



**«ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ»**

**«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών**

**του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας»**

**« ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ »**

**ΜΠΑΤΡΑ ΓΕΩΡΓΙΑ**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΑΠΟ**

**SOLANUM TUBEROSUM (ΠΑΤΑΤΑ)**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

**Μεταπτυχιακή Εργασία**

**Απομόνωση και Δομική Μελέτη της Φωσφορυλάσης από  
*Solanum tuberosum* (πατάτα)**

Η παρούσα διπλωματική εργασία, εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.,

Τριμελής Επιτροπή

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.,

**Κοντού Μαρία**, Λέκτορας Κλινικής Χημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.,

**Ψαρρά Μαρία**, Λέκτορας Βιοχημείας, Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Π.Θ.

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου, στην τριμελή επιτροπή, κ.Λεωνίδα Δημήτριο, κα. Κοντού Μαρία καθώς επίσης και στην κα Ψαρρά Άννα Μαρία, για τις υποδείξεις τους στον τρόπο εργασίας, αλλά και την υποστήριξη που μου παρείχαν σε οτιδήποτε χρειαζόμουν.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν εξ αρχής, η κα Μ. Κοντού και ο κ. Δ. Λεωνίδας και με συμπεριέλαβαν στην επιστημονική τους ομάδα.

Η διάθεση της κας Μ. Κοντού για εκπαίδευσή μου, η βοήθειά της σε τομείς άγνωστους για εμένα, καθώς επίσης και η υπομονή της, ήταν παράγοντες ανεκτίμητης αξίας για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον κ. Ιωάννη Κανάκη επιστημονικό συνεργάτη, για τις συμβουλές του, τις υποδείξεις του και την άριστη προσωπική συνεργασία που υπήρξε, καθ όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι εμπειρίες και οι γνώσεις που απέκομισα από το ΠΜΣ, ήταν ανάλογες των προσδοκιών μου και σε αυτό συνέλαβαν σημαντικά και οι διδάσκοντες του ΠΜΣ, ως εκ τούτου, θα ήθελα να τους εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες.

Θα ήθελα να υπογραμμίσω, την άριστη συνεργασία με τους συμφοιτητές μου στο ΠΜΣ και τους συναδέλφους μου, στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας. Να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τη Μύρτζιου Ιωάννα, Καρούλια Ζωή, Σιούτα Χριστίνα, Σαββίδου Μάρθα, για τη βοήθεια που μου παρείχαν, κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης του πειράματος.

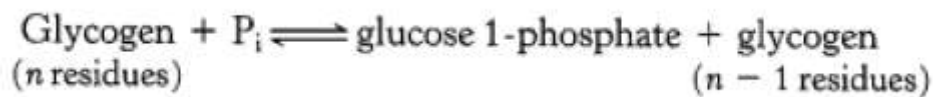
Τέλος, θα ήθελα να τονίσω, ότι δε θα είχα επιτύχει την ολοκλήρωση του στόχου μου, χωρίς τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και την κατανόηση του συζύγου μου και των δύο παιδιών μου. Αισθάνομαι επίσης, απεριόριστη ευγνωμοσύνη για τους γονείς μου, που προσέφεραν φροντίδα στα παιδιά μου και κυριολεκτικά με αντικατέστησαν με επιτυχία, για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

## Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	7
1. Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ .....	8
1.1 Ο ρόλος τη φωσφορυλάσης.....	8
1.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης.....	10
1.3 Ο ρόλος του ενζύμου αποδιακλάδωσης .....	12
2. ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ .....	13
2.1 Γενικά.....	13
2.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις.....	16
2.3 Κρυσταλλική δομή της GP.....	18
2.4 Κέντρα σύνδεσης της GP .....	21
2.5 Μηχανισμός κατάλυσης.....	24
3. Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ SOLANUM TUBEROSUM (ΠΑΤΑΤΑ).....	26
3.1 Πρωτοταγής δομή της φωσφορυλάσης της πατάτας και σύγκριση με τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού .....	26
3.2 Κινητικός Μηχανισμός της φωσφορυλάσης της Πατάτας .....	30
4. Η ΕΞΙΣΩΣΗ MICHAELIS-MENTEN .....	31
4.1 Το σχήμα της αντίδρασης.....	31
4.2 Εξίσωση Michaelis-Menten.....	31
4.3 Σημαντικά συμπεράσματα από την κινητική Michaelis- Menten.....	33
4.4 Διάγραμμα Lineweaver-Burke .....	35
5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ .....	36
6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	39
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	40
7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ.....	41
8. ΜΕΘΟΔΟΙ .....	44
8.1 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου (SDS-PAGE).....	45
8.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford .....	47
8.3 Προσδιορισμός $K_m$ · $V_{max}$ .....	48
8.4 Προσδιορισμός φωσφόρου – Μέθοδος ασκορβικού οξέος .....	49
9. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ (ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ $K_m$ - $V_{max}$ ).....	51
9.1 Παρασκευή διαλυμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις G1P .....	51
9.2 Εκτέλεση Πειράματος .....	52
10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	53
10.1 Απομόνωση της φωσφορυλάσης της πατάτας .....	53
10.2 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων φωσφορυλάσης της πατάτας .....	63
10.3 Κινητική δοκιμή του ενζύμου με AMP .....	68
11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	77

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης, μελετήθηκε διεξοδικά στα θηλαστικά και αποδείχθηκε, πως το γλυκογόνο διασπάται σταδιακά από τα ορθοφωσφορικά ιόντα ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), προς τον σχηματισμό, ενός νέου φωσφορυλιωμένου σακχάρου, που πλεονεκτεί ενεργειακά με βάση την παρακάτω αντίδραση. Το νέο αυτό σάκχαρο, ταυτοποιήθηκε ως η 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P ή G1P). Το ένζυμο που καταλύει την παρακάτω αντίδραση, είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου.



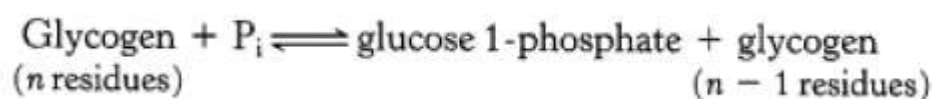
Ένα ομόλογο ένζυμο της μυϊκής φωσφορυλάσης του κουνελιού, υπάρχει στο φυτό *Solanum tuberosum* (πατάτα), όπου αντί για γλυκογόνο διασπά άμυλο. Η φωσφορυλάση της πατάτας, αποτελεί ένα ένζυμο, που αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον για να μελετηθεί, τόσο βιοχημικά όσο και δομικά, λόγω του γεγονότος ότι δεν παρουσιάζει αλλοστερική ρύθμιση, καθώς και επειδή περιέχει μια επιπλέον επικράτεια, σε σχέση με τη μυϊκή φωσφορυλάση. Είναι σημαντικό να διαπιστωθεί, ποιός ο ρόλος της επικράτειας, μιας και εκεί εντοπίζεται πιθανώς, η αιτία της διαφορετικής συμπεριφοράς της φωσφορυλάσης της πατάτας, σε σχέση με τη μυϊκή του κουνελιού.

Σε μια προσπάθεια να μελετήσουμε τη φωσφορυλάση της πατάτας, έπειτα από πολλές δοκιμές, καταλήξαμε σε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης, από το οποίο οδηγηθήκαμε στο μερικό καθαρισμό του ενζύμου. Στη συνέχεια, ακολούθησε ένας πρώτος βιοχημικός χαρακτηρισμός του ενζύμου (προσδιορισμός  $K_m$  και  $V_{max}$ ). Η μελέτη αυτή έδειξε, ότι το ένζυμό μας ακολουθεί την κινητική Michaelis Menten, πράγμα που πιστοποιεί, ότι το ένζυμο της φωσφορυλάσης της πατάτας δεν παρουσιάζει αλλοστερική ρύθμιση. Η τιμή  $K_m$  που προσδιορίστηκε, δείχνει ότι το ένζυμο της φωσφορυλάσης της πατάτας, παρουσιάζει υψηλή συγγένεια με το υπόστρωμά του και ότι το ένζυμο που απομονώθηκε, είναι αρκετά δραστικό. Τέλος,

σε αντίθεση με τη μυική φωσφορυλάση του κουνελιού, η διαπίστωση που κάναμε έπειτα από την κινητική μελέτη, είναι ότι το ένζυμό μας, είναι ενεργό είτε παρουσία, είτε απουσία του AMP.

**ABSTRACT**

The metabolic pathway of glycogenolysis, has been studied in detail for mammals and it has been shown that, glycogen is catabolized by removal of a glucose monomer through cleavage, with inorganic phosphate ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) to produce glucose-1-phosphate (Glc-1-P or G1P) as shown below. The enzyme that catabolizes this reaction, is glycogen phosphorylase.



One homolog enzyme of the rabbit muscle glycogen phosphorylase, which uses starch instead of glycogen, was found in the plant *Solanum tuberosum* (potato). This enzyme is interesting to be studied biochemically and structurally because of the extra region it possesses, compared to the rabbit muscle glycogen phosphorylase, and it may be an important factor that regulates the different activity as opposed to the rabbit muscle glycogen phosphorylase.

After a long procedure of isolation methods standardization, we achieved partial isolation, followed by partial characterisation of the enzyme ( $K_m$  and  $V_{max}$ ). The enzyme, follows the Michaelis-Menten equation and thus is not allosterically regulated.  $K_m$  values suggest, that the enzyme we isolated is active, and it has high affinity to the substrate. In contrast with, the rabbit muscle glycogen phosphorylase, the potato phosphorylase is active, in the presence as well as in the absence of AMP.

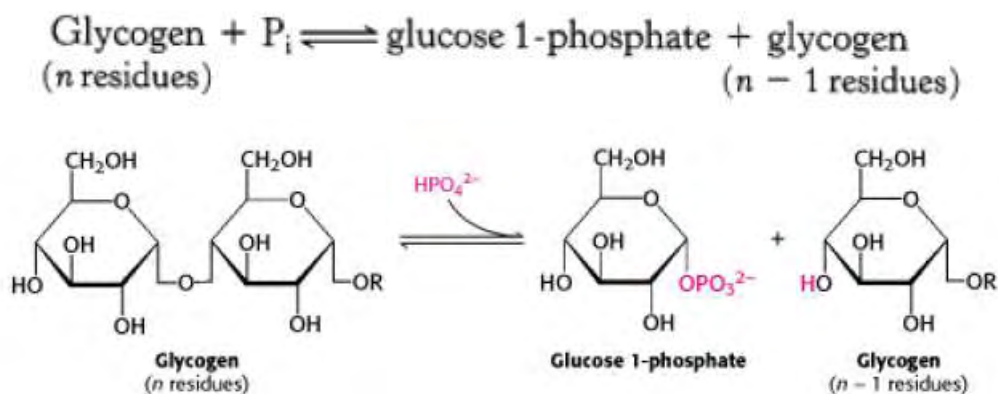


## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ

### 1.1 Ο ρόλος τη φωσφορυλάσης

Η μεταβολική οδός της γλυκογονόλυσης μελετήθηκε διεξοδικά, από τους Carl & Gerty Cori γύρω στο 1936, οι οποίοι απέδειξαν πως το γλυκογόνο διασπάται σταδιακά από τα ορθοφωσφορικά ιόντα ( $\text{H}_2\text{PO}_4^+$ ), προς τον σχηματισμό ενός νέου φωσφορυλιωμένου σακχάρου που πλεονεκτεί ενεργειακά με βάση την παρακάτω αντίδραση. Το νέο αυτό σάκχαρο, ταυτοποιήθηκε ως η 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P ή G1P).



Σχήμα 1: Αποικοδόμηση του γλυκογόνου [Stryer, 1997]

Το ζεύγος Cori στη συνέχεια, απομόνωσε το ένζυμο φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP), το οποίο είναι ένα πάρα πολύ σημαντικό ένζυμο στη διαδικασία της διάσπασης του γλυκογόνου. [Cori & Cori, 1936].

Η GP, καταλύει την συνεχή διάσπαση και απομάκρυνση μορίων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα ενός μορίου γλυκογόνου, μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Ο γλυκοζιτικός δεσμός, μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου, διασπάται από το ορθοφωσφορικό. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ

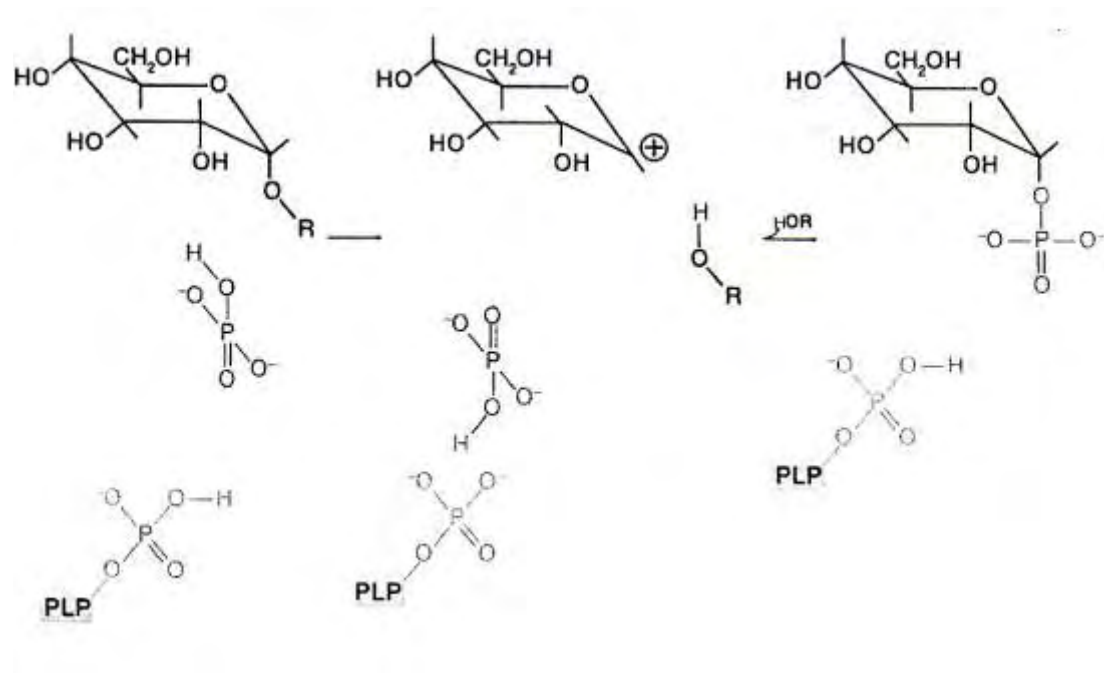
του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου, διασπάται από το ορθοφωσφορικό και η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα διατηρείται [Stryer, 1997].

Η αντίδραση καταλύεται από τη GP και είναι αντιστρεπτή *in vitro*. Σε pH 6.8, ο λόγος της ισορροπίας του ορθοφωσφορικού προς την 1-φωσφορική γλυκόζη, είναι 3,6. Η  $\Delta G^\circ$  της αντίδρασης είναι μικρή, γιατί ένας γλυκοζιτικός δεσμός αντικαθίσταται από έναν δεσμό φωσφορικού εστέρα, ο οποίος έχει περίπου το ίδιο δυναμικό μεταφοράς. Ωστόσο, η φωσφορόλυση προχωρεί κυρίως προς την κατεύθυνση της αποικοδόμησης του γλυκογόνου *in vivo*, επειδή ο λόγος  $[Pi]/[1\text{-φωσφορική γλυκόζη}]$  είναι συνήθως μεγαλύτερος του 100. Επίσης, οι ορμόνες που οδηγούν σε αύξηση της δραστηριότητας της GP, πάντα προκαλούν αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Τέλος, οι ασθενείς που έχουν παντελή έλλειψη φωσφορυλάσης των μυών είναι σε θέση να συνθέτουν γλυκογόνο στους μυς [Stryer, 1997].

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, μια υδρολυτική διάσπαση, θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός ATP, για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών, είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη, ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη [Stryer, 1997].

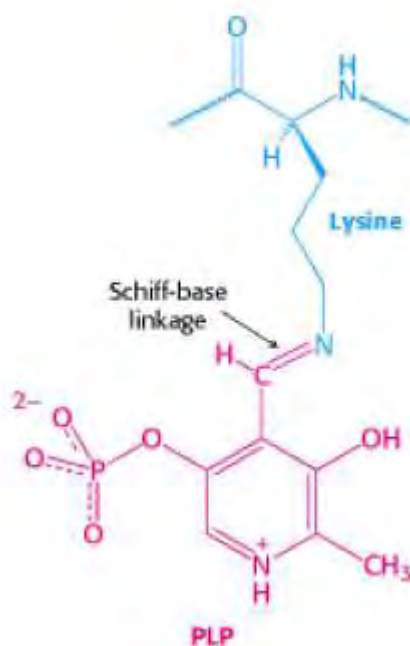
## 1.2 Ο ρόλος της φωσφορικής πυριδοξάλης

Τόσο το υπόστρωμα του γλυκογόνου όσο και το προϊόν, η 1-φωσφορική γλυκόζη, έχουν διαμόρφωση α στον C-1. Αυτή η διατήρηση της διαμόρφωσης, είναι ένα πολύτιμο στοιχείο για τον καταλυτικό μηχανισμό της GP. Μια απευθείας προσβολή του φωσφορικού οξέος, στον C-1 ενός σακχάρου, θα αναστρέψει τη διαμόρφωση αυτού του άνθρακα. Το γεγονός ότι, η σχηματιζόμενη 1-φωσφορική γλυκόζη έχει διαμόρφωση α αντί για β, δείχνει ότι απαιτείται ένας άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο). Το πιθανότερο ενδεχόμενο, είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατίον, όπως και στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων, που καταλύεται από την λυσοζύμη [Stryer, 1997].



Σχήμα 2: Προτεινόμενος μηχανισμός φωσφορυλίωσης του γλυκογόνου από την GP. Η ένδειξη PLP αφορά τη φωσφορική πυριδοξάλη συνδεδεμένη με μία βάση του Schiff στην  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> της λυσίνης 680 του καταλυτικού κέντρου. Τα προϊόντα είναι η 1-φωσφορική α-D-γλυκόζη και η HOR, η αλυσίδα του γλυκογόνου με ένα κατάλοιπο λιγότερο [Stryer, 1997].

Μια δεύτερη ένδειξη για την κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού της GP, είναι η απαίτηση για την ύπαρξη της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP), ενός παραγώγου της πυριδοξίνης (βιταμίνη B<sub>6</sub>). Η αλδεϋδική ομάδα αυτού του συνενζύμου, σχηματίζει μια βάση Schiff με μια πλευρική αλυσίδα, συγκεκριμένης λυσίνης του ενζύμου. Περιθλασιγράμματα ακτίνων X και μελέτες με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό, έδειξαν ότι η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα, βρίσκεται μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP και του υποστρώματος του γλυκογόνου. Η 5'-φωσφορική ομάδα, δρα σε συνδυασμό με το ορθοφωσφορικό, πιθανότατα χρησιμεύοντας ως δότης και δέκτης πρωτονίων. Το ορθοφωσφορικό, δίνει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο (O-4) της αποχωρούσας αλυσίδας γλυκογόνου και συγχρόνως, αποκτά ένα πρωτόνιο από την PLP. Το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που σχηματίζεται, προσβάλλεται από το ορθοφωσφορικό ανιόν, σχηματίζοντας την α-1-φωσφορική γλυκόζη. Η μεγαλύτερη πρόκληση που αντιμετωπίζει η GP, είναι να διασπάσει φωσφορολυτικά το γλυκογόνο, παρά υδrolυτικά, με κέρδος έναν ~ P. Αυτό, απαιτεί παντελή αποκλεισμό του νερού από το ενεργό κέντρο, κάτι που δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της PLP, ως γενικού οξεοβασικού καταλύτη [Stryer, 1997]

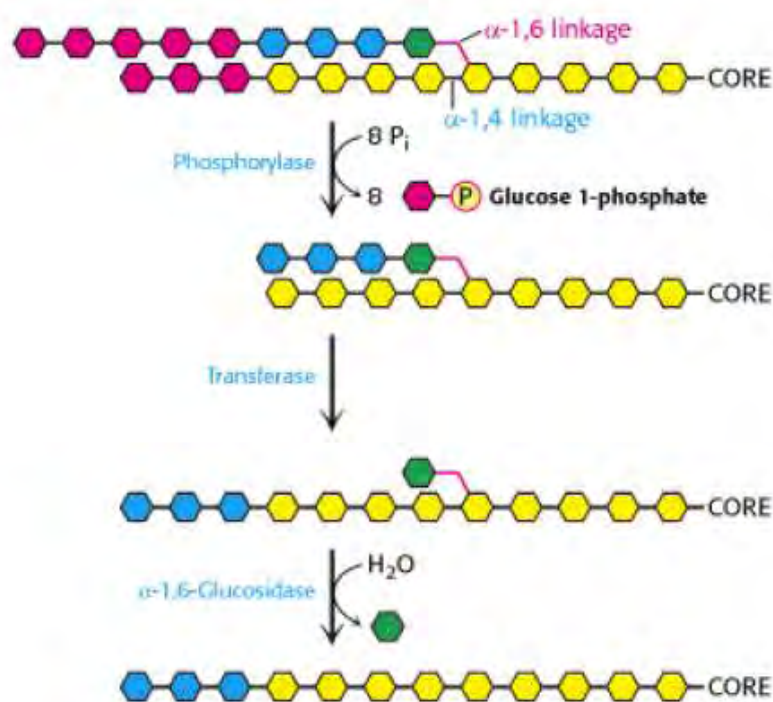


*Σχήμα 3: Η φωσφορική πυριδοξάλη (κόκκινο) σχηματίζει μία βάση Schiff με ένα κατάλοιπο λυσίνης (μπλε) στο ενεργό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου [Stryer, 1997].*

### 1.3 Ο ρόλος του ενζύμου αποδιακλάδωσης

Το γλυκογόνο, αποικοδομείται ως έναν ορισμένο βαθμό από τη GP και μόνο. Παρόλα αυτά, οι γλυκοζιτικοί δεσμοί  $\alpha$ -1,6 στα σημεία διακλάδωσης δεν διασπώνται από την GP. Πράγματι, η GP σταματά την διάσπαση δεσμών  $\alpha$ -1,4 όταν φτάσει σε απόσταση τεσσάρων καταλοίπων από το σημείο της διακλάδωσης. Η δράση της GP φαίνεται στο σχήμα 4. Το ένζυμο αυτό, υδρολύει τον γλυκοζιτικό δεσμό  $\alpha$ -1,6 μεταξύ των z και h [Stryer, 1997].

