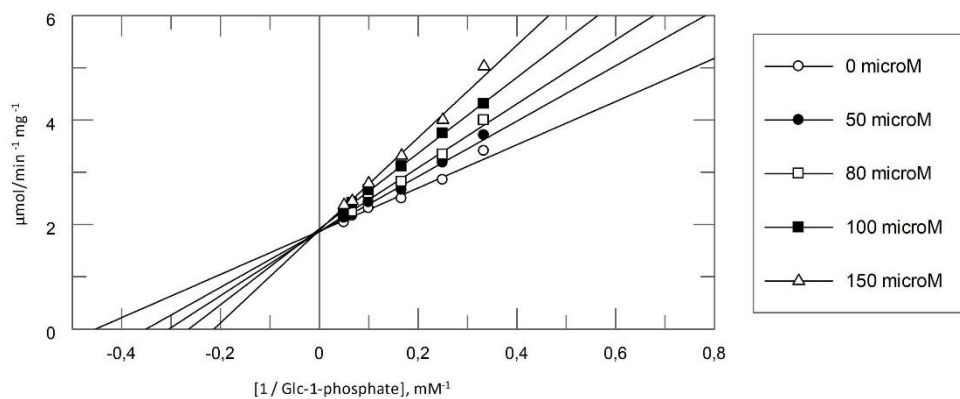
Συγκέντρωση του KS461 (μM)	$K_m(\text{app})$ (mM)
0	$2,21 \pm 0,21$
50	$2,85 \pm 0,18$
80	$3,28 \pm 0,24$
100	$3,78 \pm 0,17$
150	$4,68 \pm 0,32$

Πίνακας 5. Τιμές K_m για κάθε συγκέντρωση KS461.

Η τιμή της K_i προσδιορίστηκε σε $128.67 \pm 11.07 \mu\text{M}$, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνας 21.



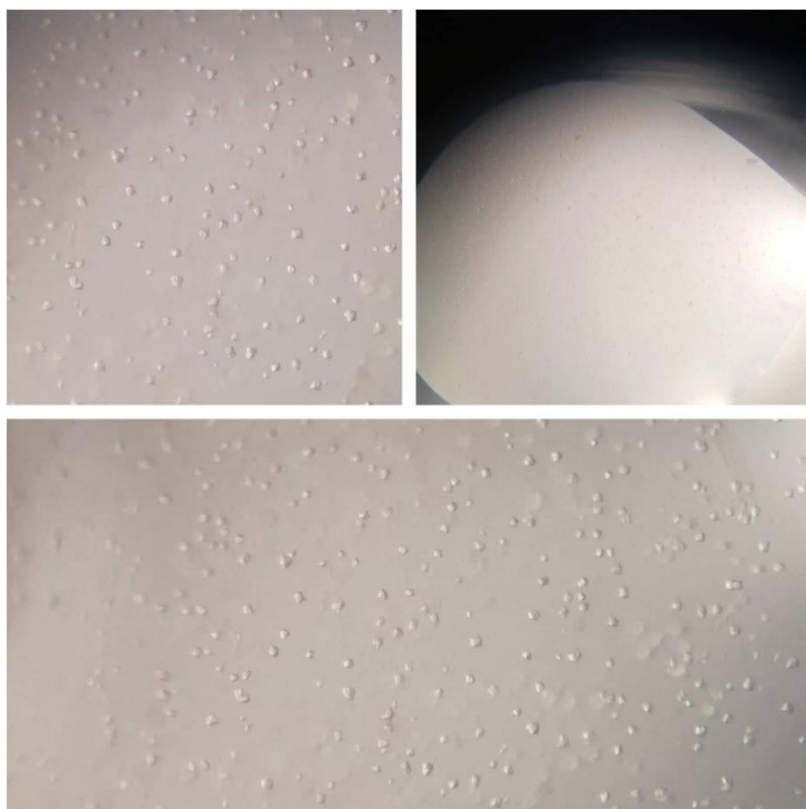
Εικ. 22 Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της K_i για τον αναστολέα KS461 ως προς την L-PSP.



Εικ. 23 Παρουσιάζεται το διάγραμμα Lineweaver-Burk από τον υπολογισμό της K_i για τον αναστολέα KS461 ως προς την L-PSP. Παρατηρούμε ότι ο αναστολέας συναγωνίζεται το υπόστρωμα για την ίδια θέση δέσμευσης.

