



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



## **ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΚΟΥΛΑΣ ΣΥΜΕΩΝ**



**ΛΑΡΙΣΑ 2019**

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ  
ΑΜΥΛΟΥ ΑΠΟ ΓΕΩΜΗΛΑ**

**BIOCHEMICAL STUDIES OF STARCH  
PHOSPHORYLASE FROM POTATO TUBERS**

# **ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΑΜΥΛΟΥ ΑΠΟ ΓΕΩΜΗΛΑ**

ΟΝΟΜΑ: ΣΥΜΕΩΝ ΚΟΥΛΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ : ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ : ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	7
Περίληψη.....	8
Abstract.....	9
Εισαγωγή .....	10
1. Μεταβολισμός του αμύλου.....	10
1.1 Χαρακτηρισμός του αμύλου.....	10
1.2 Μοριακή δομή του αμύλου.....	11
1.3 Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης του αμύλου .....	13
1.3.1 Σύνθεση της ADP-γλυκόζης, πρόδρομο μόριο της βιοσύνθεσης του αμύλου.....	13
1.3.2 Σχηματισμός των αλυσίδων γλυκάνης από τις συνθέσεις του αμύλου .....	14
1.3.3 Ένζυμο διακλάδωσης του αμύλου .....	15
1.3.4 Ένζυμο αποδιακλάδωσης του αμύλου .....	16
1.3.5 Ένζυμο D (Disproportionating enzyme) .....	16
1.3.6 Ένζυμο αποικοδόμησης του αμύλου .....	18
2. Φωσφορυλάση του αμύλου .....	18
2.1 Ισομορφές της φωσφορυλάσης του αμύλου.....	19
2.2 Φωσφορυλάση του αμύλου από γεώμηλο (Potato Starch Phosphorylase, PSP) .....	20
2.2.1 Πρωτεολυτική αποικοδόμηση της PSP .....	21
2.2.2 Συσχέτιση της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης της PSP με τα αναπτυξιακά στάδια .....	22
2.2.3 Διαμερισματοποίηση της PSP .....	23
2.2.4 Σύγκριση της φωσφορυλάσης του αμύλου από γεώμηλα (PSP) και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από μύες κονίκλων ( gmGP) .....	24
2.2.5 Προέλευση της PSP .....	27
2.2.6 Ρύθμιση της δράσης της Φωσφορυλάσης του αμύλου (SP).....	28
2.2.6 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές της φωσφορυλάσης του αμύλου (SP).....	29
3. Κρυσταλλογραφία .....	29
3.1 Τι είναι κρύσταλλος;.....	29
3.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων.....	30
4. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων .....	32
5. Υλικά και μέθοδοι .....	34
5.1 Αντιδραστήρια.....	34
5.2 Οργανολογία.....	35

5.3 Στήλες υγρής χρωματογραφίας .....	35
5.4 Υγρή χρωματογραφία –Σύστημα FPLC.....	35
5.4.1 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	36
5.4.2 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....	38
5.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών .....	40
5.5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE) 41	
5.5.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native PAGE).....	43
5.6 Χρώση πηκτώματος .....	44
5.7 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford.....	44
5.8 Απομόνωση της L-PSP από βολβούς πατάτας .....	45
5.9 Κρυστάλλωση της L-PSP.....	47
5.10 Κινητικές μελέτες έναντι της L-PSP .....	47
5.10.1 Περιγραφή και αρχή μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας .....	48
5.10.2 Έλεγχος για την εύρεση του βέλτιστου pH .....	49
5.10.3 Έλεγχος για εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας.....	50
5.10.4 Προσδιορισμός της $K_m$ .....	51
5.10.5 Έλεγχος για την επίδραση της AMP .....	52
5.10.5 Ανάλυση των κινητικών δεδομένων.....	52
6. Αποτελέσματα .....	53
6.1 Καθαρισμός και απομόνωση της L-PSP .....	53
6.2 Κρυστάλλωση της L-PSP.....	57
6.3 Κινητικές Μελέτες .....	58
6.3.1 Έλεγχος για εύρεση του βέλτιστου pH .....	58
6.3.2 Έλεγχος για εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας .....	58
6.3.3 Προσδιορισμός της $K_m$ .....	59
6.3.3 Επίδραση της AMP.....	59
7. Συζήτηση.....	60
Βιβλιογραφία .....	61

## Περιεχόμενα Εικόνων και Πινάκων

Εικόνα 1 .....	11
Εικόνα 2 .....	12
Εικόνα 3 .....	13
Εικόνα 4 .....	15
Εικόνα 5 .....	17
Εικόνα 6 .....	19
Εικόνα 7 .....	23
Εικόνα 8 .....	24
Εικόνα 9 .....	24
Εικόνα 10 .....	26
Εικόνα 11 .....	28
Εικόνα 12 .....	31
Εικόνα 13 .....	33
Εικόνα 14 .....	38
Εικόνα 15 .....	39
Πίνακας 1 .....	42
Πίνακας 2 .....	43
Εικόνα 16 .....	54
Εικόνα 17 .....	54
Εικόνα 18 .....	55
Εικόνα 19 .....	55
Εικόνα 20 .....	56
Εικόνα 21 .....	56
Εικόνα 22 .....	57
Εικόνα 23 .....	57
Εικόνα 24 και 25 .....	58
Εικόνα 26 .....	58
Εικόνα 27 .....	59
Εικόνα 28 .....	59