Η μεταφοράση (transferase) και το ένζυμο αποδιακλάδωσης (γλυκοζιτάση  $\alpha$ -1,6) ( $\alpha$ -1,6-Glucosidase), μετατρέπουν τη διακλαδωμένη δομή σε γραμμική, γεγονός που ανοίγει τον δρόμο, για περαιτέρω διάσπαση από τη GP. Ένα πολύ ενδιαφέρον σημείο, αποτελεί το γεγονός ότι η μεταφοράση και η  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτάση, αποτελούν μέρη του ίδιου ενζύμου [Stryer, 1997].



Σχήμα 4: Βήματα αποικοδόμησης του γλυκογόνου [Stryer, 1997]

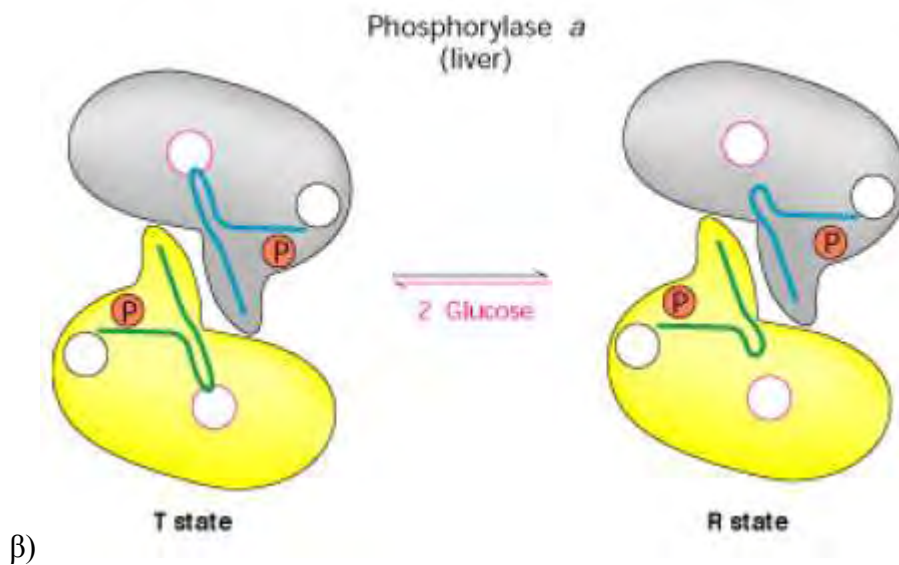
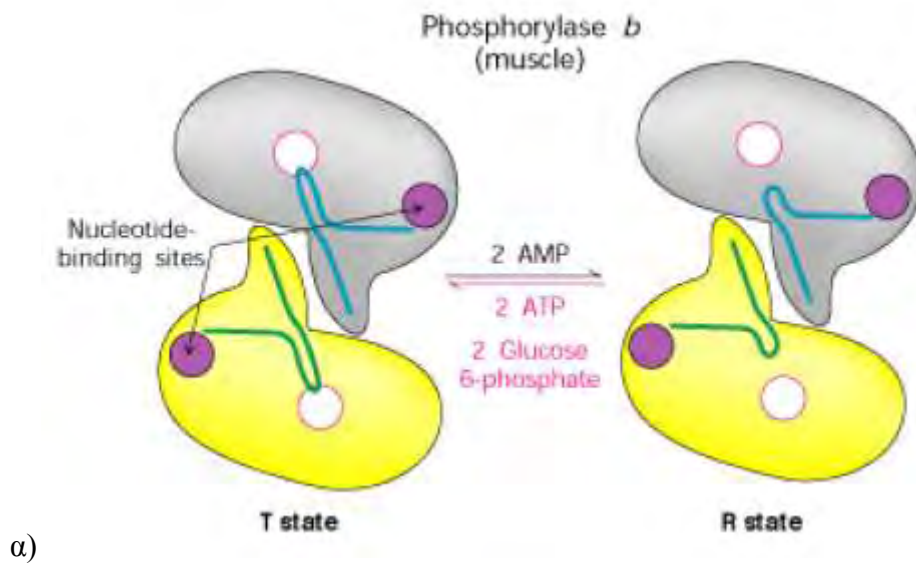
## 2. ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ

### 2.1 Γενικά

Η GP (απουσία τροποποιητών) είναι ένα διμερές, αποτελούμενο από δυο ταυτόσημες υπομονάδες, μοριακού βάρους 97kD (842 αμινοξέα) και από το συνένζυμο PLP, παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B<sub>6</sub>), που βρίσκεται συνδεδεμένο στη λυσίνη (Lys) 680 σε κάθε υπομονάδα. Στους σκελετικούς μύες, η GP βρίσκεται σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις, ώστε να υπάρχει περισσότερη PLP συνδεδεμένη με την GP, απ' ό,τι σε όλα τα ένζυμα μαζί, που εξαρτώνται από την βιταμίνη B<sub>6</sub>. Με βάση διάφορα πειράματα που έγιναν στο παρελθόν, αποδείχτηκε το γεγονός ότι, η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας της PLP, είναι απαραίτητη, για την δραστικότητα του ενζύμου [Oikonomakos *et al.*, 1992].

Στον μυ σε κατάσταση ηρεμίας, η GP βρίσκεται στην ανενεργή μορφή b, αλλά μπορεί να ενεργοποιηθεί από την συνεργιστική σύνδεση του AMP και κάποιων αναλόγων του (όπως το IMP) και να ανασταλεί από το ATP, το ADP, την α-D-6-φωσφορική γλυκόζη (G6P), την UDP-Glc, από πουρίνες όπως η καφεΐνη και από την D-γλυκόζη. Υψηλές συγκεντρώσεις ανιόντων, καθώς και συγκεκριμένοι οργανικοί διαλύτες, μπορούν *in vitro*, να προκαλέσουν ενεργοποίηση του ενζύμου. Παρόμοια δράση ασκούν, η πρωταμίνη, η σπερμίνη και άλλες πολυαμίνες, τα φθοροανιόντα, καθώς και τα δισθενή κατιόντα Ca<sup>2+</sup> και Mg<sup>2+</sup> [Oikonomakos *et al.*, 1992].

Η μετατροπή της GPb σε GPα έχει σαν αποτέλεσμα, την δημιουργία ενός ενζύμου, που είναι ενεργό απουσία AMP. Η GPα, επιδεικνύει μεγαλύτερη συγγένεια για το AMP, συγκριτικά με την GPb (100 φορές μεγαλύτερη), αλλά μικρότερη συγγένεια, για τα ATP, ADP και την G6P [Johnson *et al.*, 1989].



Σχήμα 5: Αναπαράσταση του ελέγχου της δραστηριότητας α) της GPb στους μυς (*muscle*) και β) της GPa στο ήπαρ (*liver*). Στους μυς, η δραστηριότητα της GP ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό αλλοστερικά, από το ενεργειακό φορτίο (AMP, ATP) αλλά και από την 6-φωσφορική γλυκόζη (*glucose 6-phosphate*). Αντίθετα στο ήπαρ, που βρίσκεται κυρίως υπό μορφή GPa, η γλυκόζη είναι αυτή που ρυθμίζει τη δραστηριότητα. [Stryer,1997]



Στα θηλαστικά, τα κυριότερα ισοένζυμα της GP προέρχονται, από τους μύες, το ήπαρ και τον εγκέφαλο, ανάλογα με τον ιστό στον οποίο αυτά, κατά προτίμηση εκφράζονται. Το cDNA, στο οποίο κωδικοποιείται ολόκληρη η αμινοξική ακολουθία της GP, που προέρχεται από τις παραπάνω πηγές, έχει κλωνοποιηθεί και ταυτοποιηθεί σε αρκετά είδη. Μεταξύ της GP που προέρχεται από τον άνθρωπο και της GP που προέρχεται από τα κουνέλια, παρατηρείται 97% ομολογία, ωστόσο όσον αφορά τα τρία ισοένζυμα που προέρχονται από τον άνθρωπο η ομολογία πλησιάζει το 80%. Η μυϊκή και η ηπατική GP, εμφανίζουν διαφορετικές ρυθμιστικές ιδιότητες. Ο φυσιολογικός ρόλος της ηπατικής GP, είναι η παροχή ικανής ποσότητας γλυκόζης για τους μη ηπατικούς ιστούς, όπως αυτούς του κεντρικού νευρικού συστήματός, ή η καταστολή της εξερχόμενης από το ήπαρ γλυκόζης, όταν βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα. Ακόμη, ενώ το AMP ενεργοποιεί τη μυϊκή GPb, σε ποσοστό 80% της δραστηριότητας που παρατηρείται με την GPα, η ενεργοποίηση της ηπατικής GPb, ανέρχεται σε ποσοστό μόλις 20% [Johnson, 1992, Henke & Sparks, 2006].



Σχήμα 6: Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Τα δύο μονομερή της GPb. Οι αναστολείς είναι προσδεδεμένοι στα κέντρα του ενζύμου, ενώ υποδεικνύεται και η θέση του βρόχου 280ς.

## 2.2 Αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις

Ο συντονισμός των ενζυμικών μηχανισμών και των αλληλεπιδράσεων που κατευθύνουν τις διάφορες διεργασίες, γίνεται με την βοήθεια ρυθμιστικών ενζύμων, η λειτουργική δομή των οποίων, τους επιτρέπει να προσαρμόζουν την καταλυτική τους δράση, ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Σύμφωνα με τους Monod, Changeux και Wyman, ως αλλοστερικές, χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που διαθέτουν, τουλάχιστον δυο διακριτά κέντρα σύνδεσης, το καταλυτικό και το αλλοστερικό. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο ευθύνεται για την βιολογική δράση της πρωτεΐνης, συνδέεται το υπόστρωμα, ενώ στο αλλοστερικό συνδέεται αντιστρεπτά και με μεγάλη εξειδίκευση, ένας άλλος μεταβολίτης, ο αλλοστερικός τροποποιητής. Ο σχηματισμός του συμπλόκου, ένζυμο-αλλοστερικός τροποποιητής, προκαλεί μια διακριτή αντιστρεπτή μεταβολή της μοριακής δομής της πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται **αλλοστερική μετάπτωση**. Αυτή, τροποποιεί τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου, χωρίς να ενεργοποιεί κάποια αντίδραση, που να εμπλέκει τον ίδιο τον τροποποιητή [Monod *et al.*, 1963].

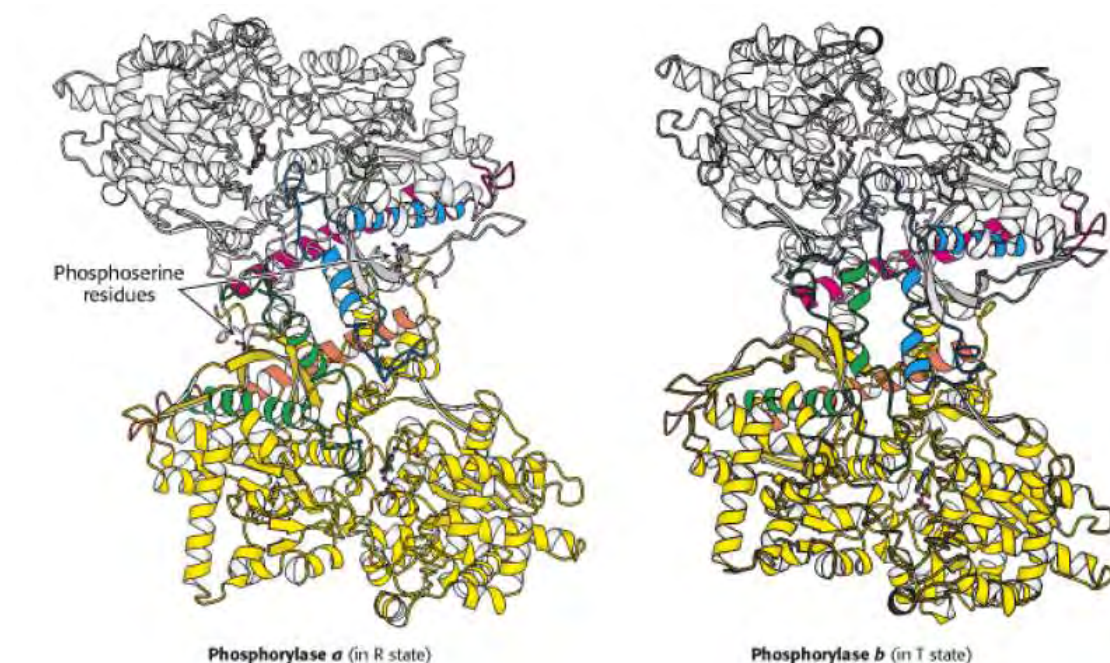
Γενικά, θεωρείται ότι η μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει, οποιαδήποτε αλλοστερική αλληλεπίδραση, απορρέει αποκλειστικά, από τη συγκεκριμένη δομή του ίδιου του μορίου της πρωτεΐνης. Αυτή η δομή, είναι που του επιτρέπει να υποβληθεί σε μια ιδιαίτερη, διακριτή και αντιστρεπτή αλλαγή στη διαμόρφωσή του, που επάγεται από τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή [Monod *et al.*, 1963].

Οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις διακρίνονται, σε ομοτροπικές, μεταξύ ταυτόσημων ενώσεων και ετεροτροπικές, μεταξύ διαφορετικών ενώσεων. Η GP, αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα, αλλοστερικού ενζύμου. Οι αλλοστερικές πρωτεΐνες είναι ολιγομερή, τα μονομερή των οποίων, συνδέονται με τέτοιο τρόπο, ώστε όλα να καταλαμβάνουν ισοδύναμες θέσεις. Δηλαδή, το μόριο να έχει έναν τουλάχιστον άξονα συμμετρίας. Το μονομερές, απαντάται σε δυο τουλάχιστον πρωτεϊνικές διαμορφώσεις, την T μορφή και τη R μορφή, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία, που καθορίζεται από την αλλοστερική σταθερά L. Η συμμετρία στα μονομερή, διατηρείται κατά τη διάρκεια της αλλοστερικής

μετάπτωσης, από τη μια διαμόρφωση στην άλλη, ενώ η συγγένειά τους με συγκεκριμένους υποκαταστάτες, μεταβάλλεται. Η σύνδεση του υποστρώματος, σε οποιοδήποτε μονομερές, δεν επηρεάζει κατά κανένα τρόπο, την σύνδεσή του στα υπόλοιπα μονομερή (δηλαδή οι μικροσκοπικές σταθερές διάστασης, στα σύμπλοκα μεταξύ μονομερών T ή R διαμόρφωσης και υποστρώματος είναι αντίστοιχα ίδιες) [Monod *et al.*, 1965].

Η παρουσία ενός συγκεκριμένου υποκαταστάτη, μετατοπίζει την ισορροπία μεταξύ των δυο διαμορφώσεων, με αποτέλεσμα, την εμφάνιση ομοτροπικών και ετεροτροπικών αλληλεπιδράσεων. Οι θετικές συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις, μεταξύ των υπομονάδων στο ενζυμικό μόριο, ερμηνεύονται με βάση τη μετατόπιση της ισορροπίας, προς την κατεύθυνση της R διαμόρφωσης, η οποία συνδέει κατά προτίμηση το υπόστρωμα [Monod *et al.*, 1965].

Συνέπεια της σύνδεσης αυτής, είναι η αύξηση ή αντίστοιχα η μείωση της αλλοστερικής σταθεράς και η τροποποίηση στη μορφή της γραφικής απεικόνισης, της ενζυμικής ταχύτητας ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, σε περισσότερο ή λιγότερο σιγμοειδή. Η τροποποίηση αυτή, γίνεται ανάλογα με το αν η αλλοστερική μετάπτωση, προκαλείται από αναστολέα ή ενεργοποιητή του ενζύμου. Σημειώνεται, ότι η σιγμοειδής συμπεριφορά, αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλλοστερικών πρωτεϊνών [Monod *et al.*, 1965, Oikonomakos *et al.*, 1977].



Σχήμα 7: Οι δομές της φωσφορυλάσης α και β. Η φωσφορυλάση α, είναι φωσφορυλιωμένη στο κατάλοιπο Ser14 και στις δύο υπομονάδες. Αυτή η τροποποίηση, ευνοεί τη μετάβαση στην περισσότερο ενεργή R διαμόρφωση. Η μία υπομονάδα, φαίνεται με λευκό χρώμα και οι έλικες και οι στροφές που είναι σημαντικές, για τη ρύθμιση φαίνονται με μπλε και κόκκινο. Η άλλη υπομονάδα, φαίνεται με κίτρινο χρώμα, με τις ρυθμιστικές δομές σε πορτοκαλί και πράσινο. Η φωσφορυλάση β, δεν είναι φωσφορυλιωμένη και απαντάται κυρίως στην T διαμόρφωση.

### 2.3 Κρυσταλλική δομή της GP

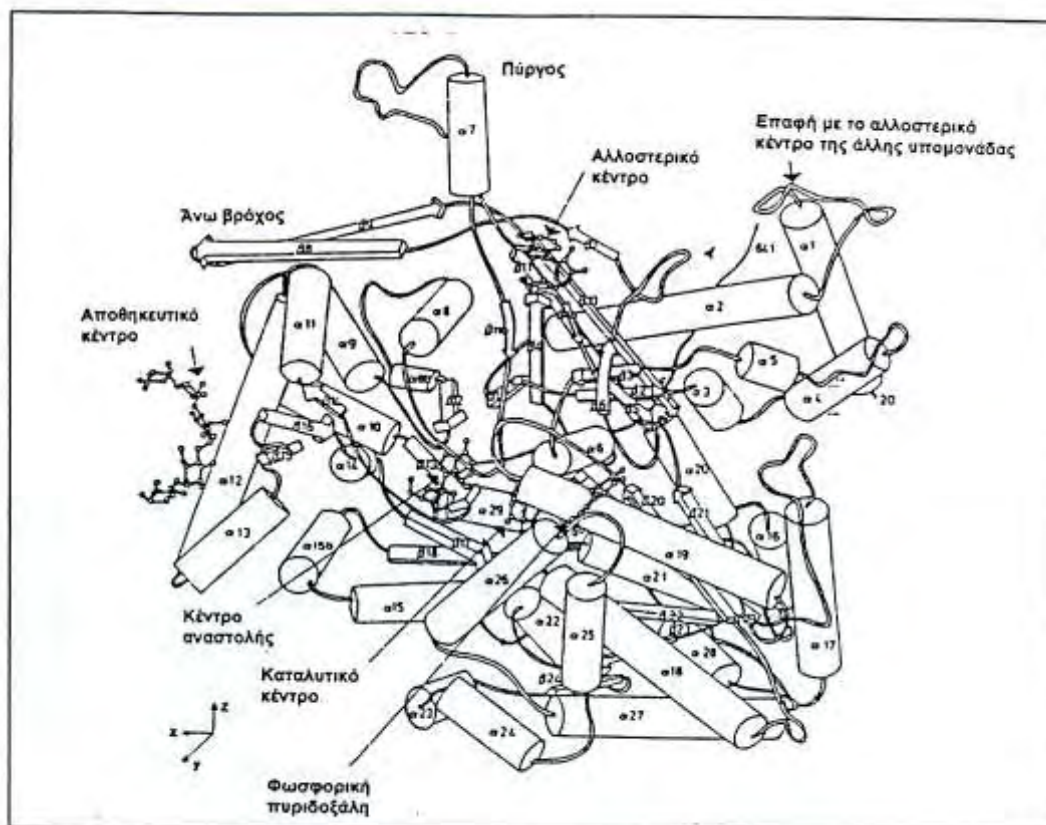
Οι κρυσταλλικές δομές, της GPα και της GPβ (T και R διαμόρφωση), προσδιορίστηκαν γύρω στο 1990, από τους Barford, Johnson κ.α [Barford & Johnson, 1989]. Οι μελέτες αυτές, απέδειξαν πως οι κρύσταλλοι της GP, περιέχουν μεγάλα ποσοστά νερού (γύρω στο 48%), το οποίο είναι εγκλωβισμένο μέσα σε

τρισδιάστατα πλέγματα καναλιών. Κι αυτό συμβαίνει, γιατί η διάταξη των κρυστάλλων των πρωτεϊνικών μορίων, είναι τέτοια, ώστε να δημιουργούνται επιμήκη κανάλια διαμέτρου 20 Å, κατά μήκος του άξονα του κρυστάλλου. Τα κανάλια αυτά, επιτρέπουν σε μικρά μόρια να διαχέονται στον κρύσταλλο και να φτάνουν στα κέντρα σύνδεσής τους [Barford & Johnson, 1989]. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες απέδειξαν επίσης, την ύπαρξη έξι κέντρων σύνδεσης (Σχήμα 8):

- Κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser 14 (P)
- Αλλοστερικό κέντρο (N)
- Καταλυτικό κέντρο (C)
- Αποθηκευτικό κέντρο (κέντρο του γλυκογόνου) (G)
- Νουκλεοζιτικό κέντρο (κέντρο αναστολής) (I)
- Νέο αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης εν δυνάμει φαρμάκων)

Η κάθε υπομονάδα του διμερούς της GP, έχει ελλειψοειδές σχήμα, με διαστάσεις 60x60x55 Å. Η GP, είναι μια α/β πρωτεΐνη και αποτελείται από α-έλικες (52%), β-ελάσματα (20%), δυο έλικες  $3_{10}$  μήκους 6 και 12 αμινοξέων αντίστοιχα και μια π έλικά, μήκους 8 αμινοξέων. Οι έλικες, ποικίλουν σε μήκος από 7 ως 32 αμινοξέα. Υπάρχει μια περιοχή 95 αμινοξέων, (153-247) που αποτελείται μόνο, από β-ελάσματα και μια άλλη 112 αμινοξέων (714-825) που αποτελείται μόνο, από α-έλικες. Η αναδίπλωση των αμινοξέων, γίνεται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το μόριο να παρουσιάζει μια συμπαγή δομή, ακτίνας 30 Å. Υπάρχουν μικρές περιοχές, που προεξέχουν, καθώς και κανάλια που επιτρέπουν, τη διέλευση των διαφόρων υποστρωμάτων και μικρών μορίων και βοηθούν στην επικοινωνία μεταξύ των διαφόρων κέντρων σύνδεσης. Τέτοιες περιοχές, σχηματίζονται από τα αμινοξέα 36-45 και 260-276, γνωστές ως επικάλυμμα (cap) και πύργος (tower) αντίστοιχα, όπως επίσης και ο βρόγχος 280 (αμινοξέα 280-292) και το N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-18) [Oikonomakos *et al.*, 1992].