3.4 Παραγωγή κρυστάλλων L-PSP

Η L-PSP κρυσταλλώθηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική της καθήμενης σταγόνας (sitting drop) χρησιμοποιώντας διάλυμα κρυστάλλωσης που περιέχει 20% (v/v) PEG 4000 και 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 και συγκέντρωση ενζύμου 6 mg/mL (Koulas et al., unpublished data).



Εικ. 24 Κρύσταλλοι L-PSP.

4. Συζήτηση

Πάνε 50 χρόνια απ' όταν οι Gerbrandy and Doorgeest (1972) υποστήριξαν ότι οι κόνδυλοι γεώμηλων περιέχουν ισοένζυμα φωσφορυλάσης, παρ' όλο που τίποτα δεν ήταν γνωστό για την ενδοκυτταρική κατανομή ή το φυσιολογικό τους ρόλο. Ακόμη και σήμερα ο ακριβής τους ρόλος στο μεταβολισμό του αμύλου δεν έχει γίνει ακόμα γνωστός, καθώς λίγα είναι αποδεδειγμένα για το μηχανισμό ρύθμισης της PSP και τον ακριβή ρόλο που κατέχει η L78 στη ρύθμιση της δράσης του ενζύμου.

Στην προσπάθεια για συλλογή δεδομένων που ενδεχομένως να αποτελέσουν κομμάτι αυτής της αναζήτησης για το ρόλο της L-PSP στο μεταβολισμό του αμύλου, έλαβε μέρος και η παρούσα εργασία. Ακολουθώντας το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Kamogawa και Fukui, απομονώθηκε επιτυχώς η L-PSP σε υψηλή καθαρότητα, όπως φαίνεται στα τελικά κλάσματα στην Εικόνα 20. Η απομονωμένη L-PSP, στη συνέχεια, έλαβε μέρος σε κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα με απώτερο σκοπό το χαρακτηρισμό της δομής του ενζύμου και τον εντοπισμό των πιθανών κέντρων πρόσδεσής του. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ανασταλτική επίδραση της ένωσης KS461, καταλοίπου γλυκόζης, στην αντιστρεπτή αντίδραση της PSP.

Αρχικά, χρησιμοποιώντας βέλτιστες συνθήκες ($T = 30^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6$) προσδιορίστηκε η K_m της L-PSP έναντι της G1P στα $1,99 \pm 0,18 \text{ mM}$. Το ένζυμο ακολουθεί κινητική Michaelis – Menten. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η σταθερά αναστολής (K_i) για τον αναστολέα KS461 στα $128.67 \pm 11.07 \text{ }\mu\text{M}$. Παρατηρήθηκε ότι ο αναστολέας KS461 παρουσιάζει συναγωνιστική αναστολή ως προς την PSP, καθώς η ταχύτητα αντίδρασης κατά τη παρουσία του μειώνεται. Σε προηγούμενες μελέτες έχει προσδιοριστεί η K_i του αναστολέα KS461 έναντι της rmGPb σε $0.41 \mu\text{M}$ (Kyriakis et al., 2018). Συγκρίνοντας τις δύο τιμές K_i , παρατηρούμε ότι εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση. Η K_i έναντι της PSP είναι περίπου 300 φορές μεγαλύτερη από την K_i έναντι της rmGPb. Η τιμή αυτή για τη σταθερά αναστολής K_i υποδηλώνει ότι ο αναστολέας εμφανίζει μικρότερη συγγένεια για την PSP. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι η αμινοξική περιοχή με την οποία αλληλεπιδρά ο αναστολέας KS461 στην rmGPb δεν είναι συντηρημένη στη PSP. Μελλοντικές κρυσταλλογραφικές μελέτες θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην εύρεση του τρόπου αλληλεπίδρασης του KS461 με την L-PSP.