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Οκτώβριο του 2017 έως το Φεβρουάριο του 2019, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή Βιοχημείας του ΤΒΒ, Δρ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του. Η καθοδήγηση, η ενθάρρυνση και η βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας ήταν καθοριστικές. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη θερμά τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική, Δρ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για τη συνεργασία και για τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Ευθύμιο Κυριάκη, για τη αδιάκοπη βοήθεια και το χρόνο του, καθώς ήταν πάντοτε πρόθυμος να με καθοδηγήσει, αλλά και την ατελείωτη υπομονή που επέδειξε αυτά τα χρόνια στην αντιμετώπιση κάθε προβλήματος. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Γεώργιο Στραβοδήμο και τις υποψήφιες διδάκτορες Θεοδώρα Σολοβού, Όλγα Παπαϊωάννου, Ραφαηλία Μπέτα και την Δρ. Χριστίνα Δράκου για την υπέροχη συνύπαρξη, την απεριόριστη στήριξη και τη βοήθεια τους. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια και φίλη Αναστασία Τσαγκαράκου για την βοήθεια και τη στήριξη τόσο σε επιστημονικά όσο και σε κάθε λογής ζητήματα κατά την κοινή μας πορεία μας αυτά τα χρόνια, τόσο σε προπτυχιακό όσο και μεταπτυχιακό επίπεδο, αλλά και στον μεταπτυχιακό φοιτητή Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο και πάνω από όλα καρδιακό φίλο για την πολύτιμη βοήθεια και την παρέα του. Δε θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια και τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την υποστήριξη τους, τη βοήθεια, την ηθική στήριξη και την πολύτιμη συμβολή τους όλα αυτά τα χρόνια.

## Περίληψη

Οι φωσφορυλάσες των α-γλυκανών ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοσυλτρανσφερασών. Το φυτικό ανάλογο για την φωσφορυλάση των α-γλυκανών ονομάζεται φωσφορυλάση του αμύλου και καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή της α-1,4-γλυκόζης και του ανόργανου φωσφόρου σε 1-φωσφορική γλυκόζη (*G1P*) και παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του αμύλου. Στο γεώμηλα υπάρχουν δύο ισομορφές *PSP* (*Potato Starch Phosphorylase*), η *Pho1* (*L-μορφή, L-PSP*) και η *Pho2* (*H-μορφή, H-PSP*) σύμφωνα με την χαμηλή και υψηλή συγγένεια που έχουν για το άμυλο, αντίστοιχα. Η *L-PSP* είναι μια διμερής πρωτεΐνη με το μονομερές της να αποτελείται από 103.9 *kDa*. Η *L-PSP* είναι μεγαλύτερη από την *H-PSP*, καθώς περιέχει μια ένθεση 78 αμινοξέων κοντά στο κέντρο πρόσδεσης του γλυκογόνου, με αποτέλεσμα το ένζυμο να παρουσιάζει χαμηλή ομολογία με φωσφορυλάσες από άλλους οργανισμούς. Η *L-PSP* παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για την αμυλοπεκτίνη, αλλά χαμηλότερη συγγένεια για το γλυκογόνο, ενώ η φωσφορυλάση από μύες κονίκλων (*rmGP*) έχει υψηλή συγγένεια και για τα δύο υποστρώματα. Η πιο σημαντική διαφορά τους είναι ότι η *rmGP* συμπεριφέρεται ως αλλοστερικό ένζυμο, ενώ η *PSP* δεν διαθέτει αλλοστερικές ιδιότητες καθώς τα αμινοξέα *Asn*<sup>284</sup> και *Phe*<sup>285</sup> δεν είναι συντηρημένα και έτσι ο βρόχος 280s να μην μπορεί να λειτουργήσει ως αλλοστερικός ρυθμιστής της ενζυμικής δραστηριότητας. Η δραστηριότητα της *PSP* δεν επηρεάζεται από νουκλεοτίδια και ακολουθεί κινητική *Michaelis – Menten* (Mori, Tanizawa, & Fukui, 1993; Nakano & Fukui, 1986; Nakano, Fukui, & Matsubara, 1980).

Στην παρούσα εργασία καθαρίσαμε και απομονώσαμε την *L-PSP* από βολβούς γεωμήλων με τροποποιήσεις στο πρωτόκολλο των Kamogawa, Fukui; et. al.(1968) (Kamogawa, Fukui, & Nikuni, 1968) . Το ένζυμο στη συνέχεια κρυσταλλώθηκε με τη μέθοδο διάχυσης ατμών. Πραγματοποιήθηκαν επίσης κινητικές μελέτες, ώστε να διαπιστωθεί το βέλτιστο *pH* και η θερμοκρασία για την έκφραση ενζυμικής δραστηριότητας. Προσδιορίστηκε η *Km* του ενζύμου ως προς άμυλο αλλά και η επίδραση της *AMP* στην κινητική του ενζύμου.



## Abstract

The  $\alpha$ -glucan phosphorylases (EC 2.4.1.1) belong to glycosyltransferase family 35. The plant analog of  $\alpha$ -glucan phosphorylase, known as starch phosphorylase catalyzes the reversible conversion of  $\alpha$ -1,4-glucan and inorganic phosphate into glucose-1-phosphate, and plays an important role in starch metabolism. In potatoes there are two isoforms of PSP (*Potato Starch Phosphorylase*), which are classified as the low-affinity (*L-form PSP*, *L-PSP* or *Pho1*) and the high-affinity (*H-form PSP*, *H-PSP* or *Pho2*) types according to their binding affinities to starch. The monomer of *L-PSP* is composed by 916 amino acid residues with a molecular weight of 103,916 Da. The *L-PSP* is larger by a 78 residue insertion at the central position, causing the protein molecule to display low homology toward phosphorylases from other sources. PSP shows high affinity for amylopectin but an abnormally low affinity for glycogen, whereas rabbit muscle phosphorylase (*rmGP*) has high affinities for both substrates. The most important difference between PSP and *rmGP* is that the latter is as an allosteric enzyme, whereas PSP is not. This could be attributed to residues *Asn*<sup>284</sup> and *Phe*<sup>285</sup> of *GP* which are not conserved in PSP and hence the loop 280s (a critical loop for the allosteric mechanism) cannot function. PSP activity is not affected by nucleotides and shows a normal *Michaelis-Menten* kinetics (Mori et al., 1993; Nakano & Fukui, 1986; Nakano et al., 1980).