Σχήμα 8: Σχηματικό διάγραμμα του μονομερούς της GP. Οι α-έλικες και τα β-ελάσματα, απεικονίζονται με κυλίνδρους και τόξα αντίστοιχα. Οι περιοχές της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που αντιστοιχούν στην α1 έλικα, στην περιοχή επικαλύμματος, στην αρχή της α2 έλικας και στην έλικα της περιοχής πύργος, ο βρόγχος 280s και η αρχή της α8 έλικας μαζί με τον βρόγχο που συνδέει τις διαμορφώσεις β7 και β8 είναι καθοριστικής σημασίας για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Το απαραίτητο συνένζυμο PLP, είναι εγκλωβισμένο στο κέντρο της υπομονάδας, συνδεδεμένο με τη Lys680 της α21 έλικας. Το καταλυτικό κέντρο, που φαίνεται στο σχήμα μαζί με την GIP, βρίσκεται κοντά στο συνένζυμο και ο περιβάλλον διαλύτης, έχει πρόσβαση σ' αυτό, μέσω ενός καναλιού μήκους περίπου 15 Å. Το αλλοστερικό κέντρο, που είναι συνδεδεμένο με το AMP, εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων, μεταξύ της α2 και της α8 έλικας. Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, με πέντε μόρια σακχάρου συνδεδεμένα, συνδέεται με την α12 έλικα και είναι στην επιφάνεια του ενζύμου, μακριά από το καταλυτικό και το αλλοστερικό κέντρο. Το κέντρο του νουκλεοζιτικού αναστολέα, βρίσκεται στην είσοδο του καναλιού, του καταλυτικού κέντρου. Οι πουρίνες και τα νουκλεοτίδια, που συνδέονται σε αυτό το

*κέντρο, δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με τη Phe285 από το βρόγχο 280s και με την Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας. Η κατάληψη αυτού του κέντρου, σταθεροποιεί την T διαμόρφωση και αναστέλλει την δράση του ενζύμου.*

Η πολυπεπτιδική αλυσίδα, μπορεί να χωριστεί σε δυο αυτοτελείς περιοχές, την 1 και την 2. Η περιοχή 1, που ονομάζεται και ρυθμιστική, αποτελείται από τα αμινοξέα 10-484. Στην περιοχή αυτή, βρίσκεται το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14, το αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης του AMP, το αποθηκευτικό κέντρο, οι περιοχές πύργος και επικάλυμμα, καθώς και ένα τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η περιοχή 2, που ονομάζεται και καταλυτική, αποτελείται από τα αμινοξέα 485-842. Στην περιοχή αυτή, βρίσκεται το κέντρο αναστολής, η PLP και το υπόλοιπο τμήμα του καταλυτικού κέντρου. Η σύνδεση διαφόρων τροποποιητών και υποστρωμάτων, οδηγεί στην εμφάνιση συνεργιστικής δράσης (θετικής ή αρνητικής), μεταξύ των κέντρων σύνδεσης, όχι μόνο στην ίδια υπομονάδα αλλά και μεταξύ διαφορετικών υπομονάδων [Fletterick & Madsen, 1980].

## 2.4 Κέντρα σύνδεσης της GP

Η GP έχει έξι κέντρα σύνδεσης

### 1. Το κέντρο φωσφορυλίωσης της Ser14

Το κέντρο φωσφορυλίωσης, υπεύθυνο για την ομοιοπολική μετατροπή της GP, από τη μορφή α στη μορφή β, είναι η σερίνη 14, η οποία έχει στρατηγική θέση στην διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Η φωσφορυλίωση της σερίνης αυτής, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιάταξης των τελευταίων 19 αμινοξέων, στο C-τελικό άκρο. Στην GPb, τα αμινοξέα αυτά είναι πολύ ευκίνητα και δεν έχουν καθορισμένη

δομή, ενώ στην GPα, έχουν ορισμένη στερεοδιάταξη και αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα και των δύο υπομονάδων.[Stryer, 1997]

## 2. Το αλλοστερικό κέντρο

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

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

Οι ενώσεις, που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο, είτε ενεργοποιούν (AMP, IMP, GIP, Pi,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), είτε αναστέλλουν (ATP, ADP, G6P, UDP-Glc, NADH, β-γλυκεροφωσφορικό ιόν) τη δράση του ενζύμου. Ο αλλοστερικός ενεργοποιητής AMP, όταν συνδέεται, εντοπίζεται ανάμεσα στις έλικες α2 και α8 και είναι κοντά στη διεπιφάνεια, μεταξύ των υπομονάδων [Oikonomakos *et al.*, 1992].

## 3. Το καταλυτικό κέντρο

Το καταλυτικό κέντρο, ταυτοποιήθηκε κρυσταλλογραφικά από τη σύνδεση των υποστρωμάτων (GIP, Pi) και αναλόγων τους (UDP-Glc). Εμφανίζεται ως μια βαθιά σχισμή μεταξύ των αυτοτελών περιοχών στο κέντρο του μορίου σε απόσταση 15 Å από τη επιφάνεια περίπου. Πολύ κοντά στο καταλυτικό κέντρο βρίσκεται το συνένζυμο PLP. Στην T διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω ενός στενού καναλιού πλάτους 5 Å, αλλά περιορίζεται κυρίως από τον βρόγχο αμινοξικής ακολουθίας 282-285. Κατά την αλλοστερική μετάπτωση  $T \rightarrow R$ , ο βρόγχος 282-285 εκτοπίζεται επιτρέποντας τη δίοδο του υποστρώματος, ενώ η αντικατάσταση της όξινης πλευρικής αλυσίδας του Asp283 από την βασική πλευρική αλυσίδα της Arg569 συμβάλλει στη δημιουργία ενός κέντρου αναγνώρισης των Pi υψηλής συγγένειας [Oikonomakos *et al.*, 1992].



#### 4. Το κέντρο σύνδεσης ολιγοσακχαριτών

Το αποθηκευτικό κέντρο, εντοπίζεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο. Μέσω της συγκεκριμένης περιοχής, η GP συνδέεται με τα σωματίδια του γλυκογόνου *in vivo*. Η περιοχή αυτή, βρίσκεται σε ένα αβαθές αυλάκι, που σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλες α-έλικες και φιλοξενεί ολιγοσακχαρίτες, που έχουν διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας [Johnson *et al.*, 1989].

Το αποθηκευτικό κέντρο, λειτουργεί ως ένα επιπρόσθετο κέντρο ρύθμισης,, όπου η κατάληψή του από τον ολιγοσακχαρίτη, οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού κατάλυσης [Oikonomakos *et al.*, 1992].

#### 5. Το κέντρο αναστολής

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

Στην T διαμόρφωση της GP, η Phe285 του βρόγχου 280s εντοπίζεται κοντά στην Tyr613 στην αρχή της α19 έλικας (αμινοξέα 613-631) και μαζί, αυτά τα δυο υδροφοβικά μόρια, σχηματίζουν το κέντρο αναστολής. Η κατάληψη αυτού του κέντρου, από ένα μόριο έχει σαν αποτέλεσμα την σταθεροποίηση της T διαμόρφωσης του ενζύμου, καθώς επίσης και την φραγή της εισόδου του καταλυτικού κέντρου. Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η αναστολή της δράσης της GP [Oikonomakos *et al.*, 2002].

Η σύνδεση των αναστολέων με την πρωτεΐνη, δεν πραγματοποιείται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης, καθώς δεν έχουν παρατηρηθεί δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενζύμου. Θερμοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει, ότι η κύρια πηγή για την ενέργεια σύνδεσης, προέρχεται από την παράλληλη επιστοίβαξη των δακτυλίων, των αρωματικών αμινοξέων [Sprang *et al.*, 1982].

#### 6. Το νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο, εντοπίζεται στην διεπιφάνεια των δυο υπομονάδων, στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας της διμερούς δομής της GPb. Σε αυτό, συνδέεται η ένωση P320626 (Pfizer) και ινολο-2-καρβοξαμίδια, καθώς επίσης και η βενζόυλο-N-β-D-γλυκοκυρανοζυλουρία, δημιουργώντας αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις, με την T διαμόρφωση της GPb. Αντιθέτως, οι αλληλεπιδράσεις αυτές, μειώνονται κατά πολύ, κατά τη σύνδεση της συγκεκριμένης ένωσης, στην R διαμόρφωση της GPα [Oikonomakos *et al.*, 2002].

### 2.5 Μηχανισμός κατάλυσης

Ο μηχανισμός της κατάλυσης της GP, μπορεί να περιγραφεί, μέσω ενός υποστρώματος ολιγοσακχαρίτη. Εξετάσσεται, μέσω μιας αντίδρασης διπλής αντικατάστασης, σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, η 5'-φωσφορική ομάδα του συνενζύμου PLP, προάγει τη γενική, όξινη προσβολή της ανόργανης φωσφορικής ομάδας, στο γλυκοζιτικό οξυγόνο. Ο δεσμός υδρογόνου, μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας του συνενζύμου και του ανόργανου φωσφορικού υποστρώματος, επιτρέπει, την ταχεία ανταλλαγή πρωτονίων, μεταξύ δυο φωσφορικών ομάδων. Η πρωτονίωση του γλυκοζιτικού οξυγόνου, μεταξύ των υπομονάδων, οδηγεί στη διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού και στο σχηματισμό ιόντος καρβονίου- οξωνίου. Αυτό το μεταβατικό στάδιο, ευνοείται και σταθεροποιείται από τη φορτισμένη αρνητικά φωσφορική ομάδα. Στο δεύτερο στάδιο, η ανόργανη φωσφορική ομάδα, η οποία δρα ως πυρινόφιλη, προσβάλλει το ιόν καρβονίου του άνθρακα C1, οδηγώντας στο

σχηματισμό του προϊόντος GIP, με ταυτόχρονη διατήρηση της διαμόρφωσης [Watson *et al.*, 1999].

### 3. Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ SOLANUM TUBEROSUM (ΠΑΤΑΤΑ)

#### 3.1 Πρωτοταγής δομή της φωσφορυλάσης της πατάτας και σύγκριση με τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού

Οι φωσφορυλάσες, υπήρχαν αρχικά ως καταλυτικό ενεργό μόριο και ο ρυθμιστικός μηχανισμός, διαμορφώθηκε στο μόριο κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. [Kanichi Nakao et al.,1980]

Όλες οι φωσφορυλάσες, οι οποίες απομονώθηκαν από διαφορετικά είδη, δείχνουν να έχουν κοινές ιδιότητες [Graves,D.J.,and,J.H.1972], όπως, ότι υπάρχουν ως διμερή ή τετραμερή, με MB κοντά στο 100 και ότι περιέχουν, σταθερά συνδεδεμένη ανά υπομονάδα, τη φωσφορική πυριδοξάλη καθώς επίσης, ότι η δράση τους περιγράφεται, από τον Τυχαίο Μηχανισμό Bi-Bi Γρήγορης Εξισορρόπησης. Εκτός από αυτές τις γενικές ομοιότητες, που υπάρχουν μεταξύ τους, παρατηρούνται και έντονες διαφορές, όσον αφορά τις ρυθμιστικές τους ιδιότητες [Kanichi Nakao et al.,1980]

Η φωσφορυλάση, βρέθηκε και στα ανώτερα φυτά, όπως στην πατάτα. Η φωσφορυλάση της πατάτας, είναι ένα ένζυμο πολύ σημαντικό, για το μεταβολισμό του αμύλου. Το ένζυμο, το οποίο βρέθηκε στην πατάτα, έχει μελετηθεί σε πολύ μικρότερη κλίμακα, από ότι η μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού, γι αυτό και η φωσφορυλάση της πατάτας, συχνά συγκρίνεται με τη μυϊκή του κουνελιού.[Atsumi Kamogawa et al.,1968] Η αλληλουχία των αμινοξέων της φωσφορυλάσης της πατάτας, έχει ολοκληρωθεί και καθορίστηκε πλήρως. [Kanichi Nakao and Toshio Fukuit., 1985]

Η φωσφορυλάση της πατάτας, εμφανίζεται να είναι από πολλές απόψεις, παρόμοιο ένζυμο, με την μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού. Τα δύο ένζυμα, έχουν περίπου το ίδιο μοριακό βάρος [Seery, 1967], [Lee, 1960], το ένζυμο της πατάτας, αποτελείται από 916 αμινοξέα με μοριακό βάρος 103.916, οπότε το MB της

φωσφορυλάση της πατάτας είναι μεγαλύτερο κατά 6.516 από τη τη α μυϊκή του κουνελιού MB 97.400. [Kanichi Nakao and Toshio Fukuit., 1985]

Είναι διμερή [Wang and Graves, 1964] και περιέχουν ένα μόριο φωρφορικής πυρδοξάλης, στενά συνδεδεμένο σε κάθε μονάδα μονομερούς [Baranowski et al., 1957], [Lee, 1960]. Τα ένζυμα, έχουν επίσης, παρόμοιο περιεχόμενο αμινοξέων [Appleman et al., 1963], [Kamogawa et al., 1968], εκτός από το περιεχόμενο της Αργινίνης [Atsumi Kamogawa et al., 1968] και παρόμοια αντίδραση προς την glyoxal. [Fukui et al., 1970].

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων, όσον αφορά την αλληλούχιση της φωσφορυλάσης στην πατάτα, δείχνουν ότι τόσο το ένζυμο της πατάτας, όσο και της μυϊκής φωσφορυλάσης του κουνελιού, είναι ομόλογες πρωτεΐνες, παρά το γεγονός, της παντελούς διαφοράς τους στις ρυθμιστικές ιδιότητές τους. Τα δύο ένζυμα, μάλλον πρέπει να προέρχονται, από την εξέλιξη μιας κοινής προγονικής πρωτεΐνης [Kanichi Nakao et al., 1980]

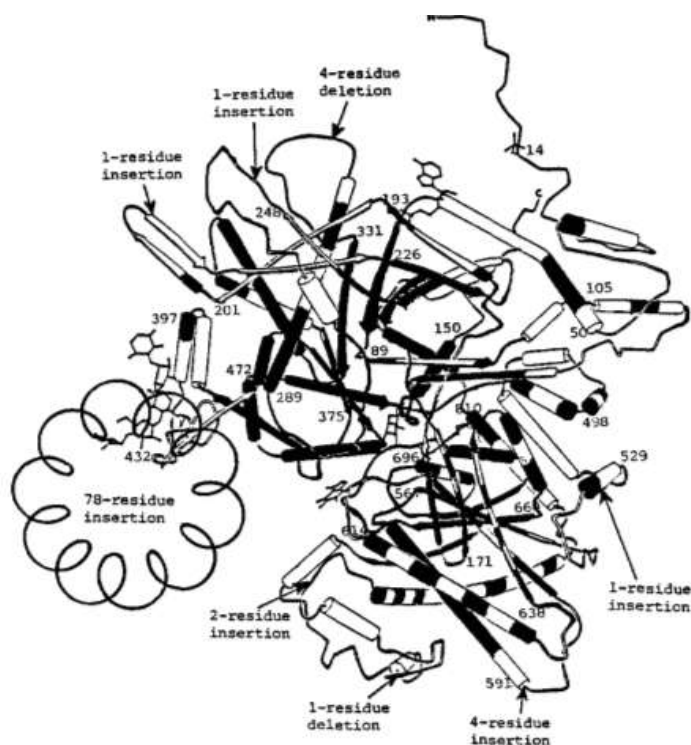
Από διάφορες μελέτες που έγιναν [Nakano et al., 1978], [Nakano et al., 1980] το ένζυμο της πατάτας και του κουνελιού, είναι υψηλά ομόλογα, εκτός από μια περιοχή, που είναι (το αμινοτελικό, 33 κατάλοιπα) πολύ διαφορετική. Η αξιοσημείωτη ανομοιομορφία, στη δομή αυτής της περιοχής, μας δίδει τη βάση για την διαφορά, όσον αφορά στις ρυθμιστικές ιδιότητες των δύο ενζύμων. [Kanichi Nakao et al., 1980].

Αναλυτικότερα, η σύγκριση του ενζύμου της πατάτας και του κουνελιού, δείχνει, ότι η αλληλουχία τους είναι κατά 43% πανομοιότυπη. Οι μεγάλες ομοιότητες και η χαμηλή συχνότητα παρεμβολών (περιοχών που υπάρχουν στο ένα ένζυμο και απουσιάζουν από το άλλο), υποδεικνύει, ότι η οικογένεια των φωσφορυλασών, είναι από τις καλά συντηρημένες πρωτεΐνες, συγκρινόμενες με τα κυτοχρώματα ή άλλες πρωτεΐνες. [Dayhoff, 1972].

Η σύγκριση μεταξύ των δύο ενζύμων, φανερώνει ότι σε περιοχές που σχετίζονται με τη ρύθμιση της δραστηριότητά τους, ότι είναι τελείως διαφορετικά, ενώ σε περιοχές που σχετίζονται με την καταλυτική τους αντίδραση, δείχνουν να είναι καλά συντηρημένα. [Kanichi Nakao and Toshio Fukuit., 1985]

Στη φωσφορυλάση της πατάτας, παρατηρούνται σε σύγκριση με τη μυϊκή του κουνελιού, 5 περιοχές που δεν υπάρχουν στη μυϊκή και μια περιοχή, που δε συναντάται στο ένζυμο της πατάτας, ενώ υπάρχει στο κουνέλι. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός, ότι ενώ τα επιπλέον τμήματα που παρατηρούνται στη φωσφορυλάση της πατάτας, είναι το πολύ 4 καταλοιπών υπάρχει μία περιοχή, η οποία αποτελείται από 78 κατάλοιπα, στο μέσο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας του ενζύμου. [Kanichi Nakao and Toshio Fukuit., 1985]

Η περιοχή αυτή, οφείλεται για τις διαφορές, που υπάρχουν μεταξύ των δύο ενζύμων στο Μοριακό Βάρος, και πιθανών, να είναι υπεύθυνη και για τις διαφορές στη συμπεριφορά τους και φυσικά, για να λυθούν όλες οι απορίες, είναι σημαντικό να μελετηθεί λεπτομερώς. [Kanichi Nakao and Toshio Fukuit., 1985]



*Σχήμα 9 :Δομική σύγκριση μεταξύ της μυϊκής φωσφορυλάσης του κουνελιού και της φωσφορυλάσης της πατάτας. Η αλληλουχία της φωσφορυλάσης της πατάτας χαρτογραφήθηκε στη σχηματική αναπαράσταση της μυϊκής α φωσφορυλάσης του κουνελιού, όπου οι έντονες ομοιότητες παρουσιάζονται στις σκοτεινές περιοχές*

Η θηλιά, που υπάρχει στην αριστερή πλευρά του σχήματος, αντιπροσωπεύει, την επιπλέον περιοχή της φωσφορυλάσης της πατάτας και είναι η σχηματική

αναπαράστασή της, μιας και δε γνωρίζουμε ποια είναι η δομή της στο χώρο και όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι υπεύθυνη, για τη διαφοροποίηση του συγκεκριμένου ενζύμου, σε σχέση με τη μυϊκή του κουνελιού.