Βιβλιογραφία

- Alting, A. C., Pouvreau, L., Giuseppin, M. L. F., & van Nieuwenhuijzen, N. H. (2011). Potato proteins. *Handbook of Food Proteins*, 316-334. doi:10.1533/9780857093639.316
- Avaro, Michael Ronoubigouwa Ambouroue; Tong, Ly; Yoshida, Tomohiko (2009). A Simple and Low-Cost Method to Classify Amylose Content of Rice Using a Standard Color Chart. *Plant Production Science*, 12(1), 97–99. doi:10.1626/pps.12.97
- Ball, David W., Hill, John W. and Scott, Rhonda J. (2012). *Introduction to Chemistry: General, Organic, and Biological v. 1.0*, Chapter 16 Carbohydrates
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2012). *Biochemistry*. 7th ed: New York: W.H. Freeman.
- Brust, H., Orzechowski, S., & Fettke, J. (2020). Starch and Glycogen Analyses: Methods and Techniques. *Biomolecules*, 10(7), 1020. doi:10.3390/biom10071020
- Burrell, M. M. (2003). Starch: the need for improved quality or quantity--an overview. *J Exp Bot*, 54(382), 451-456. DOI: 10.1093/jxb/erg049
- Camirand, A., St-Pierre, B., Marineau, C., & Brisson, N. (1990). Occurrence of a copia-like transposable element in one of the introns of the potato starch phosphorylase gene. *MGG Molecular & General Genetics*, 224(1). doi:10.1007/bf00259448
- Chang Raymond (2005). *Physical Chemistry for the Biosciences*. ISBN 1-891389-33-5
- Clark John M. Jr, S. R. L. (2005). *Πειραματική Βιοχημεία: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., & Henrissat, B. (2003). An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 328(2), 307–317. doi:10.1016/s0022-2836(03)00307-3
- Dauvillee, D., Chochois, V., Steup, M., Haebel, S., Eckermann, N., Ritte, G., . . . Ball, S. G. (2006). Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 48(2), 274-285. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02870.x
- Emblem, A., & Hardwidge, M. (2012). Adhesives for packaging. *Packaging Technology*, 381–394. doi:10.1533/9780857095701.2.381
- Fettke, J.; Hejazi, M.; Smirnova, J.; Hochel, E.; Stage, M.; Steup, M. (2009). Eukaryotic starch degradation: integration of plastidial and cytosolic pathways. *Journal of Experimental Botany*, 60(10), 2907–2922. doi:10.1093/jxb/erp054

Gerbrandy, S. J., & Doorgeest, A. (1972). Potato phosphorylase isoenzymes. *Phytochemistry*, 11(8), 2403–2407. doi:10.1016/s0031-9422(00)88506-4

Goren, A., Ashlock, D., & Tetlow, I. J. (2018). Starch formation inside plastids of higher plants. *Protoplasma*. doi:10.1007/s00709-018-1259-4

Hage, D. S. (2013). LIQUID CHROMATOGRAPHY | Affinity Chromatography. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.00283-3

Hanes, C. S. (1940). The Reversible Formation of Starch from Glucose-1-Phosphate Catalysed by Potato Phosphorylase. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 129(855), 174–208. doi:10.1098/rspb.1940.0035

Healthcare, G. (2010a). Ion Exchange Chromatography - Principles and Method.

Jenkins P.J.; Donald A.M. (1995). The influence of amylose on starch granule structure. , 17(6), 0–321. doi:10.1016/0141-8130(96)81838-1

Johnson, K. A., & Goody, R. S. (2011). The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264–8269. doi:10.1021/bi201284u

Kamogawa, A., Fukui, T., & Nikuni, Z. (1968). Potato alpha-glucan phosphorylase: crystallization, amino acid composition and enzymatic reaction in the absence of added primer. *J Biochem*, 63(3), 361–369.

Kensal E. van Holde, W. C. J., P. Shing Ho (2006). *Principles of physical biochemistry* (2nd ed.): Pearson Prentice Hall

Kun, Sándor; Begum, Jaida; Kyriakis, Efthimios; Stamati, Evgenia C.V.; Barkas, Thomas A.; Szennyes, Eszter; Bokor, Éva; Szabó, Katalin E.; Stravodimos, George A.; Sipos, Ádám; Docsa, Tibor; Gergely, Pál; Moffatt, Colin; Patraskaki, Myrto S.; Kokolaki, Maria C.; Gkerdi, Alkistis; Skamnaki, Vassiliki T.; Leonidas, Demetres D.; Somsák, László; Hayes, Joseph M. (2018). A multidisciplinary study of 3-(β-D-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazole derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors: Computation, synthesis, crystallography and kinetics reveal new potent inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, (), S022352341830117X–. doi:10.1016/j.ejmech.2018.01.095