In this study we purified and isolated L-PSP by modifying the *Atsumi Kamogawa, Toshio Fukui*; et. al.(1968) protocol (Kamogawa et al., 1968). The enzyme was crystallized using the sitting drop vapor diffusion method. Kinetic studies were also performed to determine the optimal *pH* and temperature for enzyme activity, while the kinetic constants were also determined for starch. The effect of AMP to the PSP enzymatic activity was also assessed.

# Εισαγωγή

## 1. Μεταβολισμός του αμύλου

### 1.1 Χαρακτηρισμός του αμύλου

Το άμυλο που παράγεται από τα ανώτερα φυτά λειτουργεί ως θέση αποθήκευσης υδατανθράκων και είναι πιθανώς η πιο σημαντική διατροφική πηγή ενέργειας για τον άνθρωπο, αντιπροσωπεύοντας ένα σημαντικό ποσοστό της καθημερινής θερμιδικής πρόσληψης (I. J. Tetlow, Morell, & Emes, 2004). Το άμυλο είναι ένα αδιάλυτο πολυμερές από κατάλοιπα γλυκόζης και σημαντικό προϊόν αποθήκευσης σε πολλούς σπόρους και γεωργικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη κατανάλωση (Ian J. Tetlow, 2011). Υπάρχει σε δύο μορφές διαθέσιμο στα φυτά, το μεταβατικό και το αποταμιευτικό άμυλο. Συντίθενται μέσα σε εξειδικευμένα υποκυτταρικά οργανίδια που ονομάζονται πλαστίδια (I. J. Tetlow et al., 2004) με τις ιδιότητες των δύο μορφών αμύλου να εξαρτώνται από τον τύπο πλαστιδίου και το φυτικό ιστό από τον οποίο προέρχονται.

Το μεταβατικό άμυλο συντίθεται σε χλωροπλάστες φύλλων κατά τη διάρκεια της ημέρας και αποικοδομείται κατά τη διάρκεια της νύκτας σε σουκρόζη για να παρέχει άνθρακα και ενέργεια για το μη φωτοσυνθετικό μεταβολισμό. Το άμυλο που παράγεται από ριζόβιους ιστούς λειτουργεί επίσης ως αποθήκη άνθρακα και γίνεται διαθέσιμο όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες το απαιτούν, ενώ το αποταμιευτικό άμυλο των σπόρων διασπάται κατά τη βλάστηση για να παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την ανάπτυξη του φυτού (Ian J. Tetlow, 2011).

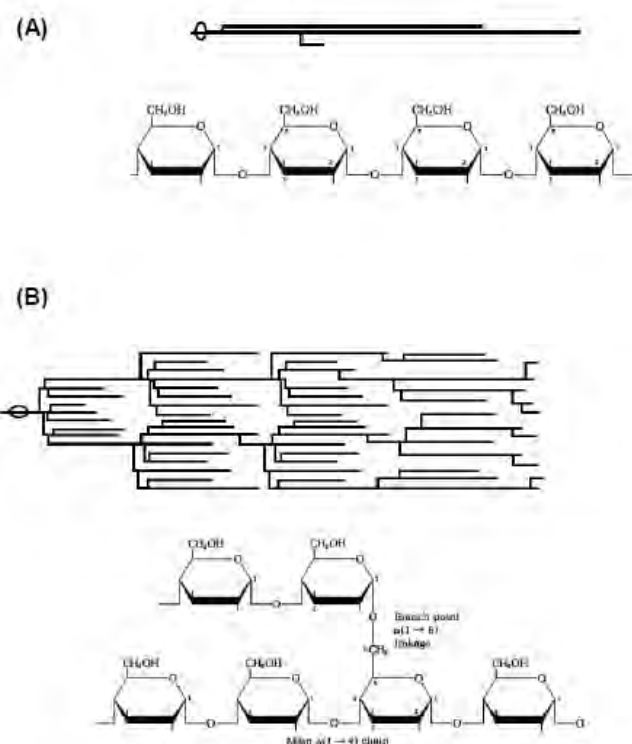
Η παραγωγή του αμύλου σε ετερότροφους ιστούς γίνεται σε εξειδικευμένα πλαστίδια που ονομάζονται αμυλοπλάστες. Το αποταμιευτικό άμυλο που παράγεται σε αμυλοπλάστες ενδοσπερμίων δημητριακών (ρύζι, καλαμπόκι, σιτάρι, κριθάρι) αντιπροσωπεύει πάνω από το 90% της παγκόσμιας αγοράς αμύλου (Ian J. Tetlow, 2011). Είναι μια φθηνή, φυσική, ανανεώσιμη πρώτη ύλη, του οποίου οι ποικίλες δομές αξιοποιούνται σε προϊόντα αγροδιατροφής, σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές (παραγωγή χαρτιού, βιοδιασπώμενα πλαστικά, προϊόντα κοσμητικής) και ως πηγή ανανεώσιμης ενέργειας μετά την μετατροπή του σε αιθανόλη, καθιστώντας το εξαιρετικά χρήσιμο προϊόν (Burrell, 2003; Keeling & Myers, 2010).