Η περιοχή αυτή 78 κατάλοιπα, που υπάρχει στο ένζυμο της πατάτας και απουσιάζει από τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού, βρίσκεται στο σημείο, όπου τέμνονται η  $\text{NH}_2$ - τελική και η  $\text{COOH}$ - τελική περιοχή, η οποία είναι παρακείμενη, στην περιοχή αποθήκευσης του γλυκογόνου (από τη θέση 382 έως 444), στο ένζυμο του κουνελιού.[Schachtele et al., 1978]

Οι φωσφορυλάσες των ανωτέρων φυτών, κατηγοριοποιήθηκαν σε δυο τύπους ενζύμων, σύμφωνα με το μοριακό τους μέγεθος και τις ιδιαιτερότητες της γλουκάνης. [Toshio Fukui., 1983] Στα τύπου I ένζυμα, η υπομονάδα έχει μοριακό βάρος περίπου 110.000 και δείχνουν υψηλή συγγένεια για την αμυλοπηκτίνη, αμυλόζη, μαλτοδεξτρίνη αλλά ιδιαίτερα χαμηλή συγγένεια, για το γλυκογόνο. Σε αυτόν τον τύπο των ενζύμων, ανήκει και το ένζυμο της πατάτας. Τα ένζυμα τύπου II, έχουν μοριακό βάρος περίπου 90.000 και δείχνουν συγγένεια για το γλυκογόνο, τόσο ισχυρή, όσο και για την αμυλοπηκτίνη και την αμυλόζη. Αυτός ο τύπος της φωσφορυλάσης, υπάρχει στους βολβούς της πατάτας, ως δευτερεύον συστατικό. Οι διαφορές αυτές των δύο τύπων φυτικών ενζύμων, θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός, ότι ο τύπος I του ενζύμου, έχει μια επιπλέον επικράτεια (κομμάτι) στην μέση της πολυπεπτιδικής του αλυσίδας. [Kanichi Nakao and Toshio Fukui., 1985]

Η φωσφορυλάση της πατάτας, δείχνει υψηλή συγγένεια με την αμυλοπηκτίνη, αλλά μη φυσιολογική, χαμηλή συγγένεια, με το γλυκογόνο, ενώ η μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού, εμφανίζει υψηλή συγγένεια και για τα δύο προαναφερόμενα υποστρώματα.. [Shimomura et al, 1982] Η διαφορά μεταξύ του γλυκογόνου και του αμύλου, είναι ότι το γλυκογόνο έχει περισσότερες διακλαδώσεις, σε σχέση με το άμυλο. Η διαφορά της συμπεριφοράς των δύο ενζύμων, στο άμυλο και γλυκογόνο, οφείλεται στα 78 επιπλέον αμινοξέα, που παρατηρούνται στη φωσφορυλάση της πατάτας. [Kanichi Nakao and Toshio Fukui., 1985]

### 3.2 Κινητικός Μηχανισμός της φωσφορυλάσης της Πατάτας

Η φωσφορυλάση της πατάτας, λειτουργεί μέσω ενός τυχαίου μηχανισμού γρήγορης εξισορρόπησης Bi-Bi [Cleland, 1963], που αφορά δυαδικά σύμπλοκα του ενζύμου, με την αμυλοπηκτίνη, G1P και  $P_i$  και τριαδικά σύμπλοκα ενζύμου με αμυλοπηκτίνη και G1P και με αμυλοπηκτίνη και  $P_i$ . Ο μηχανισμός της φωσφορυλάσης της πατάτας, είναι ίδιος με αυτόν της  $\alpha$  φωσφορυλάσης του κουνελιού, παρουσία AMP σε κορεσμό.[Gold, 1970]

Η μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού και της πατάτας, είναι αξιοσημείωτα ίδια στις κινητικές τους ιδιότητες, καθώς επίσης και στον μηχανισμό κινητικής τους, όταν η σύγκριση γίνεται με την  $\alpha$  φωσφορυλάση, παρουσία AMP( οι διαφορές είναι μόνο ποσοτικές). [Gold et al., 1971]

Τόσο για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού όσο και της πατάτας, είναι απαραίτητη η παρουσία του εκκινήτη, για τη σύνθεση της  $\alpha$ -1,4 γλουκάνης. Στην περίπτωση της πατάτας, το ρόλο του εκκινήτη παίζει το άμυλο. [Atsumi Kamogawa et al.,1968]

Η φωσφορυλάση της πατάτας και η μυϊκή, είναι παρόμοιες σε μερικές από τις δομικές και κινητικές τους ιδιότητες, παρά τη διαφορά στη ρύθμιση της δραστηριότητας του ενζύμου. [Kanichi Nakao et al.,1980]

Η φωσφορυλάση της κινάσης από μύες κουνελιού, μπορεί να φωσφορυλιώσει τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού [Titani et al., 1975], του σκυλόψαρου [Cohen et al., 1973], του αρουραίου[Sevilla and Fischer, 1973], την ανθρώπινη [Hughes et al., 1962], καθώς επίσης και του συκωτιού του κουνελιού. Αντίθετα η φωσφορυλάση της πατάτας, δε φωσφορυλιώνεται από την φωσφορυλάση της κινάσης του κουνελιού, λόγω της διαφοράς που υπάρχει στην αμινοτελική περιοχή μεταξύ της πατάτας και της μυϊκής φωσφορυλάσης του κουνελιού.[Lee, 1960]

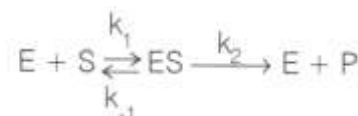


## 4. Η ΕΞΙΣΩΣΗ MICHAELIS-MENTEN

(Pamela C.Champe-Richard A. Harvey).

### 4.1 Το σχήμα της αντίδρασης

Οι Michaelis και Menten πρότειναν ένα απλό σχήμα, που εξηγεί τα χαρακτηριστικά των αντιδράσεων, που καταλύονται από ένζυμα. Στο σχήμα αυτό, το ένζυμο συνδέεται αντιστρεπτά με το υπόστρωμά του, για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο ES, που στη συνέχεια διασπάται σε προϊόν, αναγεννώντας το ελεύθερο ένζυμο. Το σχήμα, όσον αφορά ένα μόριο υποστρώματος, παριστάνεται πιο κάτω:



όπου S είναι το υπόστρωμα

E είναι το ένζυμο

ES είναι το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

$k_1$ ,  $k_{-1}$  και  $k_2$  είναι οι σταθερές ταχύτητας

### 4.2 Εξίσωση Michaelis-Menten

Η εξίσωση Michaelis-Menten περιγράφει τον τρόπο με τον οποίο η ταχύτητα της αντίδρασης μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος:

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

όπου

$V_o$  = αρχική ταχύτητα της αντίδρασης

$V_{max}$  = μέγιστη ταχύτητα

$K_m$  = σταθερά Michaelis

$[S]$  = συγκέντρωση υποστρώματος

Κατά την παραγωγή της εξίσωσης Michaelis-Menten έγιναν οι εξής παραδοχές:

1. Σχετικές συγκεντρώσεις των E και S: Η συγκέντρωση του υποστρώματος,  $[S]$ , είναι πολύ μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του ενζύμου,  $[E]$ , έτσι ώστε η ποσότητα του υποστρώματος που προσδένεται από το ένζυμο, κάθε χρονική στιγμή, να είναι μικρή.

2. Προϋπόθεση σταθερής κατάστασης: Η  $[ES]$  δεν μεταβάλλεται με το χρόνο (προϋπόθεση σταθερής κατάστασης) δηλαδή, η ταχύτητα σχηματισμού του ES είναι ίση με την ταχύτητα διάσπασης του ES (προς  $E + S$  και προς  $E + P$ ). Γενικά, ένα ενδιάμεσο μιας σειράς αντιδράσεων λέγεται ότι βρίσκεται σε σταθερή κατάσταση όταν η ταχύτητα της σύνθεσής του είναι ίση με την ταχύτητα της αποδόμησής του.

3. Αρχική ταχύτητα: Μόνο οι αρχικές ταχύτητες των αντιδράσεων χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των ενζυμικών αντιδράσεων δηλαδή η ταχύτητα της αντίδρασης μετρίεται μόλις το ένζυμο και το υπόστρωμα αναμιγνύονται και η  $[ES]$  φθάσει σε σταθερή κατάσταση (συνήθως λίγα δευτερόλεπτα μετά την ανάμιξη). Τη στιγμή αυτή η συγκέντρωση του προϊόντος είναι πάρα πολύ μικρή και επομένως η ταχύτητα της αντίστροφης αντίδρασης, από το P στο ES, μπορεί να αγνοηθεί.



Σχήμα 10: Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στις ταχύτητες της αντίδρασης για τα δύο ένζυμα, με το ένζυμο 1 να έχει μικρή  $K_m$  και το ένζυμο 2 να έχει μεγάλη  $K_m$

#### 4.3 Σημαντικά συμπεράσματα από την κινητική Michaelis- Menten

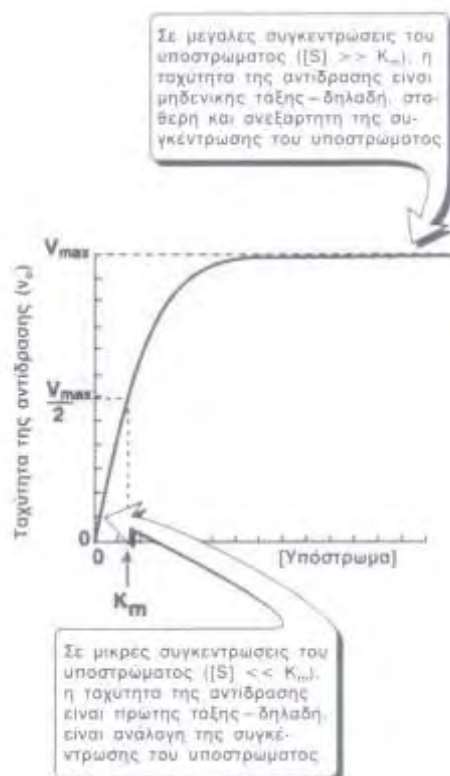
**Χαρακτηριστικά της  $K_m$ :** Η σταθερά Michaelis είναι χαρακτηριστική ενός ενζύμου και ενός συγκεκριμένου υποστρώματος και εκφράζει τη συγγένεια του ενζύμου, ως προς αυτό το υπόστρωμα. Η  $K_m$  είναι αριθμητικά ίση, με τη συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το  $\frac{1}{2} V_{max}$ . Η  $K_m$  δε μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του ενζύμου.

**α. Μικρή  $K_m$ :** Μία αριθμητικά μικρή  $K_m$  αντικατοπτρίζει **μεγάλη συγγένεια** του ενζύμου για το υπόστρωμα γιατί χρειάζεται μικρή συγκέντρωση του υποστρώματος για να κορεστεί το μισό ένζυμο δηλαδή να επιτευχθεί ταχύτητα ίση με την  $\frac{1}{2} V_{max}$  (Σχήμα 10).

**β. Μεγάλη  $K_m$ :** Μία αριθμητικά μεγάλη  $K_m$  αντικατοπτρίζει **μικρή συγγένεια** του ενζύμου για το υπόστρωμα, διότι χρειάζεται μεγάλη συγκέντρωση του υποστρώματος για να κορεστεί το μισό ένζυμο.

**Σχέση της ταχύτητας προς τη συγκέντρωση του ενζύμου:** Η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του ενζύμου για όλες τις συγκεντρώσεις του υποστρώματος. Πα παράδειγμα, αν η συγκέντρωση του ενζύμου υποδιπλασιαστεί, η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης ( $v_0$ ) μειώνεται στο μισό της.

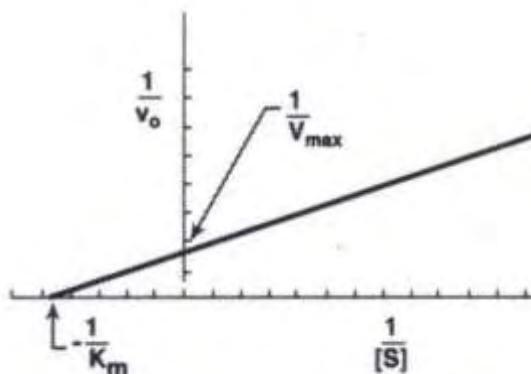
**Τάξη της αντίδρασης:** Όταν η  $[S]$  είναι πολύ μικρότερη της  $K_m$ , η ταχύτητα της αντίδρασης, είναι πρακτικά ανάλογη με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (Σχήμα 9). Τότε, η ταχύτητα της αντίδρασης, λέγεται ότι είναι πρώτης τάξης ως προς το υπόστρωμα. Όταν η  $[S]$  είναι πολύ μεγαλύτερη από την  $K_m$ , η ταχύτητα είναι σταθερή και ίση με την  $V_{max}$ . Η ταχύτητα της αντίδρασης είναι τότε ανεξάρτητη της συγκέντρωσης του υποστρώματος και λέγεται ότι είναι μηδενικής τάξης ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος ( Σχήμα 11).



*Σχήμα 11: Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα μιας αντίδρασης που καταλύεται από ένζυμο*

#### 4.4 Διάγραμμα Lineweaver-Burke

Όταν η ταχύτητα της αντίδρασης,  $V_o$ , παριστάνεται γραφικά ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος,  $[S]$ , δεν είναι πάντοτε δυνατό να καθοριστεί πότε επιτυγχάνεται η  $V_{\max}$ , γιατί η καμπύλη σχήματος υπερβολής έχει βαθμιαία ανοδική κλίση σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Όμως, αν παρασταθεί γραφικά η  $1/V_o$  ως προς την  $1/[S]$ , λαμβάνεται ευθεία γραμμή (Σχήμα 12). Το διάγραμμα αυτό καλείται διάγραμμα Lineweaver-Burke (ή διαφορετικά διάγραμμα διπλού αντι-στρόφου) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της  $K_m$  και της  $V_{\max}$  όπως επίσης και για τον προσδιορισμό των μηχανισμών δράσης των αναστολέων.



Σχήμα 12 : Διάγραμμα Lineweaver-Burke

Η εξίσωση που περιγράφει το διάγραμμα Lineweaver-Burke, είναι η εξής:

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Το σημείο τομής με τον άξονα των  $x$ , είναι ίσο με  $-1/K_m$ .

Το σημείο τομής με τον άξονα των  $y$ , είναι ίσο με  $1/V_{\max}$ .

(Pamela C.Champe-Richard A. Harvey).

## 5.ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ

Ο διαχωρισμός των συστατικών, επιτυγχάνεται με εκλεκτικές δεσμεύσεις και αποδεσμεύσεις, μμεταξύ των ιονισμένων συστατικών ενός υγρού και μιας στερεάς στατικής φάσης (ρητίνης), που φέρει δραστικές ομάδες, στις οποίες συνδέονται ευκίνητα ιόντα, που μπορούν να ανταλλάγουν, με τα ιόντα του υγρού. Τα προς διαχωρισμό συστατικά του μίγματος, βρίσκονται σε ιοντική μορφή με αντίθετο φορτίο ως προς τη στατική φάση και έλκονται σ' αυτήν, με ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Η κινητή φάση είναι υγρή. Η χρωματογραφία αυτή, εφαρμόζεται για ενώσεις που μπορούν να ιονιστούν. Σαν στατική φάση, χρησιμοποιείται ιοντοανταλλακτική ρητίνη, ενώ σαν κινητή φάση χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα.

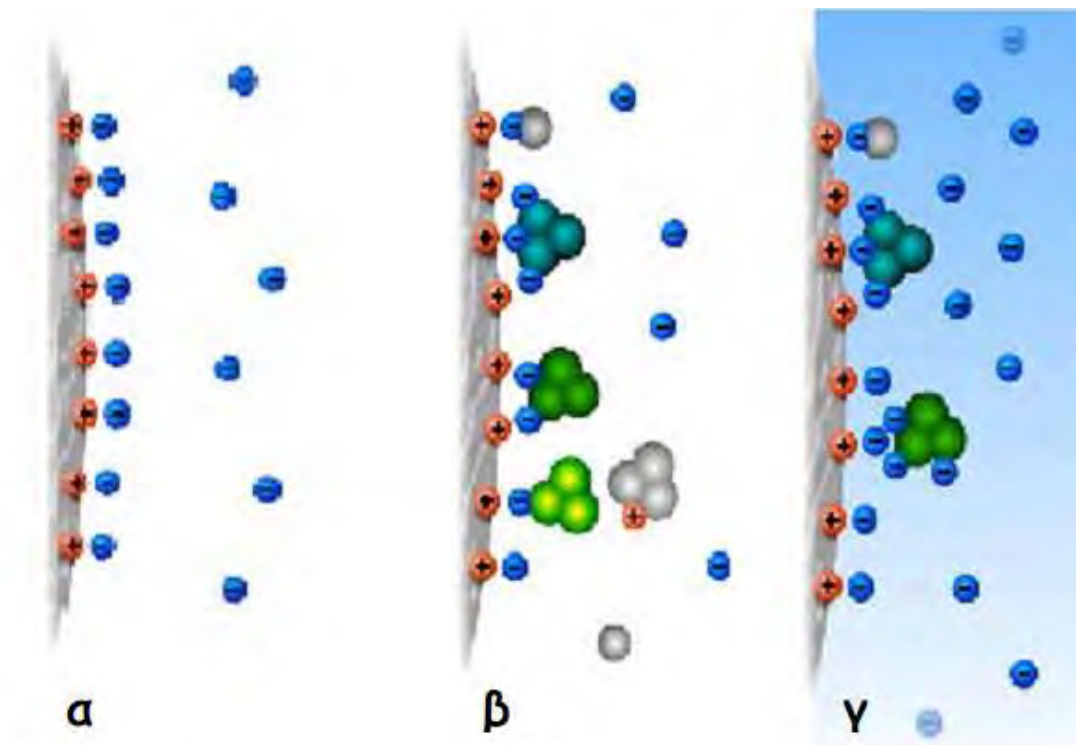
Οι ρητίνες, είναι αδιάλυτες στην κινητή φάση και έχουν πορώδη δομή. Στην επιφάνεια τους, βρίσκονται σταθερά συνδεδεμένες ανιονικές ή κατιονικές ομάδες, των οποίων το ιόν μπορεί εύκολα, να ανταλλαγεί με ιόντα της προς διαχωρισμό ουσίας. Ο διαχωρισμός, στηρίζεται στη διαφορετική ισχύ των ηλεκτροστατικών δυνάμεων, με τις οποίες τα διάφορα ιόντα, συγκρατούνται από τη ρητίνη.

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των ρητινών, είναι η ικανότητα τους να αναγεννώνται και να επαναχρησιμοποιούνται. Η χρωματογραφία αυτή, χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό ενζύμων, νουκλειικών οξέων, απλών ανόργανων ενώσεων, αλλά και για το διαχωρισμό ορισμένων αλκαλοειδών. Η χαρακτηριστική ομάδα, που περιέχει τα προς ανταλλαγή ιόντα, προσδιορίζει τα χαρακτηριστικά της ρητίνης.

Ρητίνες που μπορούν να ανταλλάξουν τα κατιόντα τους, με κατιόντα του περιβάλλοντος, ονομάζονται κατιονταλλακτικές :  $R^- H^+ + Na^+ \rightarrow R^- Na^+ + H^+$ . Ρητίνες που μπορούν να ανταλλάξουν τα ανιόντα τους, με ανιόντα του περιβάλλοντος ονομάζονται ανιονταλλακτικές :  $R^+ OH^- + Cl^- \rightarrow R^+ Cl^- + OH^-$ .

Ο διαχωρισμός στην χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, εξαρτάται από την αντιστρεπτή προσρόφιση των φορτισμένων διαλυτών μακρομορίων, στις

ακίνητοποιημένες ιοντοανταλλακτικές ομάδες, αντίθετου φορτίου. Το πρώτο βήμα, είναι η εξισορρόπηση της στατικής φάσης της στήλης, στις επιθυμητές συνθήκες ιοντικής ισχύος, θερμοκρασίας και μεταλλοϊόντων (Σχήμα 13α). Το δεύτερο βήμα, είναι η χορήγηση του δείγματος και η έκπλυση της στήλης. Σε αυτή την διαδικασία, επιτυγχάνεται η προσρόφηση των πρωτεϊνών στις φορτισμένες ομάδες της στήλης και η απομάκρυνση των μη δεσμευμένων ακρομορίων και άλλων ουσιών (Σχήμα 13β). Στο τελευταίο βήμα, στην έκλουση, τα βιομακρομόρια απελευθερώνονται από τον ιοντοανταλλάκτη, με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος διαφορετικής σύστασης (Σχήμα 13γ). Ένας σύνθετος τρόπος, είναι η αύξηση της ιοντικής ισχύος, με προσθήκη NaCl.



Σχήμα 13: Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. α.) Εξισορρόπηση, β.) χορήγηση του δείγματος και έκπλυση, γ.) έκλουση.

Η DEAE κυτταρίνης, είναι ρητίνη που περιέχει ιονιζόμενη τριτοταγή αμινομάδα.. Είναι θετικά φορτισμένη σε ουδέτερο pH και έτσι η DEAE κυτταρίνης

αποτελεί ένα ανταλλάκτη ανιόντων. Η στήλη Sephadex είναι επίσης ανιοανταλλακτική ρητίνη, η οποία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, για το διαχωρισμό των υψηλού μοριακού βάρους πρωτεϊνών. Τα δύο αυτά είδη ρητινών χρησιμοποιήθηκαν για το παρόν πείραμα.



## 6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου σε ζωικούς οργανισμούς, είναι ένα ένζυμο το οποίο μελετήθηκε αρκετά, όπως η μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού. Αντίθετα, η φωσφορυλάση της πατάτας, δεν αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης για αρκετά χρόνια.

Η φωσφορυλάση της πατάτας παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί είναι ένα ένζυμο, που παρόλο ότι είναι καλά συντηρημένο, η συμπεριφορά του είναι αρκετά διαφορετική, από τη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου του κουνελιού. Σημαντική ένδειξη, αποτελεί το γεγονός ότι δεν παρουσιάζει αλλοστερική ρύθμιση, σε αντίθεση βέβαια, με τη μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου του κουνελιού.

Αποτελεί λοιπόν ένα ένζυμο, που είναι σημαντικό να μελετηθεί, τόσο βιοχημικά όσο και δομικά, ώστε να διαπιστωθεί ποιός ο ρόλος της επιπλέον περιοχής (επικράτειας), η οποία παρουσιάζεται στην φωσφορυλάση της πατάτας, σε σχέση με τη μυϊκή του κουνελιού. Σημειωτέον ότι η επιπλέον επικράτεια, είναι προφανώς και η αιτία, της διαφορετικής συμπεριφοράς της φωσφορυλάση της πατάτας. Η μελέτη της επικράτειας μέσω κρυσταλλογραφικών μελετών, θα μας οδηγήσει να εξάγουμε διάφορα συμπεράσματα, για το πώς επηρεάζει η επιπλέον αυτή περιοχή του ενζύμου, τη συμπεριφορά του.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας εργασίας, είναι να απομονώσουμε την φωσφορυλάση από βολβούς πατάτας και να πάρουμε το ένζυμο, με τη μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα. Εν συνεχεία, να διερευνήσουμε τη λειτουργία της, μέσω της κινητικής της δραστηριότητας.