Lin, Y.-C., Chen, H.-M., Chou, I.-M., Chen, A.-N., Chen, C.-P., Young, G.-H., ... Juang, R.-H. (2012). Plastidial Starch Phosphorylase in Sweet Potato Roots Is Proteolytically Modified by Protein-Protein Interaction with the 20S Proteasome. *PLoS ONE*, 7(4), e35336. doi: 10.1371/journal.pone.0035336

Masoodi, K. Z., Lone, S. M., & Rasool, R. S. (2021). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology*, 13–20. doi:10.1016/b978-0-12-824449-4.00003-7

- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2003). CHROMATOGRAPHY | High-performance Liquid Chromatography. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 1274–1280. doi:10.1016/b0-12-227055-x/00232-7
- Mori, H., Tanizawa, K., & Fukui, T. (1993). A chimeric alpha-glucan phosphorylase of plant type L and H isozymes. Functional role of 78-residue insertion in type L isozyme. J Biol Chem, 268(8), 5574-5581.
- Nakano, K. & Fukui, T. (1986). The complete amino acid sequence of potato alpha-glucan phosphorylase. Journal of Biological Chemistry, 261(18), 8230–8236. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)83900-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)83900-5)
- Nidetzky, B., Griebler, R. . B., Müller-Fembeck, S., D'Auria, F., & La Cara, N. V. (1998). Stability and stabilization of α -1,4-D-glucan phosphorylases. In Progress in Biotechnology -Stability and Stabilization of Biocatalysts (pp. 83-88). Elsevier B.V..
- Palm, D., Klein, H. W., Schinzel, R., Buehner, M., & Helmreich, E. J. M. (1990). The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis. Biochemistry, 29(5), 1099–1107. doi:10.1021/bi00457a001
- Pilling, E. (2003). Growth Ring Formation in the Starch Granules of Potato Tubers. PLANT PHYSIOLOGY, 132(1), 365–371. doi:10.1104/pp.102.018044
- Pontis, H. G. (2017). Protein and Carbohydrate Separation and Purification. Methods for Analysis of Carbohydrate Metabolism in Photosynthetic Organisms, 45–63. doi:10.1016/b978-0-12-803396-8.00003-x
- Przybycien, T. M., Pujar, N. S., & Steele, L. M. (2004). Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. Current Opinion in Biotechnology, 15(5), 469–478. doi:10.1016/j.copbio.2004.08.008
- Rathore, R. S., Garg, N., Garg, S., & Kumar, A. (2009). Starch phosphorylase: role in starch metabolism and biotechnological applications. Crit Rev Biotechnol, 29(3), 214–224. doi:10.1080/07388550902926063
- Rodriguez, E. L., Poddar, S., Iftekhar, S., Suh, K., Woolfork, A. G., Ovbude, S., ... Hage, D. S. (2020). Affinity Chromatography: A Review of Trends and Developments over the Past 50 Years. Journal of Chromatography B, 122332. Doi : 10.1016/j.jchromb.2020.122332
- Schneider, E. M., Becker, J.-U., & Volkmann, D. (1981). Biochemical properties of potato phosphorylase change with its intracellular localization as revealed by immunological methods. Planta, 151(2), 124–134. doi:10.1007/bf00387813
- Shin, H.-J., Shin, Y., & Lee, D.-S. (2000). Formation of α -D-glucose-1-phosphate by thermophilic α -1,4-D-glucan phosphorylase. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 24(2), 89–93. doi: 10.1038/sj.jim.2900757

Sonnewald, U., Basner, A., Greve, B., & Steup, M. (1995). A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Molecular Biology*, 27(3), 567–576. doi:10.1007/bf00019322

Staines, E. S. L. (1998). GraFit version 4.06.

Takahashi E, Wada T, Konai Y. (1996). Process for producing trehalose. US Patent 5,565,341.

Tetlow, I. J., Morell, M. K., & Emes, M. J. (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot*, 55(406), 2131-2145. doi:10.1093/jxb/erh248

Walsh, R. (2012). Alternative Perspectives of Enzyme Kinetic Modeling. *Medicinal Chemistry and Drug Design*. doi:10.5772/36973

Willfahrt, A., Steiner, E., Hötzel, J., & Crispin, X. (2019). Printable acid-modified corn starch as non-toxic, disposable hydrogel-polymer electrolyte in supercapacitors. *Applied Physics A*, 125(7). doi:10.1007/s00339-019-2767-6