Ο χαρακτηρισμός των φυσικών μεταλλαγμάτων που προκύπτουν από τη φυτική αναπαραγωγή και η ταυτοποίηση των σημαντικότερων γονιδίων του βιοσυνθετικού μονοπατιού του αμύλου έχουν παράσχει μια βασική εικόνα για το σχηματισμό των

κοκκίων αμύλου (Keeling & Myers, 2010). Εξακολουθούν όμως να υπάρχουν σημαντικά κενά ιδιαίτερα στην κατανόηση της έναρξης και στον τερματισμό της σύνθεσης των κοκκίων αμύλου, καθώς και σε σημαντικές λεπτομέρειες που αφορούν τη ρύθμιση και τον συντονισμό των διαφορετικών ενζύμων που μετέχουν στη σύνθεση του πολυμερούς.

## 1.2 Μοριακή δομή του αμύλου

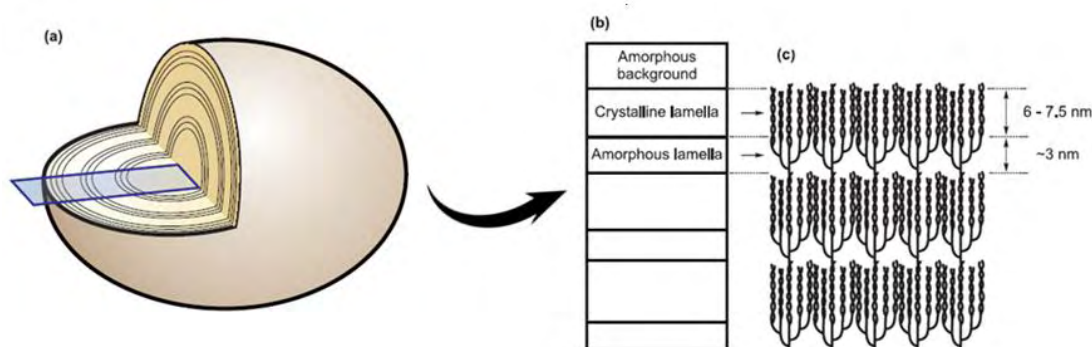
Η δομή των κοκκίων αμύλου είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει δύο διαφορετικούς τύπους πολυμερών γλυκόζης: την αμυλόζη, πολυμερές 100-10.000 κατάλοιπων γλυκόζης που περιλαμβάνει αλυσίδες γλυκάνης συνδεδεμένες με  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς και την αμυλοπεκτίνη, ένα μεγαλύτερο, διακλαδισμένο πολυμερές γλυκάνης που αποτελεί περίπου το 75% της μάζας των κοκκίων αμύλου, και παράγεται από το σχηματισμό  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών μεταξύ γειτονικών ευθύγραμμων αλυσίδων γλυκάνης. Υπάρχει περίπου ένα σημείο διακλάδωσης για κάθε 20 κατάλοιπα γλυκόζης στην αμυλοπεκτίνη, το οποίο προσεγγίζει στο μισό την αντίστοιχη τιμή για το γλυκογόνο. Έχουν προταθεί πολλά μοντέλα για τη δομή της αμυλοπεκτίνης και της οργάνωσής της σε κόκκους, ωστόσο, το μοντέλο του συμπλέγματος εμφανίστηκε ως η πιο πιθανή δομή (I. J. Tetlow et al., 2004).



**Εικόνα 1** : Δομικές διαφορές μεταξύ της αμυλόζης και της αμυλοπεκτίνης. (1A) : Η αμυλόζη είναι ένα μερικώς διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης που αποτελείται από  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. (1B) : Η αμυλοπεκτίνη είναι ένα υψηλά διακλαδισμένο πολυμερές γλυκάνης και περιέχει  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς (I. J. Tetlow et al., 2004).

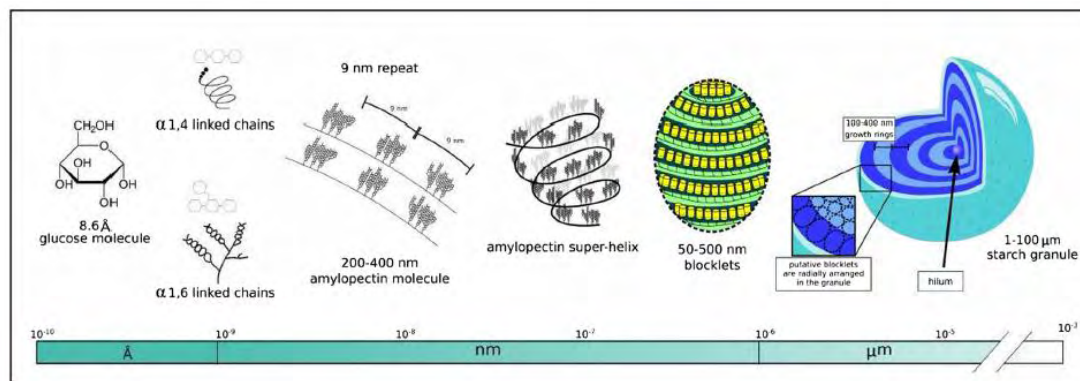
Η πολυτροπική κατανομή των αλυσίδων γλυκάνης στην αμυλοπεκτίνη επιτρέπει στις κοντές γραμμικές αλυσίδες να πακετάρονται μαζί αποτελεσματικά ως παράλληλες αριστερόστροφες διπλές έλικες (με περίπου 6 μονομερή ανά στροφή). Αυτές, σε συνδυασμό με την παρουσία φυσιολογικού αριθμού σημείων διακλάδωσης, μπορούν να σχηματίσουν τη βάση της ημι-κρυσταλλικής φύσης της μήτρας των κοκκίων αμύλου, και έχουν ως αποτέλεσμα το άμυλο να είναι αδιάλυτο στο νερό (I. J. Tetlow et al., 2004). Αντίθετα, το γλυκογόνο που παράγεται από ζώα και βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου πολλών κυανοβακτηρίων, έχει μια πιο ομοιογενής, διακλαδισμένη, ανοικτή δομή που επεκτείνεται με σφαιρικό τρόπο (Roach, 2002).