Ο απώτερος σκοπός, ο οποίος και θα αποτελέσει αντικείμενο μελέτης μιας επόμενης εργασίας, είναι να εξακριβωθεί η δομή του ενζύμου της πατάτας, καθώς επίσης και η σχέση που υπάρχει μεταξύ της δομικής και λειτουργικής συμπεριφοράς της φωσφορυλάση της πατάτας.

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 7.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Για την απομόνωση της φωσφορυλάσης της πατάτας, χρησιμοποιήθηκαν στήλες ιονανταλλαγής, όπως η DEAE κυτταρίνης και για περεταίρω καθαρισμό η Sephadex a-50. Στην όλη διαδικασία που ακολουθήθηκε, παρουσιάζονται παρακάτω, τα υλικά, όργανα και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, για την απομόνωση και για τον χαρακτηρισμό (προσδιορισμό της  $K_m$ - $V_{max}$ ) της φωσφορυλάσης της πατάτας

### Όργανα

Περισταλτική αντλία (Pharmacia)

Υπέρηχοι για απαέρωση των διαλυμάτων (Elmasonic)

Φωτόμετρο (Spectronic 20 Genesys )

Φασματοφωτόμετρο ( Spectronic Unicam 10UV )

Συσκευή ηλεκτοφόρησης( Biorad)

Υδρόλουτρο (ρυθμισμένο να διατηρεί τη θερμοκρασία στους 30°C)

### Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωσης της φωσφορυλάσης της πατάτας

Πατάτες Κύπρου 2κιλά (ποικιλία Spuda)

μεμβράνη διαπίδυσης (Sigma)

άμυλο πατάτας (Sigma)

φιλτράκια κυτταρίνης (Millipore )

φιλτράκια υπερδιήθησης κατωφλ. M.B 10000 (Millipore)

Ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν την απομόνωσης της φωσφορυλάσης της πατάτας

ρυθμιστικό δ/μα 0.5M κιτρικό Na, pH 6.0 MB=294,10 (Panreac))

ρυθμιστικό δ/μα 0.5M Tris-HCL, pH 7.5 MB=121.14 (Merk)

δ/μα 0.7%θειοθειικό Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (Merk)

Διάλυμα αμύλου

- Εμπορικό άμυλο αραβοσίτου (40γρ.) το οποίο είναι διαλυμένο σε ένα μίγμα των 10ml 0.5M κιτρικό Na ρυθμιστικό δ/μα pH 6.0 και 1600 ml νερού, βράζεται με έντονο ανακάτεμα για μερικά λεπτά (σε ατμοσφαιρική πίεση).
- Το δ/μα αφήνεται όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έπειτα αραιώνεται σε 2 λίτρο με την προσθήκη πάγου και ψύχεται μέσα σε πάγο- νερό.
- 0.5M sodium citrate ρυθμιστικό δ/μα, pH 6.0 και 0.5M tris-HCL ρυθμιστικό δ/μα, pH 7.5. Τα δύο αυτά δ/ματα χρησιμοποιούνται χωρίς αναπροσαρμογή (ξαναρύθμιση) του pH μετά την αραιώση.

Ρυθμιστικά διαλύματα. για τον προσδιορισμό της Km-Vmax

α) β-GP(50 mM), β-μερκαπτοαιθανόλη πυκνή (50 mM), EDTA(1mM) pH6.8. Χρησιμοποιήθηκε για αραιώσεις του ενζύμου

β-φωσφογλυκερόλη, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub>P, MB 306,12 g/mol (MERCK)

β-μερκαπτοαιθανόλη, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, MB 78,3 g/mol (SERVA)

EDTA, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, MB 372,5 g/mol (SERVA)

β) imidazole (200mM), KCl (400mM), EDTA (4mM), DTT (4mM) pH 6.8

χλωριούχο κάλιο, KCl, MB 74,56 g/mol (SIGMA), η μεγάλη συγκέντρωση του KCl είναι απαραίτητη για τη διατήρηση σταθερής ιοντικής ισχύς στα πειράματα

EDTA, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>.Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, MB 372,5 g/mol ,(SERVA)

Διθειοθρεϊτόλη, DTT, C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, MB 154,25 g/mol (SIGMA), η DTT όπως και η μερκαπτοαιθανόλη δρα ως αναγωγικό μέσο για την αποφυγή φαινομένων όπως η μερική οξείδωση του ενζύμου ή μικροετερογένεια κατά την κρυστάλλωση.

#### Διαλύματα για τον προσδιορισμό της Km-Vmax

Διάλυμα α-D-G-1-P 400mM (στα δ/τα χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό, HPLC)

α-D-1-φωσφορική γλυκόζη, α-D-G-1-P, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>9</sub>PNa<sub>2</sub>, MB 376.06 g/mol (SIGMA)

Διάλυμα αμυλου 5%

Διάλυμα SDS 1% w/v

Δωδεκακυλοθειικό νάτριο, SDS, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S, MB 288,38 g/mol, (SIGMA)

Διάλυμα ενζύμου GPb

Αντιδραστήριο μολυβδαινίου pH 5.0

Μολυβδαινικό αμμώνιο, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, MB 1236,86 g/mol (MERCK)

Οξικός ψευδάργυρος, Zn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, MB 219,49 g/mol (SIGMA)

Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% w/v, pH 5.0

L(+) ασκορβικό οξύ, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, MB 176,13 g/mol (MERCK)

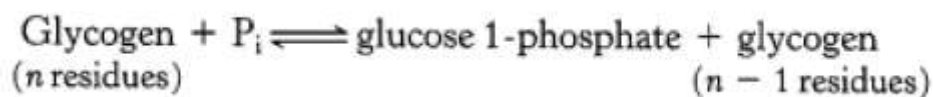
## 8. ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα το οποίο αφορά την απομόνωση της φωσφορυλάσης από *Solanum tuberosum* (πατάτα) και το χαρακτηρισμό του ενζύμου, εκπονήθηκε στο εργαστήριο Λειτουργικής Βιοχημείας και για την ολοκλήρωσή του εφαρμόστηκαν οι παρακάτω μέθοδοι.

Η ηλεκτροφόρηση, είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, κατά τη διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απομόνωση της φωσφορυλάσης από βολβούς πατάτας, προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη του ενζύμου στα δείγματά μας, καθώς επίσης και η καθαρότητά της.

Η ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών (Bradford), είναι επίσης μία μέθοδος, που χρησιμοποιήθηκε, κατά τη διαδικασία απομόνωσης της φωσφορυλάσης της πατάτας, έτσι ώστε, να διαπιστωθεί όπου κρινόταν απαραίτητο, η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα δείγματά μας.

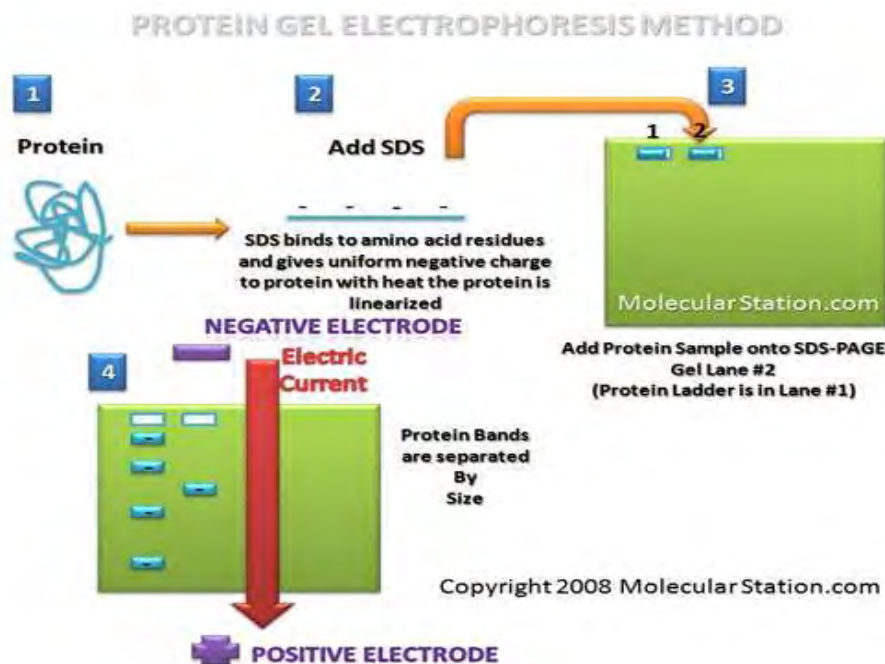
Στη συνέχεια, για να χαρακτηρίσουμε το ένζυμό μας, μελετήθηκε η κινητική της αντίδρασης



Όπου προσδιορίστηκαν φωσφορικά με τη μέθοδο ασκορβικού οξέος και με βάση των τιμών που πήραμε, προσδιορίστηκε η σταθερά Michaelis-Menten  $K_m$ .

## 8.1 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Το ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται και σχηματίζονται αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου, στις οποίες ενσωματώνονται κατά διαστήματα, μόρια N-N-μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου (bis). Τα μόρια bis, μπορούν να ενσωματώνονται σε δύο διαφορετικές αλυσίδες και έτσι δημιουργείται ένα πλέγμα. Ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου, επιτυγχάνεται με το TEMED (τετραμεθυλοδιαμίνη), για τη δράση του οποίου, είναι απαραίτητη η παρουσία υπερθειικών ιόντων. Οι αποδιατακτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται, είναι το ιοντικό απορρυπαντικό θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο (SDS) και η μερκαπτεθανόλη (mercaptoethanol). Το SDS, δεσμεύεται στις πρωτεΐνες με σταθερή αναλογία βάρους (1,4gr SDS/ gr πρωτεΐνης), προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο, ανάλογο του μεγέθους τους. Η χρήση της μερκαπτεθανόλης (mercaptoethanol), έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, αλλά και αυτών που συνδέουν διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, πολυμερών πρωτεϊνών. Η πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών, επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 100°C για 1 με 2 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό, τα πολυπεπτίδια τα οποία αναλύονται σε SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, αποκτούν αρνητικό φορτίο και η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα, είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους.



Σχήμα. 14: Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος ακρυλαμιδίου

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση, σε πηκτή ακρυλαμίδιου 12%. Αυτή, αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές, την πηκτή διαχωρισμού (separating gel) και την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel).

Η διαδικασία έχει ως εξής:

Στήσιμο της συσκευής, κατασκευή του πηκτώματος διαχωρισμού .

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ
H <sub>2</sub> O	
Ακρυλαμίδιο 37%	30%
Tris (pH 8,8)	1,5mM
SDS 10%	10%
APS 10%	10%
TEMED	

Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού 12%

Πήξη του πηκτώματος, αφού τοποθετηθεί ένα στρώμα ισοπροπανόλης στην κορυφή.

Κατασκευή του πηκτώματος επιστοίβαξης

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ
H <sub>2</sub> O	
Ακρυλαμίδιο 37%	30%
Tris (pH 6,8)	1 mM
SDS 10%	10%
APS 10%	10%
TEMED	

Σύσταση πηκτώματος επιστοίβαξης 4%

Ετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων με προσθήκη loading buffer και θέρμανση στους 100°C για 1-2 λεπτά.



Φόρτωση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στα φρεάτια του πηκτώματος επιστοίβαξης.

Ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων στη συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό την παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης με 90mA για περίπου 1 ώρα.

Βάψιμο του πηκτώματος με διάλυμα coomasie για 15 λεπτά.

Εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών με το διάλυμα αποχρωματισμού.

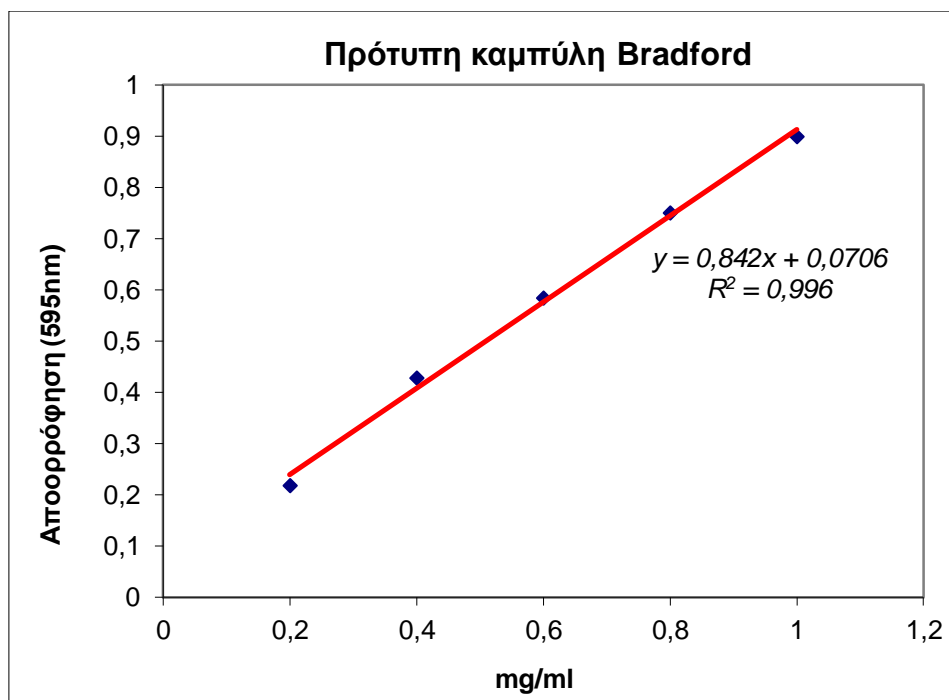
## **8.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

Με τη μέθοδο Bradford, προσδιορίζεται η συγκέντρωση πρωτεϊνικών δειγμάτων. Η δέσμευση της χρωστικής coomassie brilliant blue, στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών, αποτελεί τη βάση της μεθόδου αυτής. Η δέσμευση αυτή, είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης και μετατοπίζει το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής, από τα 470nm στα 595nm. Το χρώμα του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής, είναι σταθερό για μία ώρα περίπου και έχει υψηλό μοριακό, συντελεστή απορρόφησης, που συνεπάγεται, υψηλή ευαισθησία στις ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων. Με τη βοήθεια διαλυμάτων, αλβουμίνης ορού (BSA) γνωστών συγκεντρώσεων, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη, από την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων, σε πρωτεΐνη.

Στα διάφορα στάδια της διαδικασίας, η ποσοτικοποίηση έγινε με βάση τη μέθοδο Bradford. Ένα παράδειγμα της πρότυπης καμπύλης Bradford είναι το παρακάτω, σχήμα 14 . Η εξίσωση που προέκυψε από τη δική μας πρότυπη καμπύλη είναι η εξής:

$$Y = 0,842X + 0,0706$$

$$R^2 = 0,996$$

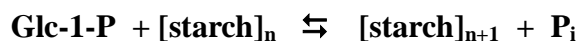


Σχήμα 15 : Καμπύλη ποσοτικοποίησης πρωτεΐνης

### 8.3 Προσδιορισμός $K_m \cdot V_{max}$

Ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών του ενζύμου, βασίζεται, στο προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων, που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του αμύλου, που καταλύεται από την GPb.

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση σύνθεσης του :



Το ένζυμο που καταλύει την παραπάνω αντίδραση, είναι η φωσφορυλάση της πατάτας. Η  $K_m$ , εξάγεται ως προς την G1P, με προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν. Γι αυτό το λόγο, το άμυλο το οποίο χρησιμοποιείται, σαν ενεργοποιητής του ενζύμου βρίσκεται σε περίσσεια.

Στην ισορροπία η Glc-1-P υδρολύεται κατά 78% σε pH 6.8 και θερμοκρασία 30°C.

#### 8.4 Προσδιορισμός φωσφόρου – Μέθοδος ασκορβικού οξέος (Saheki et al,1985)

Η μέθοδος αυτή, στηρίζεται στο σχηματισμό έγχρωμου συμπλόκου σε ήπια όξινες συνθήκες ( pH5 ), παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ και φωτομέτρηση στα 850nm. Η μέθοδος, εμφανίζει αξιοπιστία για 0.05-0.40μmol φωσφόρου. Παρασκευάζονται τα παρακάτω διαλύματα, για την εκτέλεση αυτής της μεθόδου:

Διάλυμα Α μολυβδαινικού αμμωνίου 15mM,, οξικού ψευδαργύρου 100mM και ρύθμιση με HCl σε pH5. Το διάλυμα αυτό, φυλάσσεται μέσα σε δοχείο πολυαιθυλενίου, μακριά από το φως.

Διάλυμα Β ασκορβικού οξέος 10% w/v και ρύθμιση με NaOH σε pH5. Το διάλυμα αυτό, πρέπει να παρασκευάζεται πριν από κάθε πείραμα (λόγο της οξειδωσης του ασκορβικού οξέος).

Ακολουθεί ανάμιξη των δύο διαλυμάτων, σε αναλογία όγκων  $V_{\text{Διάλυμα Α}} : V_{\text{Διάλυμα Β}} = 4 : 1$ . Το νέο διάλυμα, φυλάσσεται μακριά από το φως και χρησιμοποιείται μετά από 15min από την παρασκευή του, και για χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο των 4hr.

#### Παρασκευή τυφλών

Η μέθοδος εξαγωγής της  $K_m$  του ενζύμου, βασίζεται στο προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων, που προκύπτουν κατά την αντίδραση σύνθεσης του αμύλου, που καταλύεται από την GPb. Γι' αυτό το λόγο, θα πρέπει να αφαιρεθούν απορροφήσεις φωσφορικών, τα οποία δεν προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου.

Έτσι παρασκευάζονται τα παρακάτω τυφλά:

- Τυφλό νερού για τη ρύθμιση του μηδενός
- Τυφλό με τη μέγιστη συγκέντρωση G1P που χρησιμοποιείται και αναγωγή της τιμής της απορρόφησης που προκύπτει λόγω της φυσικής υδρόλυσης της G1P στις άλλες συγκεντρώσεις του πειράματος
- Πρότυπο γνωστού διαλύματος φωσφορικών από όπου εξάγεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε  $\mu\text{mol Pi}$
- Τυφλό γλυκογόνου λόγω της πιθανής παρουσίας φωσφορικών

Παρασκευάζονται τουλάχιστο από δύο τυφλά για κάθε περίπτωση, εκτός του νερού και λαμβάνεται ο μέσος όρος των απορροφήσεών τους. Αν η χρονική διάρκεια ενός πειράματος (όπως σε περιπτώσεις που εξετάζεται κάποιος αναστολέας) κρίνεται μεγάλη, τότε φτιάχνονται δύο σειρές τυφλών, από τουλάχιστο δύο δείγματα η κάθε μία, οι οποίες μετριοούνται η μία στην αρχή του πειράματος και η άλλη στο τέλος, από όπου λαμβάνεται και πάλι ο μέσος όρος των τιμών.

## 9. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ (ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ $K_m$ - $V_{max}$ )

### 9.1 Παρασκευή διαλυμάτων για διάφορες συγκεντρώσεις G1P

Από το πυκνό διάλυμα της G1P (400mM) και το ρυθμιστικό διάλυμα Imidazole (200mM), KCl (400mM), EDTA (4mM), DTT (4mM) αναμιγνύονται κατάλληλοι όγκοι, ώστε να προκύψει διάλυμα G1P (40mM), Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) και με pH6.8.

Εν συνεχεία, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) και pH6.8 με αραιώση του ρυθμιστικού Imidazole (200mM), KCl (400mM), EDTA (4mM), DTT (4mM).

Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις της G1P, προκύπτουν με αραιώσεις του διαλύματος G1P 40mM, με το ρυθμιστικό διάλυμα Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM). Έτσι προκύπτει το παρακάτω διάλυμα:

- G1P 40mM, Imidazole (135mM), KCl (270mM), EDTA (2,7mM), DTT (2,7mM) pH6.8

Τα παραπάνω διάλυμα, φυλάσσεται στους -20°C για να αποφευχθεί η φυσική υδρόλυση της G1P.

Παρασκευάζονται τα παρακάτω διαλύματα τελικού όγκου 720μl και pH6.8, με αραιώση του προαναφερθέντος διαλύματος G1P .

1. G1P 1.80mM    3. G1P 3.20mM
2. G1P 2.40mM    4. G1P 4.80mM

## 9.2 Εκτέλεση Πειράματος

Το διάλυμα του ενζύμου με το άμυλο, τοποθετείται για επώαση στους 30°C εντός του υδρόλουτρου, για 15min. Μετά την πάροδο 10min, από την αρχή της διαδικασίας στο υδρόλουτρο, τοποθετούμε και τα διαλύματα των διαφόρων συγκεντρώσεων της G1P και τα αφήνουμε για 5 min. Μετά την επώαση, 180  $\mu$ l ενζυμικού διαλύματος, εισάγονται στους σωλήνες των υποστρωμάτων (διαλύματα G1P), με όγκο διαλύματος 720 $\mu$ l, για να ξεκινήσει η αντίδραση. Στις συνθήκες που λαμβάνει χώρα η αντίδραση, το pH είναι 6,8, η θερμοκρασία στους 30°C και οι διάφορες συγκεντρώσεις:

- $\alpha$ -D-G-1-P 4.8mM, 3.2mM, 2.4mM, 1.8 mM.
- GPb
- Imidazole 30mM
- KCl 60mM
- DTT 0.6mM
- EDTA ~0.6mM,
- Merc 0.1mM,  $\beta$ -GP 0.1mM

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (2, 3, 5 και 7 λεπτά), λαμβάνονται 200 $\mu$ l από το μείγμα της αντίδρασης και εισάγονται σε σωληνάκια,, τα οποία περιέχουν 50  $\mu$ l SDS 1% w/v. Παρουσία του απορρυπαντικού το ένζυμο αποδιατάσσεται και αδρανοποιείται, με συνέπεια να σταματά η αντίδραση.