Η ακριβής θέση της αμυλόζης μέσα στους κόκκους δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως, αλλά θεωρείται ότι είναι κατά κύριο λόγο διασκορπισμένη ως ένα μονό ελικοειδές ή τυχαίο σπείραμα σε άμορφες, λιγότερο κρυσταλλικές περιοχές και συντίθενται σε μια προϋπάρχουσα μήτρα αμυλοπεκτίνης (Jenkins & Donald, 1995). Ο σχηματισμός των κοκκίων οφείλεται τόσο στις ημικρυσταλλικές ιδιότητες της αμυλοπεκτίνης, όσο και στην ομαδοποίηση και τη συχνότητα των  $\alpha,1-6$  γλυκοζιτικών δεσμών. Η κρυσταλλική δομή των κοκκίων αμύλου είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στα φυτά. Οι ομάδες των εναλλασσόμενων περιοχών ημικρυσταλλικής και άμορφου υλικού, δημιουργούν τα δαχτυλίδια ανάπτυξης (*growth rings*) που είναι παρόντα στα αποταμιευτικά άμυλα των ανωτέρων φυτών (Pilling & Smith, 2003). Ένα συνηθισμένο χαρακτηριστικό όλων των αμύλων είναι ότι σε κάποιο σημείο πρέπει να αποικοδομηθούν (π.χ. το άμυλο των φύλλων στο τέλος της φωτοπεριόδου, το αποταμιευτικό άμυλο κατά τη διάρκεια της βλάστησης), και έτσι η δομή του κοκκίου πρέπει να έχει σημεία εισόδου (κανάλια, κοιλότητες) για τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση (I. J. Tetlow et al., 2004).



**Εικόνα 2 :** α) Σχηματική αναπαράσταση της δομής των κοκκίων αμύλου, όπου απεικονίζονται οι εναλλασσόμενες άμορφες και ημικρυσταλλικές ζώνες οι οποίες συγκροτούν το δαχτυλίο ανάπτυξης (*growth ring*). Οι άμορφες ζώνες περιέχουν αμυλοπεκτίνη, σε λιγότερο οργανωμένη κατάσταση, μαζί με αμυλόζη. β) Μεγέθυνση του ημικρυσταλλικού δαχτυλίου ανάπτυξης, όπου φαίνονται οι εναλλασσόμενες κρυσταλλικές και άμορφες περιοχές. γ) Στην αμυλοπεκτίνη οι πολυάριθμες, επαναλαμβανόμενες

δομικές μονάδες, δημιουργούν συστάδες (clusters) που είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους. Αυτές με παράλληλες αλυσίδες γλυκάνης που συνδέονται με  $\alpha,1-4$  γλυκοζιτικούς δεσμούς πακετάρονται και δημιουργούν διπλές έλικες. Τα σημεία διακλάδωσης που σχηματίζονται με  $\alpha,1-6$  γλυκοζιτικούς δεσμούς τοποθετούνται στη βάση των ελίκων στις άμορφες περιοχές. Το μήκος των κρυσταλλικών και άμορφων περιοχών (περίπου  $9-10\text{ nm}$ ) είναι το ίδιο, ανεξάρτητα από την πηγή του αμύλου (I. J. Tetlow et al., 2004).



**Εικόνα 3** : Τα διάφορα επίπεδα ιεραρχικής δομής των κοκκίων αμύλου κατά σειρά κλίμακας από μεμονωμένες μονάδες γλυκόζης (περίπου  $9\text{ \AA}$ ) έως πλήρη κοκκία αμύλου (κλίμακα  $\mu\text{m}$ ) (Goren, Ashlock, & Tetlow, 2018).

### 1.3 Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης του αμύλου

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

#### 1.3.1 Σύνθεση της ADP-γλυκόζης, πρόδρομο μόριο της βιοσύνθεσης του αμύλου

Οι φυτικοί ιστοί που είναι ικανοί για βιοσύνθεση αμύλου χρησιμοποιούν μια βιοσυνθετική οδό που μοιάζει με το αντίστοιχο προκαρυωτικό μονοπάτι για το

σχηματισμό της ADP-γλυκόζης που είναι το διαλυτό πρόδρομο και υπόστρωμα για τις συνθάσες του αμύλου (Recondo & Leloir, 1961). Η ADP-γλυκόζη συντίθεται από την πυροφωσφορυλάση της ADP-γλυκόζης (*AGPase*, *E.C.2.7.7.27*). Η αντίδραση της *AGPase* είναι το πρώτο δεσμευτικό βήμα στη βιοσύνθεση του μεταβατικού αμύλου στους χλωροπλάστες και του αποταμιευτικού αμύλου στους αμυλοπλάστες. Η αντίδραση για την *AGPase* έχει ως εξής:

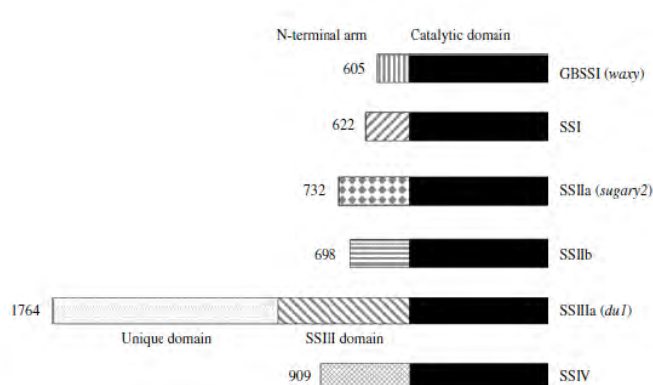


Ιn vivo, η αντίδραση μετατοπίζεται μακριά από την ισορροπία, προς τη σύνθεση της ADP-γλυκόζης με δράση πλαστιδιακής αλκαλικής ανόργανης πυροφωσφατάσης (*EC 3.6.1.1*) που μετατρέπει ανόργανο πυροφωσφορικό (*PPi*) σε ανόργανο ορθοφωσφορικό (*Pi*), το οποίο μπορεί να μεταφερθεί δια μέσου της μεμβράνης του φακέλου του πλαστιδίου μέσω διαφορετικών οδών. Η *AGPase* στα ανώτερα φυτά είναι ετεροτετραμερές, αποτελούμενο από δύο μεγάλες (*AGP-L*) υπομονάδες και δύο μικρές (*AGP-S*) καταλυτικές υπομονάδες που κωδικοποιούνται από τουλάχιστον δύο διαφορετικά γονίδια (Gross & Ar Rees, 1986). Εκτός από την πλαστιδιακή *AGPase* που υπάρχει σε όλους τους ιστούς σύνθεσης αμύλου, υπάρχουν άλλες δύο τουλάχιστον διακριτές μορφές *AGPase* στα αναπτυσσόμενα ενδοσπέρμια του αραβοσίτου, του κριθαριού, του ρυζιού και του σιταριού που αντιστοιχούν σε πλαστιδιακές και κυτοσολικές ισομορφές της *AGPase* (I. J. Tetlow et al., 2003). Τα φυτά διαθέτουν πολλαπλά γονίδια που κωδικοποιούν τις *AGP-L* ή *AGP-S* υπομονάδες που εκφράζονται σε διαφορετικά φυτικά όργανα. Αυτό σημαίνει ότι η σύνθεση της υπομονάδας της *AGPase* μπορεί να ποικίλει σε διαφορετικά μέρη του ίδιου φυτού σε είδη όπως το ρύζι, το κριθάρι και η πατάτα (La Cognata, Willmitzer, & Muller-Rober, 1995). Η καταλυτική δραστηριότητα των *AGPase* υπόκεινται σε αλλοστερικό έλεγχο. Οι *AGPases* γενικά διεγείρονται από το 3-φωσφογλυκερικό (3-*PGA*) και αναστέλλονται από ανόργανο ορθοφωσφορικό (*Pi*). Η αναλογία αυτών των δύο αλλοστερικών τελεστών θεωρείται ότι παίζει βασικό ρόλο στον έλεγχο της σύνθεσης αμύλου στους φωτοσυνθετικούς ιστούς. Ωστόσο η πλαστιδιακή *AGPase* από αποθηκευτικούς ιστούς (π.χ γεώμηλα) παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία σε αυτούς τους αλλοστερικούς παράγοντες (Preiss et al., 1991).

### 1.3.2 Σχηματισμός των αλυσίδων γλυκάνης από τις συνθάσες του αμύλου

Οι συνθάσες αμύλου των φυτών (*SS*, *EC 2.4.1.21*) καταλύουν τη μεταφορά γλυκοζυλίου από τη διαλυτή πρόδρομη ADP-γλυκόζη στο μη αναγωγικό άκρο ενός προϋπάρχοντος εκκινητή γλυκάνης που συνδέεται με  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιπικούς δεσμούς

για να συνθέσουν πολυμερή γλυκάνης, τα οποία τελικά, σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα, σχηματίζουν την αμυλόζη και την αμυλοπεκτίνη. Αυτή η ομάδα ενζύμων χωρίζεται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τις συνθάσες αμύλου συνδεδεμένες με κοκκία (*Granule bound starch synthases, GBSS*) οι οποίες κωδικοποιούνται από το γονίδιο *Waxy (Wx)* και εμπλέκονται στη βιοσύνθεση αμυλόζης (Echt & Schwartz, 1981; Nakamura, Yamamori, Hirano, & Hidaka, 1993; Sano, 1984). Η δεύτερη κατηγορία συνθασών αμύλου αποτελείται από τέσσερις κύριες ισομορφές *SSI, SSII, SSIII και SSIV* που εμπλέκονται στη σύνθεση αμυλοπεκτίνης. Οι ισόμορφες μορφές των μεγάλων κατηγοριών *SS* είναι εξαιρετικά διατηρημένες σε ανώτερα φυτά. Το υψηλά συντηρημένο μοτίβο *K-X-G-G-L* είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση του υποστρώματος σε προκαρυωτικές *GS* και ανώτερες φυτικές *SS* εντός του C-τελικού άκρου σε φυτικές *SSs* (Nichols, Keeling, Spalding, & Guan, 2000).



**Εικόνα 4:** Σύγκριση αλληλουχιών των επικρατειών πέντε γνωστών ισομορφών *SS* στα δημητριακά. Οι C-τελικές καταλυτικές περιοχές (σε μαύρο χρώμα) περιλαμβάνουν το μοτίβο *K-X-G-G-G* το οποίο είναι επικράτεια δέσμευσης *ADP-Glc*. Οι *SSs* διαφέρουν στο μήκος της N-τελικής περιοχής (που φαίνεται ως γραμμοσκιασμένες ράβδοι). Το N-τελικό άκρο πιστεύεται ότι παρέχει την εξειδίκευση των ισομορφών, πιθανώς μέσω σύνδεσης με άλλες πρωτεΐνες. (Τα μήκη των ακολουθιών δεν έχουν σχεδιαστεί με κλίμακα). (Ian J. Tetlow, 2011).

### 1.3.3 Ένζυμο διακλάδωσης του αμύλου

Τα ένζυμα διακλάδωσης του αμύλου (*Starch Branching Enzymes, SBEs, EC 2.4.1.18*) δημιουργούν  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς με διάσπαση των εσωτερικών  $\alpha$ -1,4 γλυκοζιτικών δεσμών και μεταφέρουν το απελευθερωμένο ανηγμένο άκρο σε υδροξύλια του C6 για το σχηματισμό του διακλαδισμένου μορίου της αμυλοπεκτίνης. Τα *SBE* ανήκουν στην υπεροικογένεια των  $\alpha$ -αμυλασών και δημιουργούν  $\alpha$ -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς σε γραμμικά και διακλαδισμένα υποστρώματα γλυκάνης. Στη συνέχεια τα *SBEs* μπορούν να μεταφέρουν τη γλυκάνη που έχει διασπαστεί σε μια αλυσίδα δέκτη, η οποία είναι είτε μέρος της αρχικής αλυσίδας γλυκάνης ή τμήμα

γειτονικής αλυσίδας γλυκάνης (φαινόμενο που είναι γνωστό ως μεταφορά μεταξύ αλυσίδων). Μελέτες στο *SBE* του γεωμήλου έδειξαν ότι επικρατεί η μεταφορά μεταξύ των αλυσίδων και αυτή η στενή σύνδεση των αλυσίδων γλυκάνης, είναι πιο ευνοϊκή για την καταλυτική δραστηριότητα των *SBE* (Ian J. Tetlow, 2011).

Η ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας *SBEs* ανώτερων φυτών αποκαλύπτει δύο σημαντικές τάξεις: *SBEI* (επίσης γνωστό ως *SBE B*) και *SBEII* (*SBE A*). Αυτά διαφέρουν ως προς το μήκος της αλυσίδας γλυκάνης που μεταφέρεται *in vitro* και ως προς τις ιδιαιτερότητες των υποστρωμάτων τους. Τα *SBEII* μεταφέρουν βραχύτερες αλυσίδες και εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια προς την αμυλοπεκτίνη από τα *SBEI* αντίστοιχα, τα οποία παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά διακλάδωσης με την αμυλόζη. Αυτό το μοντέλο υποστηρίζεται από την αύξηση του μέσου μήκους της αλυσίδας στην αμυλοπεκτίνη σε μεταλλάγματα αραβοσίτου που δεν έχουν *SBE II*. Δεν υπάρχει γνωστό μετάλλαγμα με μειωμένο *SBE I* (Rydberg, Andersson, Andersson, Aman, & Larsson, 2001).

#### 1.3.4 Ένζυμο αποδιακλάδωσης του αμύλου

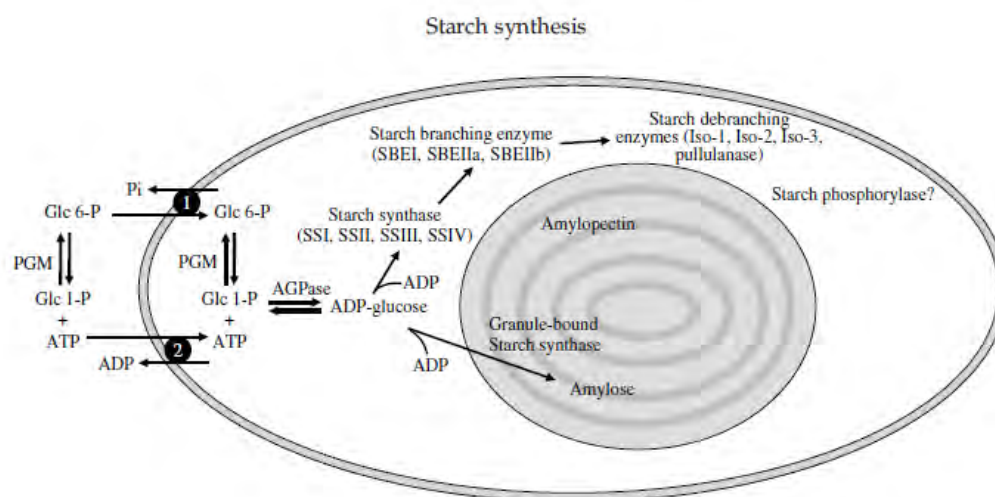
Τα ένζυμα αποδιακλάδωσης του αμύλου στα φυτά (*Debranching enzymes*, *EC 3.2.1.41* και *EC 3.2.1.68*) χωρίζονται σε δύο ομάδες: i) ισοαμυλάσες (*ISA*) οι οποίες απομακρύνουν τους  $\alpha$ -1,6-γλυκοζιτικούς δεσμούς στην αμυλοπεκτίνη και σε άλλες πολυγλυκάνες, ii) δεξτρινάση (*LDA*), η οποία, εκτός από την αποδιακλάδωση των πολυγλυκανών, είναι διαφορετική από την ισοαμυλάση γιατί μπορεί να αποδιακλαδώσει το πολουλάνιο (ένα πολυμερές στους μύκητες). Από τις τρεις ισομορφές του *ISA* που υπάρχουν στα φυτά μόνο δύο, η ισοαμυλάση-1 (*ISA1*) και η ισοαμυλάση-2 (*ISA2*) εμπλέκονται άμεσα στη σύνθεση αμυλοπεκτίνης. Η τρίτη ισόμορφη *ISA*, ισοαμυλάση-3 (*ISA3*), μαζί με την *LDA*, φαίνεται να εμπλέκεται στη διαδικασία αποικοδόμησης του αμύλου με την υδρόλυση και την αφαίρεση των  $\alpha$ -1,6-γλυκοζιτικών δεσμών στο *MOS* που απελευθερώνεται από αμυλάσες. (Goren et al., 2018)