Στα δείγματα γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου, με τη μέθοδο ασκορβικού οξέος,: σε κάθε σωληνάκι που περιέχει το μείγμα της αντίδρασης, καθώς και στα τυφλά, βάζουμε 2,5ml του διαλύματος μολυβδαινικού αμμωνίου-ασκορβικού οξέος και όλα τα σωληνάκια, επωάζονται για 15min εντός του υδρόλουτρου (30°C).

Τέλος, μετράται η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 850 nm και καταγράφονται οι τιμές.

## 10. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά από διάφορες πειραματικές δοκιμές,, για την απομόνωση της φωσφορυλάσης της πατάτας, καταλήξαμε στην παρακάτω μέθοδο απομόνωσης του ενζύμου.

### 10.1 Απομόνωση της φωσφορυλάσης της πατάτας

- Χρησιμοποιούνται βολβοί πατάτας, με τη φλούδα *Sputa* sp. (2 κιλά). Πλένονται οι πατάτες και κόβονται σε φέτες, περίπου 1cm πάχους.
- Εμβαπτίζονται οι πατάτες, για 45-60 λεπτά σε ένα δ/μα 0.7%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  και 0.7% κιτρικό Na.
- Οι φέτες της πατάτας, οι οποίες δεν πλένονται με νερό, ομογενοποιούνται σε αποχυμωτή (κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, διατηρούμε τόσο τις φέτες πατάτας όσο και το χυμό που παίρνουμε, σε πάγο).
- Ο χυμός, φιλτράρεται μέσα από μία χονδροειδής γάζα, για να απομακρυνθούν τα απομεινάρια των ιστών. Παίρνουμε την πούλπα και στύβουμε τη γάζα. Το διήθημα αφήνεται στο κρύο, για να απομακρυνθούν οι κόκκοι αμύλου, για περίπου 1 ώρα στον ψυχρό θάλαμο.
- Το εκχύλισμα περίπου 1λίτρο, pH περίπου 5.6, ρυθμίζεται στο 7.2 pH, με δ/μα 1N NaOH.
- Το εκχύλισμα, βυθίζεται σε νερό θερμοκρασίας 55 °C υπό ανάδευση, ώστε να αποφευχθεί η αύξηση θερμοκρασίας τοπικά. Όταν η θερμοκρασία του περιεχομένου, φτάσει στους 55 °C ( δηλ. μετά από λίγα λεπτά μετά την αρχή της θέρμανσης), το δοχείο μεταφέρεται σε πάγο- νερό με ανάδευση, ώσπου να πέσει η θερμοκρασία στους 0 °C.

Το εκχύλισμα οδηγείται σε μερική αδρανοποίηση, εάν μεταχειριστεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 55 °C ή όταν θερμαίνεται για περισσότερο χρόνο στους 55°C. Είναι πιο ασφαλές, εάν η θέρμανση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία,

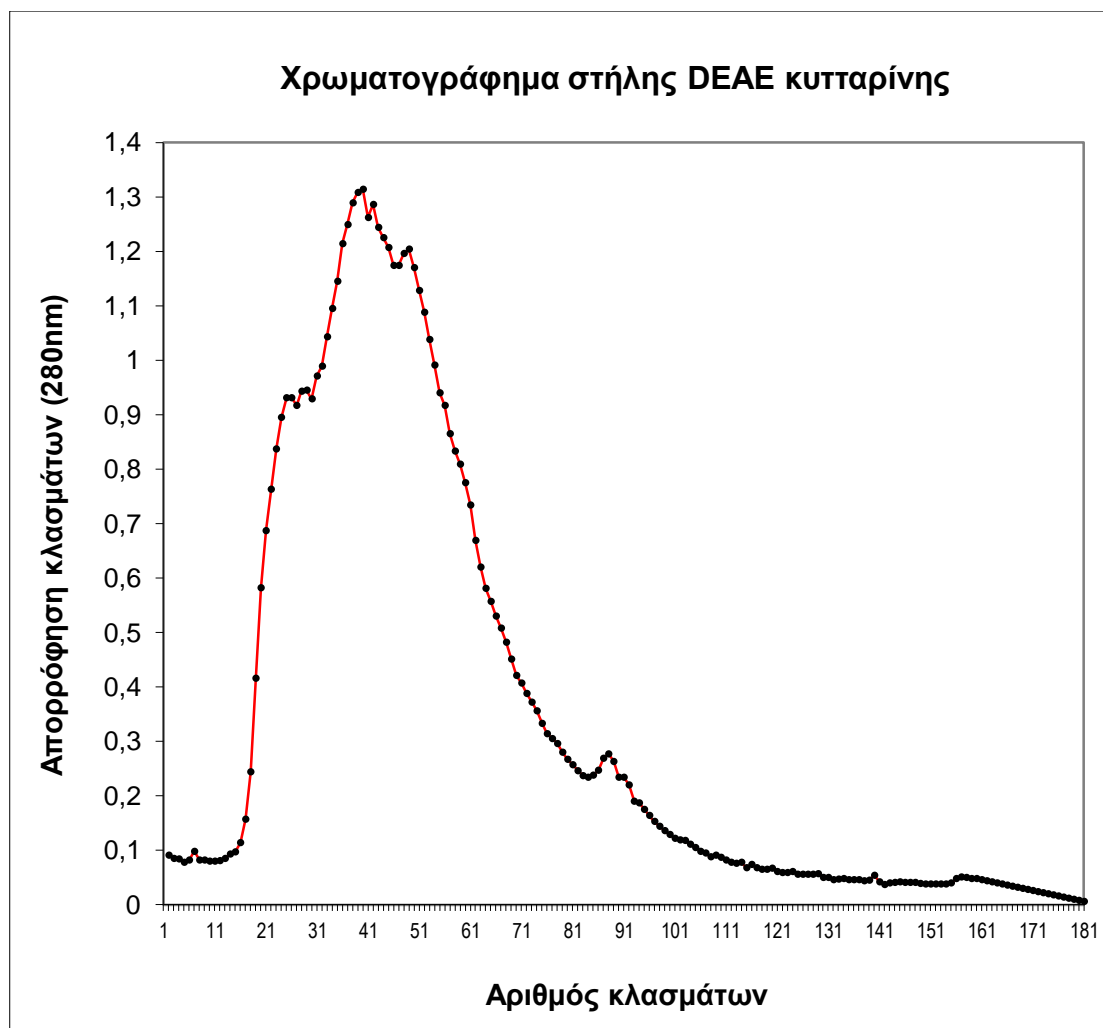
ελαφρώς χαμηλότερη από τους 55°C. Η θερμική επεξεργασία μπορεί να παραλείπεται, σε περίπτωση, όπου έχουμε μεγάλους όγκους από το εκχύλισμα. Ωστόσο, μπορεί να οδηγηθεί σε αμαύρωση του εκχυλίσματος και εμφάνιση της δεύτερης μικρής κορυφής της φωσφορυλάσης, με χαμηλότερη συγκεκριμένη δραστηριότητα στη στήλη DEAE κυτταρίνης, της χρωματογραφίας.

- Το εκχύλισμα, το οποίο υποβλήθηκε σε θερμότητα, φυγοκεντρείται στο κρύο (10,000xg, 10min), για να κρατηθεί το υπερκείμενο υγρό .
- Το υπερκείμενο, αναμιγνύεται με το (προψυγμένο) δ/μα αμύλου, σε ένα γυάλινο δοχείο ανοιχτό (για να μπορεί να γίνει εφικτή η ανάδευση). Το δοχείο ψύχεται σε θερμοκρασία κάτω του 0 °C υπό ανάδευση, μέσα σε ένα μίγμα άλατος-πάγου.
- Ενώ το μίγμα αναδεύεται ήπια, προστίθεται κρύα αιθανόλη (η οποία βρίσκεται στην κατάψυξη) , (σε αναλογία 1/4 προς το μίγμα, το οποίο προψύχθηκε σε ψυγείο) για περίπου 1 λεπτό .
- Η ανάδευση σταματά αμέσως μετά την προσθήκη όλης της αιθανόλης.
- Η πυκνή πάστα στον πάτο του δοχείου, συλλέγεται, αφού αφαιρέσουμε το υπερκείμενο με απλή απόχυση και στη συνέχεια διαλύεται, σε 0,8 λίτρα 5 mM κιτρικού Na ρυθμιστικού δ/τος. Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος, όλη τη νύχτα στο κρύο. Όλη η διαδικασία μέχρι αυτό το βήμα, πρέπει να τελειώσει, την πρώτη μέρα του καθαρισμού.
- Την επόμενη ημέρα, το αμυλούχο δ/μα αφού ομογενοποιήθηκε με ανάδευση όλη τη νύχτα, φυγοκεντρείται 2<sup>η</sup> φορά, στο κρύο σε (14,000xg για 10 min) έτσι ώστε, να αφαιρεθεί το ίζημα και να συλλέξουμε το υπερκείμενο υγρό, το οποίο και χρειαζόμαστε.
- Μετά τη φυγοκέντρωση, το δ/μα διηθείται με απλό διηθητικό χαρτί, για να απομακρυνθούν τελείως τα συσσωματώματα.
- Ένα βασικό βήμα, της εφαρμογής του πρωτοκόλλου για την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου της πατάτας, είναι η στήλη DEAE κυτταρίνης, από την οποία, πρέπει να περάσει το δείγμα μας έτσι ώστε, να απομακρυνθεί ένας μεγάλος όγκος πρωτεϊνών.



- Το αμυλούχο δ/μα, εφαρμόζεται στη στήλη DEAE κυτταρίνης (6.5 X 13 cm) σε 5 mM κιτρικό Na , με ταχύτητα ροής 2ml/min.
- Αφήνεται όλη νύχτα η στήλη να εκπλένεται, με 1.5 λίτρο του 5 mM κιτρικό Na (wash) απαερωμένο.(δηλ. 2 με 3 όγκους στήλης), με ταχύτητα ροής 2ml/min.
- Έπειτα πραγματοποιείται έκλουση, με ένα γραμμικής βαθμίδωσης δ/μα από 0 έως 1 M NaCl, σε ένα σύνολο των 2 λίτρων 5 mM κιτρικού Na ρυθμιστικού δ/τος, με ταχύτητα ροής των 2 ml/min.
- Η έκλουση λαμβάνει χώρα όλη τη νύχτα.
- Κλάσματα των 13 ml συλλέγονται σε ταχύτητα ροής των 2 ml/min.
- Με το πέρας της βαθμίδωσης NaCl, η στήλη εκπλύνεται με πυκνό δ/μα 0.5 λίτρα 1M NaCl - 5 mM κιτρικού Na, για την απομάκρυνση τυχόν ισχυρά συνδεδεμένων πρωτεϊνών.

Με βάση τη διαδικασία που ακολουθήθηκε, συλλέχτηκαν 180 κλάσματα, στα οποία πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 280 nm, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των πρωτεϊνών, όπου και από τις μετρήσεις που προέκυψαν, παρουσιάζεται το πιο κάτω χρωματογράφημα.



*Σχήμα 16: Διάγραμμα απορρόφησης των κλασμάτων που προέκυψαν από τη στήλη DEAE κυτταρίνης*

Η καμπύλη, είναι συνάρτηση της απορρόφησης των κλασμάτων στον άξονα Υ και του αριθμού των κλασμάτων στον άξονα των Χ.

- Σ' αυτό το σημείο, είναι σημαντικό να ξεχωρίσουμε, ποια κλάσματα περιέχουν τη φωσφορυλάση της πατάτας και τα οποία στη συνέχεια, θα είναι εκείνα τα οποία θα επιλεγούν, για να προχωρήσουμε στη 2<sup>η</sup> στήλη χρωματογραφίας.

- Η επιλογή, πραγματοποιείται με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμίδης, κλασμάτων, που αντιστοιχούν σε διαφορετικά σημεία της παραπάνω καμπύλης, έτσι ώστε, να διαπιστώσουμε σε ποιά εκ των οποίων, εμφανίζεται το ζητούμενο ένζυμο.

Διαδρομή	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----



*Σχήμα 17: Πηκτή ακρυλαμίδης με κλάσματα από την 1<sup>η</sup> στήλη DEAE κυτταρίνης, για την επιλογή όσων περιέχουν τη φωσφορυλάση της πατάτας. Στις διαδρομές 1(μάρτυρας), 2(κλάσμα 28),3(45),4(58),5(.73),6(.81),7(.89),8(97),9(105), 10(17), βρίσκονται κλάσματα που αντιπροσωπεύουν διαφορετικά σημεία του χρωματογραφήματος.*

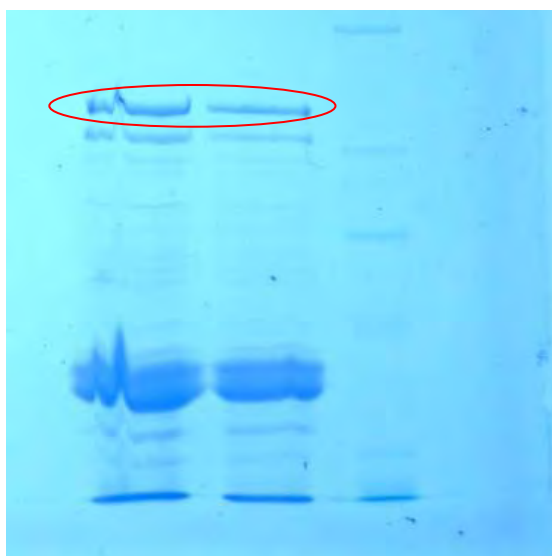
Στις διαδρομές 2 έως και 10 υπάρχουν κλάσματα από διάφορα σημεία της καμπύλης. Η φωσφορυλάση της πατάτας, βρίσκεται στις διαδρομές 2, 3 και 4 όπως διαπιστώνεται και στο παραπάνω σχήμα 17. Τα κλάσματα (27 έως και το 60), θα αποτελέσουν το επόμενο δείγμα μας, το οποίο θα εφαρμόσουμε στην δεύτερη πια στήλη Sephadex a-50, έτσι ώστε να επιτευχθεί περεταίρω καθαρισμός, του ενζύμου μας.

Πριν φορτώσουμε το δείγμα μας, το τρέχουμε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης, για να διαπιστώσουμε, πόσο «καθαρό» είναι το ένζυμό μας. Ακολουθεί η εικόνα, με την πηκτή ακρυλαμίδης

Διαδρομή

1

2



*Σχήμα 18: Πηκτή ακρυλαμίδης με δείγμα (πριν φορτωθεί στη 2<sup>η</sup> στήλη Sephadex) σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης*

..

Στη διαδρομή 1 και 2, βρίσκεται το δείγμα μας σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και είναι αυτό το οποίο θα εφαρμόσουμε στη 2<sup>η</sup> στήλη. Στο κόκκινο πλαίσιο φαίνεται η ζώνη της φωσφορυλάσης της πατάτας.

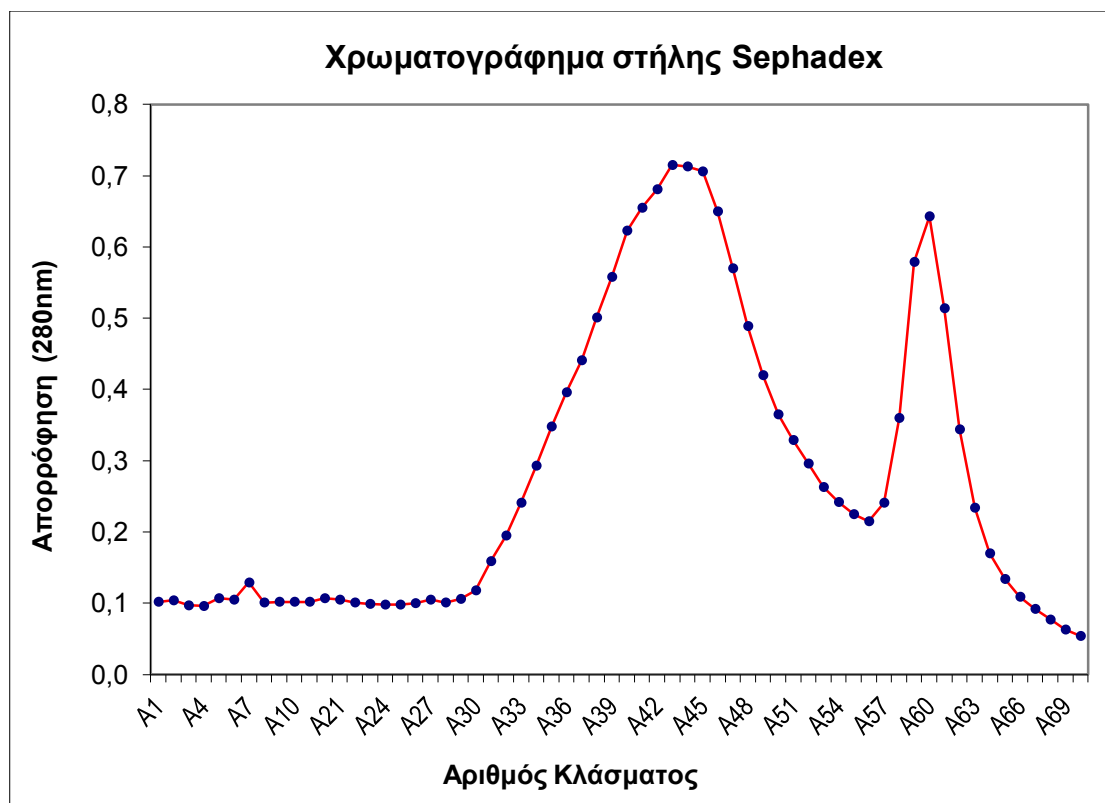
- Τα κλάσματα, στα οποία υπάρχει η φωσφορυλάση της πατάτας, με βάση την ηλεκτροφορητική εικόνα, συγκεντρώνονται με τελικό όγκο δείγματος 400ml.

- Στη συνέχεια, το δείγμα μας υφίσταται διαπίδυση (σε μεμβράνη διαπίδυσης), έναντι 25 mM Tris- HCl-0.1M NaCl ρυθμιστικού δ/τος. ( Η διαδικασία πραγματοποιείται τη διάρκεια της νύχτας, έτσι ώστε να μπορέσει να μεταφερθεί το δείγμα μας στο Tris- HCl - NaCl που είναι το ρυθμιστικό δ/μα που θα χρησιμοποιήσουμε στη δεύτερη στήλη Sephadex a-50).

- Την επόμενη ημέρα η ρητίνη αναμιγνύεται με το δείγμα υπό ανάδευση για δύο ώρες, έτσι ώστε, να δέσει η πρωτεΐνη μας επάνω στη ρητίνη.

- Η ρητίνη διηθείται σε φιάλη κενού με Buchner, έτσι ώστε να φύγει το ρυθμιστικό δ/μα στο οποίο υπήρχε το δείγμα μας, μαζί με πρωτεΐνες που τυχόν δε συνδέθηκαν στη στήλη.
- Η στήλη, εκπλένεται με 3 όγκους στήλης 25 mM Tris- HCl -0,2M NaCl ρυθμιστικού δ/τος, με τη βοήθεια του Buchner σε φιάλης κενού .
- Στη συνέχεια η ρητίνη (όπου είναι “δεμένη” η πρωτεΐνη μας), πακετάρεται στη στήλη χρωματογραφίας, σε ρυθμιστικό δ/μα 25 mM Tris- HCl ,το οποίο περιέχει 0,2M NaCl. Αυτό γιατί, από προηγούμενα πειράματα, είδαμε ότι η ρητίνη συρρικνώνεται και για να αποφευχθεί αυτή η μεγάλη συρρίκνωση, η οποία δημιουργεί προβλήματα κατά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών, διαπιστώθηκε, ότι με την ποσότητα 0,2M NaCl, έγινε ικανή, η αποφυγή μεγαλύτερης συρρίκνωσης της ρητίνης.
- Η στήλη, εκλούεται με ένα γραμμικής βαθμίδωσης δ/μα, από 0,2 έως 0,7 M NaCl, σε ένα σύνολο των 1 λίτρου 25 mM Tris- HCl ρυθμιστικού δ/τος, (με ταχύτητα ροής περίπου του 1ml /min). Η ρητίνη, συρρικνώνεται περίπου στο μισό, κατά την έκλουση. Ωστόσο, κάτω από αυτές τις συνθήκες, έρχονται ικανοποιητικά αποτελέσματα, εάν η στήλη εξισορροπηθεί με 25 mM Tris- HCl ρυθμιστικού δ/τος, το οποίο περιέχει 0.1 N NaCl, για να αποφευχθεί μεγαλύτερη συρρίκνωση της ρητίνης.
- Συλλέγονται κλάσματα των 10 ml, με ταχύτητα ροής των περίπου του 1 ml/min.
- Στα κλάσματα που παίρνουμε από την έκλουση της 2<sup>ης</sup> στήλης (Sephadex a-50), πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 280 nm και από τις μετρήσεις που προκύπτουν, δημιουργείται το πιο κάτω διάγραμμα, όπου εμφανίζονται δύο κορυφές. Η πρώτη κορυφή, παρουσιάζεται με μεγαλύτερη διαπλάτυνση, ενώ η δεύτερη, με μικρότερο πλάτος.

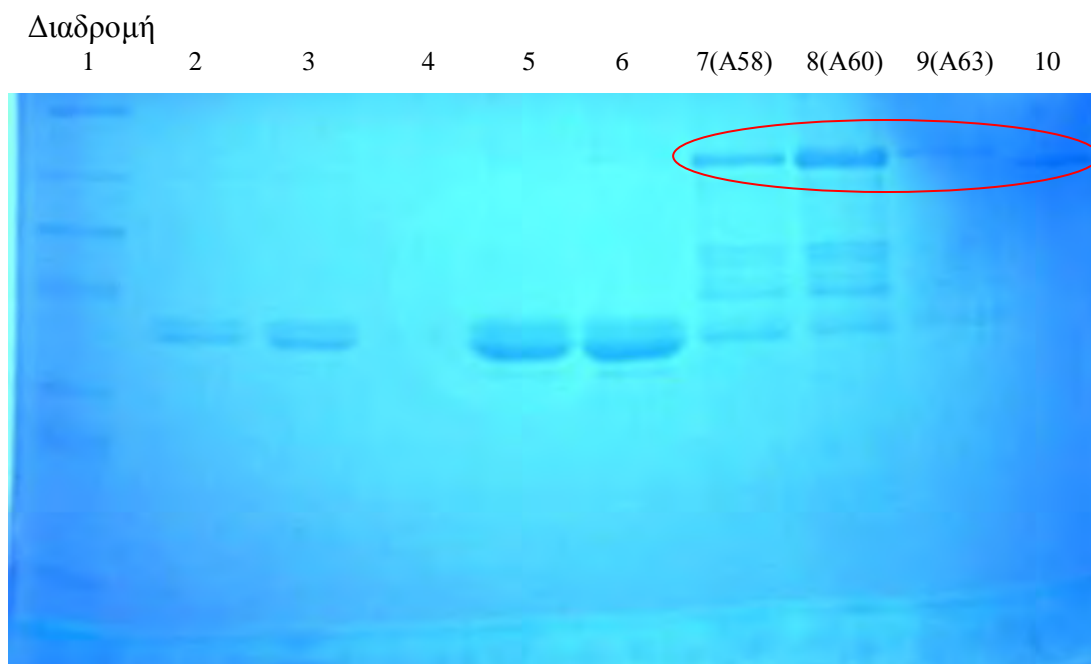
Στο παρακάτω διάγραμμα, το χρωματογράφημα, είναι συνάρτηση της απορρόφησης των κλασμάτων στον άξονα Y και του αριθμού των κλασμάτων στον άξονα των X.



Σχήμα 19.: Διάγραμμα απορρόφησης των κλασμάτων που προέκυψαν από τη 2<sup>η</sup> στήλη (Sephadex)

- Σ αυτό το σημείο, είναι σημαντικό να ξεχωρίσουμε, ποια κλάσματα περιέχουν τη φωσφορυλάση της πατάτας και τα οποία στη συνέχεια, θα είναι εκείνα τα οποία θα επιλεγούν, για να προχωρήσουμε στον χαρακτηρισμό του ενζύμου.

- Η επιλογή, πραγματοποιείται με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης των κλασμάτων (A7, A32, A41, A44, A55, A58, A60, A63), σε πηκτή ακρυλαμίδης, έτσι ώστε, να διαπιστώσουμε σε ποιά εκ των οποίων, εμφανίζεται το ζητούμενο ένζυμο. Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, όπως διαπιστώνεται και στην πιο κάτω εικόνα, επιλέγονται τα κλάσματα (A58 έως και το A64) της 2<sup>ης</sup> κορυφής.



Σχήμα 20: Πηκτή ακρυλαμίδης με κλάσματα από τη 2<sup>η</sup> στήλη, για την επιλογή όσων περιέχουν τη φωσφορυλάση της πατάτας. Στις διαδρομές υπάρχουν, 1(μάρτυρας), 2(κλάσμα A7), 3(A32), 4(A41), 5(A44), 6(A55), 7(A58), 8(A60), 9(A63). Στις διαδρομές 7(κλασμ. A58), 8(A60) και 9(A63) βρίσκονται τα κλάσματα, όπου υπάρχει η φωσφορυλάση της πατάτας.

Από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, όπως διαπιστώνεται και στην πιο πάνω εικόνα, επιλέγονται τα κλάσματα (A58 έως και το A64) της 2ης κορυφής.

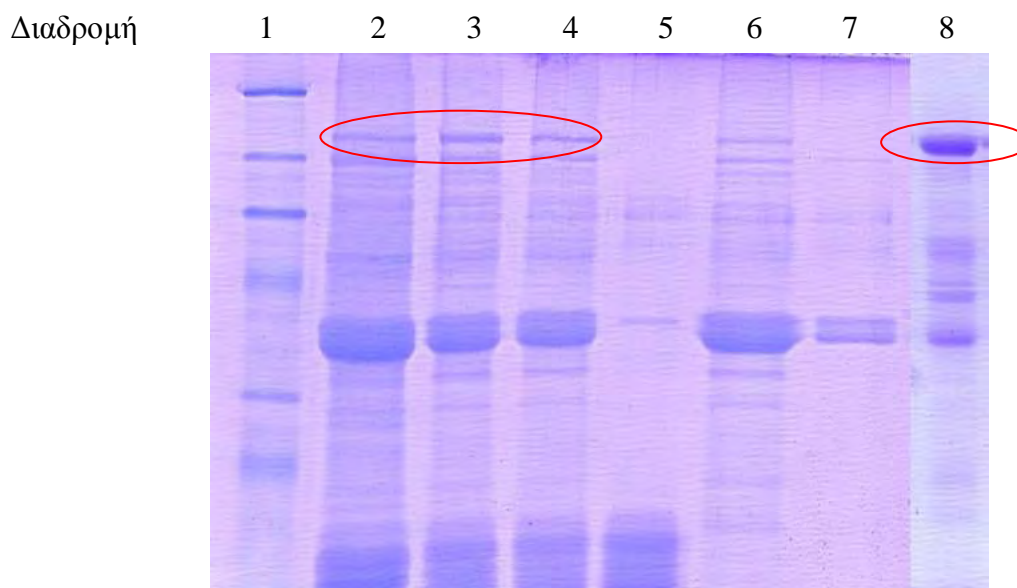
- Τα κλάσματα που επιλέχθηκαν, όγκου(70ml), συγκεντρώνονται και συμπυκνώνονται σε 3,5 ml, με φίλτρακια κατώφλι M.B 100000, με υπερδιήθηση (όπου η φυγόκεντρος ρυθμίζεται στις 3000 στροφές/λεπτό). Σημαντικό είναι σ' αυτή τη φάση, να γίνει και ξέπλυμα του NaCl, με δ/μα 5 mM Tris- HCl, έτσι ώστε, να μην επηρεαστεί το ένζυμό μας από το πυκνό άλας.

- Από το συμπυκνωμένο δείγμα των 3,5 ml, που προέκυψε από όλη τη διαδικασία που ακολουθήθηκε, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης, για να διαπιστωθεί ο βαθμός καθαρισμού του ενζύμου.

- Το δείγμα 3,5 ml ,χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τον χαρακτηρισμό της φωσφορυλάσης της πατάτας..

- Το καθαρό δ/μα του ενζύμου, μπορεί να κρατηθεί στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , σε ρυθμιστικό δ/μα 25 mM Tris- HCl, το οποίο περιέχει γλυκερόλη.

Κατά τη διαδικασία που ακολουθήθηκε, για τον καθαρισμό της φωσφορυλάσης της πατάτας, παρουσιάζεται η σταδιακή απομάκρυνση των πρωτεϊνών, στην παρακάτω εικόνα. Στην πηκτή ακρυλαμίδης, υπάρχουν δείγματα πατάτας, από διάφορα στάδια του καθαρισμού, στις διαδρομές 2 έως 8.



*Σχήμα 21: Πηκτή ακρυλαμίδης, δείγματα πατάτας σε διαφορετικά στάδια του καθαρισμού της φωσφορυλάσης της πατάτας.*

Η φωσφορυλάση της πατάτας, ξεχωρίζει στο επάνω μέρος της εικόνας, εντός του κόκκινου πλαισίου. Στη διαδρομή 1 (μάρτυρας), 2(δείγμα πατάτας όπου  $\text{pH}=7,2$ , μετά τους  $55^{\circ}\text{C}$  και εφόσον έχει πέσει η θερμοκρασία, στους  $0^{\circ}\text{C}$ ), 3(το ίζημα που παίρνουμε μετά την προσθήκη αιθανόλης και το οποίο έχει διαλυθεί σε ρυθμιστικό δ/μα κιτρικού Na), 4(υπερκεείμενο, μετά τη 2<sup>η</sup> φυγοκέντρηση, δηλ. το δείγμα που φορτώθηκε στην 1<sup>η</sup> στήλη), 5(flow through από την 1<sup>η</sup> στήλη), 6(το δείγμα πατάτας, το οποίο φορτώθηκε στη 2<sup>η</sup> στήλη), 7(wash από τη 2<sup>η</sup> στήλη), 8(δείγμα το οποίο πήραμε από τη 2<sup>η</sup> στήλη, συμπυκνωμένο).

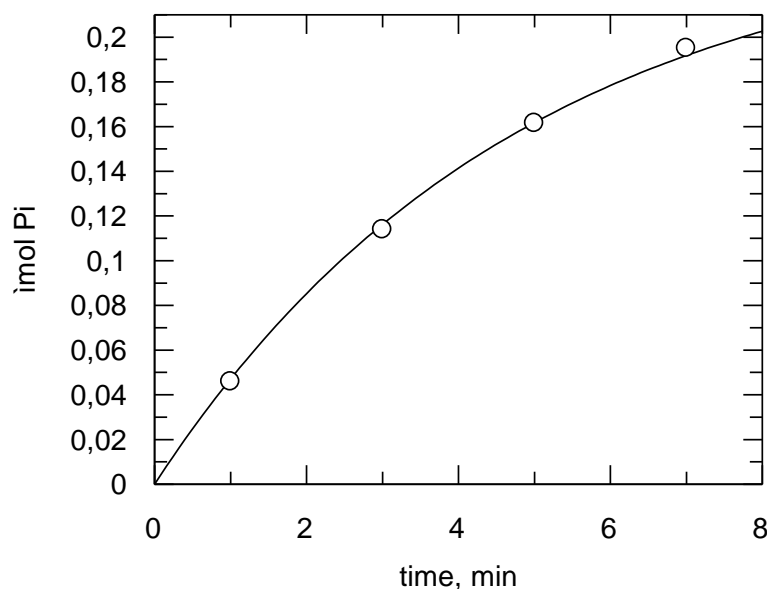
Το δείγμα το οποίο παρουσιάζεται στην τελευταία διαδρομή είναι το τελικό μας, αυτό που χρησιμοποιήθηκε παρακάτω, για το χαρακτηρισμό του ενζύμου φωσφορυλάση της πατάτας. Από τη διαδικασία που ακολουθήθηκε, δεν επετεύχθη ο



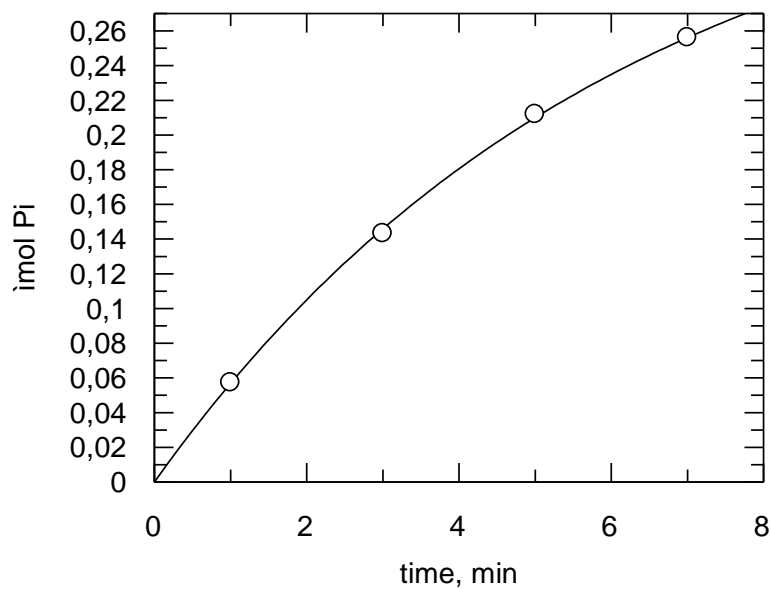
μέγιστος δυνατός καθαρισμός του ενζύμου, αλλά είναι σημαντικό ότι πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός του διαλύματος και απομακρύνθηκαν σε μεγάλο βαθμό οι άλλες ζώνες των πρωτεϊνών (δείγμα στη διαδρομή 10), σε σχέση με τα αρχικά δείγμα (διαδρομές 2, 3 και 4).

## 10.2 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων φωσφορυλάσης της πατάτας

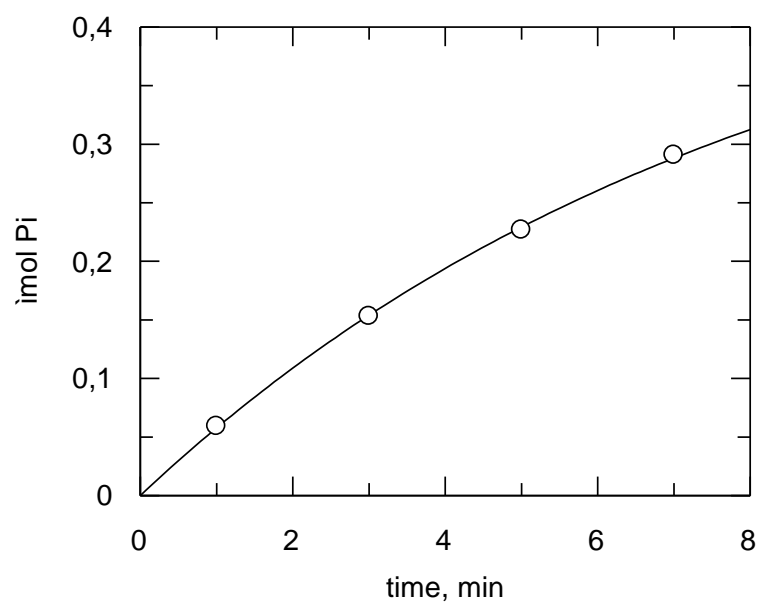
Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μετά από τον προσδιορισμό φωσφόρου στα δείγματα του κινητικού πειράματος, επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Grafit [Leatherbarrow, 1990] Από την απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 850 nm και καταγραφή των τιμών, προκύπτουν τα ακόλουθα διαγράμματα, τα οποία αντιστοιχούν σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις της G1P. Οι απορροφήσεις των δειγμάτων, διορθώνονται με την αφαίρεση των τυφλών της G1P (για την κάθε συγκέντρωση) και του αμύλου, ενώ από την απορρόφηση του τυφλού του πρότυπου διαλύματος φωσφορικών, προκύπτει η απορρόφηση του 1μmol φωσφορικών, οπότε όλες οι απορροφήσεις ανάγονται σε μmol φωσφορικών.



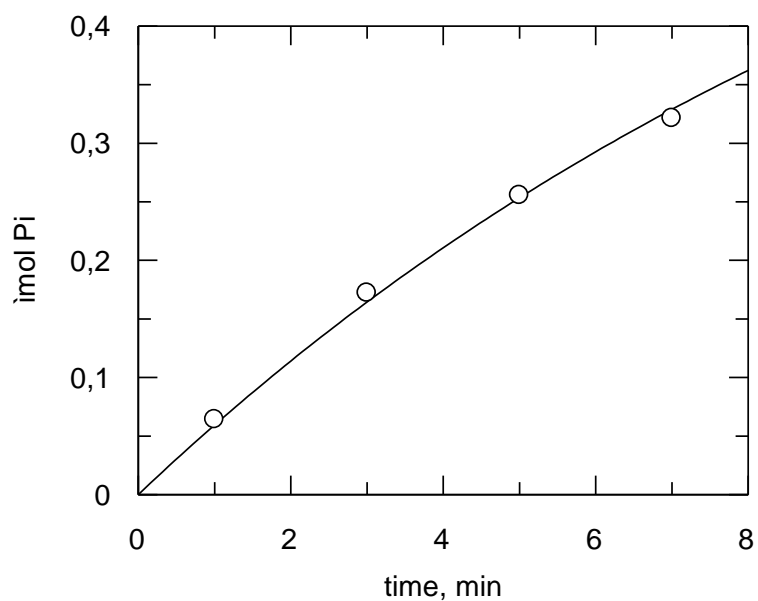
Σχήμα 22: Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος (1.6mM G1P) ως προς το χρόνο.



Σχήμα 23: Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος (2.4 mM GIP) ως προς το χρόνο.

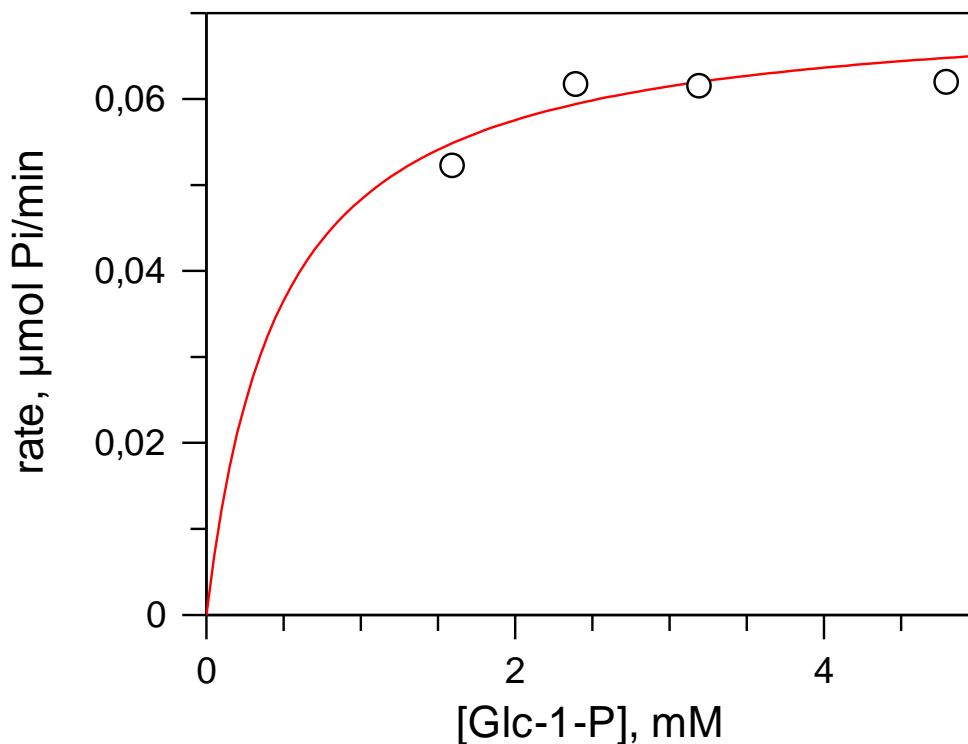


Σχήμα 24: Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος (3.2 mM GIP) ως προς το χρόνο.



Σχήμα 25: Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει τη συγκέντρωση του υποστρώματος (4.8 mM GIP) ως προς το χρόνο.

Από κάθε ένα από τα παραπάνω διαγράμματα προσδιορίστηκε η αρχική ταχύτητα και με τη βοήθεια των οποίων προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα Michaelis- Menten όπου και προσδιορίστηκε εν συνεχεία η  $K_m$  και η  $V_{max}$ .



Parameter	Value	Std. Error
Vmax	0,0712	0,0068
Km	0,4743	0,2873

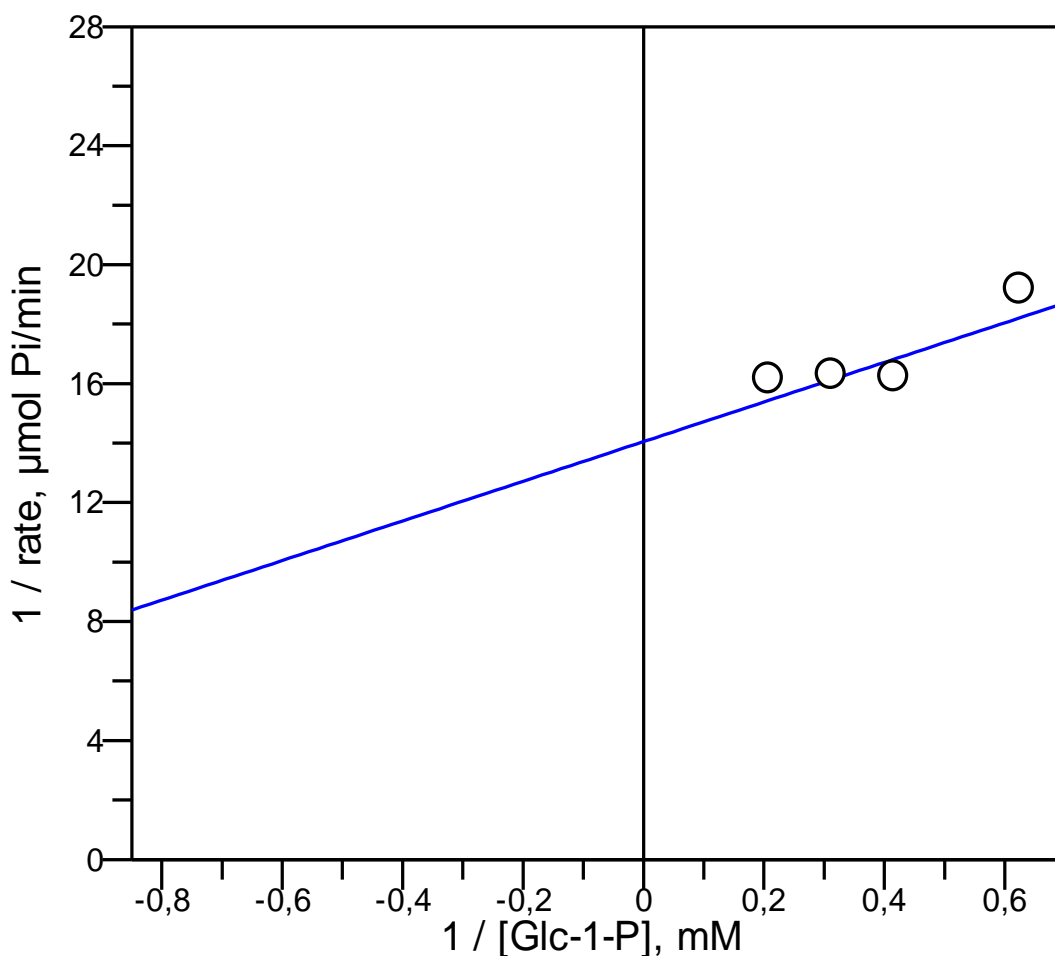
Σχήμα 26 : Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης της πατάτας, σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος της 1-φωσφορικής γλυκόζης (1.6, 2.4, 3.2, 4.8 mM).

Το διάγραμμα (υπερβολή), παρουσιάζει την ταχύτητα (  $\mu\text{mol}$  φωσφορικών /  $\text{min}\cdot\text{mg}$  ενζύμου) ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος (G-I-P).

Από το παραπάνω διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης της πατάτας, προκύπτει ότι τα χαρακτηριστικά του ενζύμου, βρέθηκαν να είναι :

$$K_m=0,4743 \pm 0,2873 \text{ mM και } V_{max}=0,0712 \pm 0,0068 \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$$

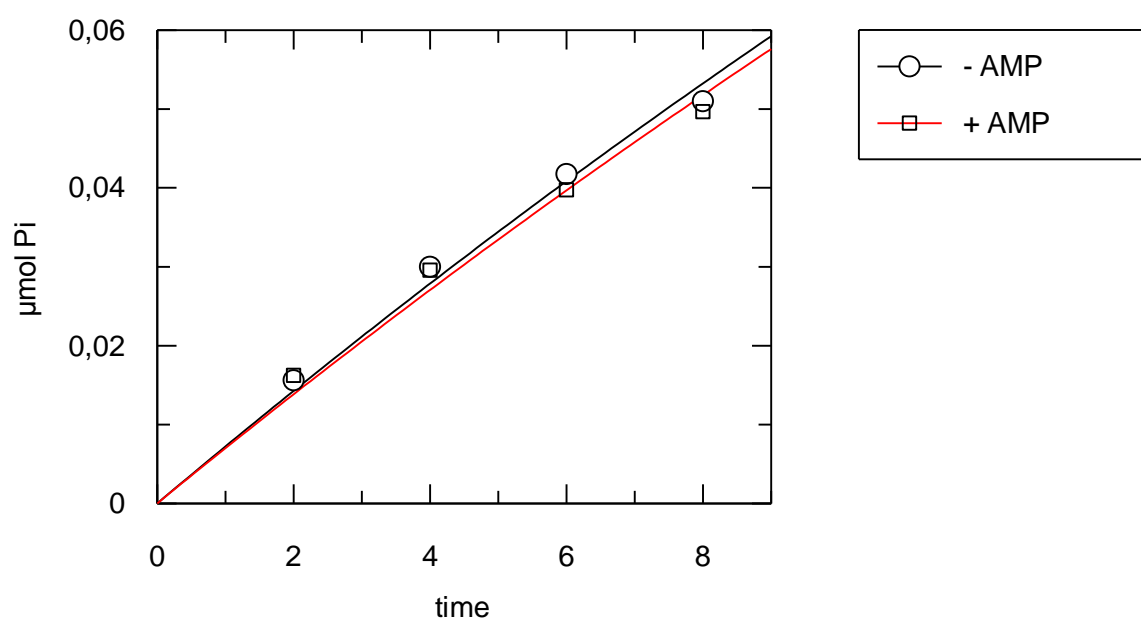
Επειδή, δεν είναι πάντοτε δυνατό να καθοριστεί, τότε επιτυγχάνεται η  $V_{\max}$ , γιατί η καμπύλη σχήματος υπερβολής, έχει βαθμιαία ανοδική κλίση σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, οπότε αν παρασταθεί γραφικά η  $1/v_0$  ως προς την  $1/[S]$ , τότε λαμβάνεται ευθεία γραμμή (Lineweaver-Burke). Το διάγραμμα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της  $K_m$  και της  $V_{\max}$ .



Σχήμα 27 : Διάγραμμα Lineweaver-Burke (ή διαφορετικά διάγραμμα διπλού αντιστρόφου)

### 10.3 Κινητική δοκιμή του ενζύμου με AMP

Τα αποτελέσματα της κινητικής δοκιμής του ενζύμου με AMP, έδειξαν ότι η φωσφορυλάση της πατάτας, έχει την ίδια δραστηριότητα τόσο με την παρουσία του AMP, όσο και με την απουσία του AMP. Η φωσφορυλάση της πατάτας, δεν επηρεάζεται από το νουκλεοτίδιο AMP και δείχνει φυσιολογική Michaelis-Menten κινητική. Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται σχηματικά η δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία και απουσία AMP.



Σχήμα 28: Η συγκέντρωση φωσφορικών σε σχέση με το χρόνο, παρουσία και απουσία AMP

## 11. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η φωσφορυλάση της πατάτας, αποτελεί ένα ένζυμο το οποίο, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ώστε να μελετηθεί, τόσο βιοχημικά όσο και δομικά, με σκοπό να διαπιστωθεί ποιός ο ρόλος της επιπλέον περιοχής (επικράτειας), η οποία παρουσιάζεται, σε σχέση με τη μυϊκή του κουνελιού. Σημειωτέον ότι, η επιπλέον επικράτεια, είναι προφανώς και η αιτία, της διαφορετικής συμπεριφοράς της φωσφορυλάση της πατάτας, συγκρινόμενη πάντα με αυτή της μυϊκής του κουνελιού . Η μελέτη της επικράτειας, μέσω κρυσταλλογραφικών μελετών, θα μας οδηγήσει ώστε να εξάγουμε διάφορα συμπεράσματα, για το πώς επηρεάζει η επιπλέον αυτή περιοχή του ενζύμου, τη συμπεριφορά του.

Αρχικός στόχος στο παρόν πείραμα, ήταν να πραγματοποιηθεί καθαρισμός της φωσφορυλάσης από βολβούς πατάτας. Έπειτα από πολλές δοκιμές, στις οποίες χρησιμοποιήσαμε πολλές τεχνικές, τελικά καταλήξαμε σε ένα πρωτόκολλο. Το πρωτόκολλο συμπεριλαμβάνει, κλασματική καταβύθιση του ενζύμου, παρουσία αμύλου και στη συνέχεια, εφαρμογή χρωματογραφία ιονανταλλαγής (ανιοανταλλαγή) και συγκεκριμένα τη στήλη DEAE κυτταρίνης και τη Sephadex a-50. Με βάση το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε, πραγματοποιήθηκε σημαντικός εμπλουτισμός του ενζύμου, σε σχέση με το αρχικό μας παρασκεύασμα, στο οποίο το ένζυμο ήταν σε πολύ μικρή συγκέντρωση. Δε κατέστη όμως δυνατό, να απομακρυνθούν πλήρως, οι πρωτεΐνες του τελικού παρασκευάσματος, έτσι ώστε να επιτευχθεί και ο πλήρης καθαρισμός του ενζύμου. Ως συνέχεια του προαναφερόμενου πειράματος, θα ακολουθήσει η προσπάθεια εφαρμογής διαφορετικών στηλών χρωματογραφίας και πιθανών, κρυστάλλωσης του ενζύμου, έτσι ώστε να επιτευχθεί, ο πλήρης καθαρισμός του ενζύμου της φωσφορυλάσης της πατάτας.

Στη δεύτερη φάση του παρόντος πειράματος, πραγματοποιήθηκε ένας πρώτος χαρακτηρισμός του ενζύμου, χρησιμοποιώντας το φυσικό του υπόστρωμα, το άμυλο. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της σταθεράς  $K_m$ , έδειξαν ότι η τιμή της ήταν πολύ υψηλή, πράγμα που φανερώνει, ότι το ένζυμό μας ήταν πολύ δραστικό και ότι επίσης, υπάρχει υψηλή συγγένεια μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματός του. Επιπλέον επιβεβαιώθηκε, ότι η συμπεριφορά της φωσφορυλάσης της πατάτας, είναι διαφορετική από τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού, παρόλο ότι υπάρχει υψηλή

ομολογία μεταξύ των δύο ενζύμων. Το ένζυμό μας δεν εμφανίζει αλλοστερική ρύθμιση, καθώς επίσης, δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη των νουκλεοτιδίων. Γι αυτό το λόγο, είναι πολύ σημαντικό, να διερευνηθεί αυτή η διαφορετική συμπεριφορά, η οποία πιστεύουμε ότι οφείλεται, στην παρουσία της επιπλέον επικράτειας(78 κατάλοιπα). Ένας τρόπος για να διερευνηθεί η επικράτεια, αποτελεί η κρυστάλλωση, με τη βοήθεια της οποίας, θα διευκρινιστεί η δομή της πρωτεΐνης. Με βάση τη δομή της πρωτεΐνης, θα αποκομίσουμε τις απαραίτητες πληροφορίες, για το πώς αλληλεπιδρά η επιπλέον επικράτεια, με τα διάφορα κέντρα του ενζύμου.



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### Ελληνική

Γεωργάτσου Ι. Γ. (1989). Βιοχημεία, Τόμος Α, Έκδοση 6<sup>η</sup>, Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη ΟΕ, Θεσσαλονίκη.

Οικονομάκος Ν. Γ. (1977). Χημική τροποποίηση ενός αλλοστερικού ενζύμου, Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ.

Παπαϊωάννου Ι., (2004), Σημειώσεις Χημείας Στερεάς Καταστάσεως, Αθήνα.

Stryer, 1997 L., (1997), Βιοχημεία, Τόμος Ι, Έκδοση 2<sup>η</sup>, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.

Τσιτσάνου Α., (2001), Διδακτορική διατριβή, Σχεδιασμός αναστολέων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα: Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες.

### Διεθνή

Appleman, M. M., Yunis, A. A., Krebs, E. G., and Fischer, E. H., (1963), Comparative studies on glycogen phosphorylase. V. The amino acid composition of rabbit and human skeletal muscle phosphorylase, J. Biol. Chem., 238, 1358

Baranowski, T., Illingworth, B., Brown, D. H., and Cort, C.F., (1957), The isolation of pyridoxal-5-phosphate from crystalline muscle phosphorylase. Biochim. Biophys. Acta, 25, 16.

Barford D., Hu S. H. & Johnson L. N. (1989), The allosteric transition of glycogen phosphorylase, *Nature* 340, 609-616.

Bollen M. & Stalmans W., 1992, The structure, role and regulation of type-1 protein phosphatases. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biology, 27, 227-281.

Brad R. Henke and Steven M. Sparks, (2006), Glycogen Phosphorylase Inhibitors, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 6, 845-857.

Cleland, W. W., Biochim. Biophys. Acta, (1963), The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. 67, 104

Cohen, P., Saari, J.C., and Fischer, E.H. (1973), Comparative study of dogfish and rabbit muscle phosphorylases, Biochemistry 12, 5233-5241

Cori C. F. & Cori G. T., (1936), Mechanism of formation of hexosemonophosphate in muscle and isolation of a new ester, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 34, 702-705.

Dayhoff, M.O. (ed) (1972) Atlas of Protein Sequence and Structure vol. 5, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.

Fischer, E. H. & Krebs, E. G., (1962), Muscle Phosphorylase B. In Methods of Enzymology, (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O., eds.), Vol. 5, pp. 369-373, Academic Press, San Diego.

Fletcher R. J. & Madsen N. B., (1980), The structures and related functions of phosphorylase  $\alpha$ , Annu. Rev. Biochem., 49, 31-61.

Fukui, T. (1983) in The New Frontiers in Plant Biochemistry (Akazawa, T., Asahi, T., and Imaseki, H., eds) pp. 71-82, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

Fukui, T., Kamogawa, A., and Nikuni, Z., (1970), Reaction of glyoxal with alpha-glucan phosphorylases from potato and rabbit muscle. J. Biochem, (Tokyo), 67, 211.

Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, Biochemistry, 5<sup>th</sup> edition, chapter 21, pp. 865-897.

Gold, A. M., Johnson, R. M., and Sanchez, G. R., (1971), Kinetic mechanism of potato phosphorylase ., J. Biol. Chem., 246(11): 3444-3450.

Gold, A. M., Johnson, R. M., and Tseng, J. K., (1970), Kinetic mechanism of rabbit muscle glycogen phosphorylase a. J. Biol. Chem., 245, 2564.

Graves,D.J., and, J.H. (1972) in The Enzymes (Boyer.P.D.,ed) 3rd Ed, Vol.7,pp.435-482, Academic Press, New York.

Helliwell J. R., (2005), Protein crystal perfection and its application, Acta Crystallogr., D, Biol. Crystallogr., D61, 793-798.

Hughes, R.C., Yunis, A.A., Krebs, E.G., and Fischer, E.H.(1962) J.Biol. Chem. 237,40-43

Johnson L. N. & Hajdu J., 1989, Synchrotron studies on enzyme catalysis in crystals, Biophysics & Synchrotron Radiation, Hasnain S. ed, 142-155, Ellis Horwood, Chichester.

Kamogava A., Fukui T.and Nikuni Z.,(1967), Potato a-Glucan: crystallization, amino acid composition and enzymatic reaction in Absence of added primer, J. Biochem, 63(3):361-369

Kastenschmidt L. I., Kastenschmidt J. & Helmreich E., (1968), The effect of temperature on the allosteric transition of glycogen phosphorylase b, Biochemistry, 7, 3590-3608.

Leatherbarrow R.J, (1990), Use of nonlinear regression to analyze enzyme kinetic data: application to situations of substrate contamination and background subtraction, J. Biochim, 184(2):274-8.

Lee, Y. P., (1960), Potato phosphorylase. II. Phosphate and sulfhydryl groups,J. Biochim. Biophys. Acta, 43,25.

Lee,Y.P., (1960), Potato phosphorylase. I. Purification, physicochemical properties and catalytic activity ,J. Biochim.Biophys. Acta, 43, 18 .

Madsen N. B., Kasvinsky P. J. & Fletterick R. J., (1978), Allosteric transitions of phosphorylase  $\alpha$  and the regulation of glycogen metabolism, J. Biol. Chem., 253, 9097-9101.

Martin J. L., Johnson L. N. & Withers S. G.,(1990), Comparison of the binding of glucose and glucose-1-phosphate derivatives to T state glycogen phosphorylase b, Biochemistry, 29, 10745-10757.

McLaughlin, P.J., Stuart, D.I., Klein, H.W., Oikonomakos, N.G., and Johnson, L.N. (1984). Substrate-cofactor interactions for glycogen phosphorylase b: a binding study in the crystal with heptenitol and heptulose-2-P. Biochemistry 23, 5862-5873.

Melpidou A. E. & Oikonomakos N. G.,( 1983), Effects of glucose-6-P on the catalic and structural properties of glycogen phosphorylase  $\alpha$ , FEBS Lett., 154, 105-110.

Monod J., Changeux J-P. & Jacob F., (1963), Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, J. Mol. Biol., 6, 306-329.

Monod J., Wyman J. & Changeux J-P., (1965), On the nature of allosteric transitions: a plausible model, J. Mol. Biol., 12, 88-118.

Nacano K., Fukui T.,(1980), Structural for the difference of regulatory properties between potato and rabbit muscle phosphorylase, J .Biological Chemistry, 255(19):9255-9261.

Nacano K., Fukui T.,(1985), The complete amino acid sequence of potato  $\alpha$ -Glucan, J. Biological Chemistry, 261(18):8230-8236

Oikonomakos N. G., Acharya K. R. & Johnson L. N.,(1992), Post-Translational Modifications of Proteins, Harding J. J. & Crabbe M. J. C. eds, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 81-127.

Oikonomakos N. G., Johnson L. N., Acharya K. R., Stuart D. I., Barford D., Hajdu J., Varvill K. M., Melpidou A. E., Papageorgiou A. C., Graves D. & Palm D.,

(1987), Pyridoxal phosphate site in glycogen phosphorylase b: Structure in native enzyme and in three derivatives with modified cofactors, *Biochemistry*, 26, 8381-8389.

Oikonomakos, N.G. (2002). Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3: 561–586.

Oikonomakos, N.G., Kosmopoulou, M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Somsák L., Nagy, V., Praly, J.-P., Docsa, T., Tóth, B. and Gergely, P. (2002). The binding of N'-acetyl- and Benzoyl-N'-β-D-glucopyranosyl ureas to glycogen phosphorylase b: Kinetic and crystallographic studies. *Eur. J. Biochem.* 269, 1684-1696.

Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G. and Johnson, L.N. (2000b). A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure* 8, 575-584.

Pinotsis, N., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Oikonomakos, N.G. and Mavridis, I.M. (2003). The binding of β- and γ-cyclodextrin to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Protein Sci.* 12, 1914-1924.

Saheki, S., Takeda, A. & Shimazu, T., (1985), Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity, *Anal. Biochem.*, 148, 277-281.

Schachtele, K.-H., Schiltz, E., and Palm, D. (1978), Amino-acid sequence of the pyridoxal-phosphate-binding site in *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase *Eur. J. Biochem.* 92,427-435

Schwartz, M., and Hofnung, M. (1967), Maltodextrin phosphorylase of *Escherichia coli* *Eur. J. Biochem.* 2, 132-145.

Seery, V. L., Fischer, E. H., and Teller, D. C., (1967),. A reinvestigation of the molecular weight of glycogen phosphorylase, *Biochemistry* 6, 3315 .

Segel, L.H., (1975), *Enzyme kinetics*, J.Wiley interscience, New York.

Sevilla, C. L., and Fischer, E. H. (1969), The purification and properties of rat muscle glycogen phosphorylase, J, Biochemistry 8, 2161-2171

Shimomura, S., Nagai, M., and Fukui, T. (1982), Comparative glucan specificities of two types of spinach leaf phosphorylase,. J. Biochem. (Tokyo) 91 , 703-717.

Sprang S. R., Goldsmith E. J., Fletterick R. J., Withers S. G. & Madsen N. B., (1982), Catalytic site of glycogen phosphorylase: Structure of the T state and specificity for  $\alpha$ -D-glucose, Biochemistry, 21, 5364-5371.

Sprang S. R., Goldsmith E. J., Fletterick R. J., Withers S. G. & Madsen N. B., (1982), Catalytic site of glycogen phosphorylase: Structure of the T state and specificity for  $\alpha$ -D-glucose, Biochemistry, 21, 5364-5371.

Titani, K., Cohen, P., Walsh, K.A., and Neurath, H.(1975), Amino-terminal sequence of rabbit muscle phosphorylase, J FEBS Lett. 55, 120-123

Wang,J. H., and Graves, D. J., (1964), The relationship of the dissociation to the catalytic activity of glycogen phosphorylase a., J. Biochemistry, 3, 1437.

Watson K. A., McCleverty C., Geremia S., Cottaz S., Driguez H., & Johnson L. N., (1999), Phosphorylase recognition and phosphorolysis of its oligosaccharide substrate: answers to a long outstanding question, The EMBO Journal, 18, 4619-4632.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

Πίνακας I: Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν

<i><b>Ουσία</b></i>	<i><b>Συντακτικός τύπος</b></i>	<i><b>Μοριακό βάρος</b></i>	<i><b>Εταιρία</b></i>
Μολυβδαινικό αμμώνιο	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1236.86 g/mol	MERCK
Οξικός ψευδάργυρος	$\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	219.49 g/mol	SIGMA
L (+) ασκορβικό οξύ	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	176.13 g/mol	MERCK
β-φωσφογλυκερόλη	$\text{C}_3\text{H}_7\text{Na}_2\text{O}_6\text{P} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	306.12 g/mol	MERCK
β-μερκαπτοαιθανόλη	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	78.3 g/mol	SERVA
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	372.5 g/mol	SERVA
Δις όξινο ανθρακικό κάλιο	$\text{KH}_2\text{CO}_3$	100.12 g/mol	MERCK
5'-φωσφορική αδενοσίνη, AMP		347.2 g/mol	MERCK
Διθειοθρεϊτόλη, DTT	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	154.25 g/mol	SIGMA
α-D-1-φωσφορική γλυκόζη, α-D-G-1-P	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_9\text{PNa}_2$	376.06 g/mol	SERVA
Χλωριούχο κάλιο	KCl	74.56 g/mol	SIGMA
Δις-οξινο-φωσφορικό κάλιο	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136.09 g/mol	FERAK BERLIN
Δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο, SDS	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	288.38 g/mol	SIGMA

## Πίνακας II: Συντμήσεις

AMP	5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
DTT	Διθειοτριόλη
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
Glc	$\alpha$ -D-γλυκόζη
Glc-1-P	$\alpha$ -D-1-φωσφορική γλυκόζη
GP	Φωσφορυλάση γλυκογόνου
GPb	Φωσφορυλάση γλυκογόνου b
$K_m$	Σταθερά Michaelis-Menten
$\text{NaN}_3$	Νατραζίδιο
Pi	Ορθοφωσφορικό ανιόν
PLP	5'φωσφορική πυριδοξάλη
SDS	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
Tris	Τρις(υδροξυ-μέθυλο)-αμινομεθάνιο
Vmax	Οριακή ταχύτητα ενζυμικής αντίδρασης