#### 1.3.5 Ένζυμο D (*Disproportionating enzyme*)

Το ένζυμο D (*Disproportionating enzyme*, *D-enzyme*, *E.C. 2.4.1.25*) καταλύει τη μεταφορά δύο καταλοίπων γλυκόζης από τη μαλτοτριόζη σε μια μακρύτερη αλυσίδα  $\alpha$ -γλυκάνης και προκύπτει ελεύθερη *Glc* η οποία όταν δημιουργείται στο πλαστίδιο, μπορεί να εξαχθεί στο κυτταρόπλασμα μέσω του μεταφορέα *Glc* στην εσωτερική μεμβράνη του φακέλου. Το *D-ένζυμο* έχει ένα ρόλο στη σύνθεση αμύλου μέσω της



τροποποίησης των *MOS* (*malto-oligosaccharides*) που παράγονται από τα *DBEs* και/ή την φωσφορυλάση του αμύλου (*Starch phosphorylase, SP*). Πρόσφατες μελέτες στο ενδοσπέρμιο του ρυζιού έχουν δείξει ότι η *SP* είναι σε θέση να χρησιμοποιήσει τα προϊόντα τρανσγλυκοζυλίωσης (*Glc* και μαλτοτριόζη) που παράγονται από το *D*-ένζυμο, καθώς το *D*-ένζυμο και η *SP* σχηματίζουν ένα λειτουργικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο (Hwang, Nishi, Satoh, & Okita, 2010). Ένας πιθανός ρόλος του συμπλόκου *D*-ενζύμου/*SP* κατά τη διάρκεια της σύνθεσης αμυλοπεκτίνης, θα μπορούσε να είναι στη χρήση των *MOS* που απελευθερώνεται από τα *DBE*. Κοντές αλυσίδες *MOS* που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αποδιακλάδωσης της αμυλοπεκτίνης από τα *DBEs* μπορούν να επεκταθούν με το *D*-ένζυμο, και στη συνέχεια να είναι διαθέσιμες για φωσφορολυτική διάσπαση από την *SP*, απελευθερώνοντας *G1P* που χρησιμοποιείται από την πλαστιδιακή *AGPase*. Ο ακριβής ρόλος του *D*-ενζύμου δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και έχει μια ποικιλία λειτουργιών σε διαφορετικούς ιστούς στο διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των φυτών (Goren et al., 2018).



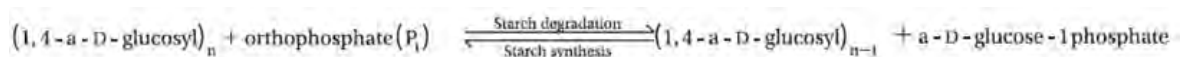
**Εικόνα 5 :** Επισκόπηση της βιοσύνθεσης αμύλου σε ετερότροφα πλαστίδια (αμυλοπλάστες) αποθηκευτικών ιστών. Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης αμύλου σε αποθηκευτικούς ιστούς των δικότυλων, όπου η *AGPase* είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση της *ADP*-γλυκόζης και είναι αποκλειστικά εντοπισμένη στο στρώμα των πλαστιδίων. Η 6-φωσφορική γλυκόζη (*G6P*) και η *ATP* για αυτή την αντίδραση εισάγονται στο πλαστίδιο από το κυτταρόπλασμα μέσω του αντιμεταφορέα *G6P / Pi* (1) και του μεταφορέα *ATP / ADP* (2) που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του φακέλου του πλαστιδίου. Κυτταροπλασματικές και πλαστιδιακές ισομορφές φωσφογλυκομουτάσης (*PGM*) αλληλομετατρέπουν *G6P* και *G1P*. Τα υποστρώματα για αυτούς τους μεταφορείς παράγονται από αντιδράσεις που εμπλέκονται στη σύνθεση αμύλου στο πλαστίδιο. Το *Pi* δημιουργείται από πυροφωσφορικό που παράγεται από την *AGPase* και η *ADP* είναι ένα παραπροϊόν της αντίδρασης συνθάσης αμύλου (*SS*). Η *ADP*-γλυκόζη χρησιμοποιείται από τις συνθάσεις του αμύλου και η αλυσίδα γλυκάνης διακλαδίζεται και αποδιακλαδίζεται από ένζυμα διακλάδωσης (*Starch branching enzymes, SBE*) και ένζυμα αποδιακλάδωσης του αμύλου (*Starch debranching enzymes, DBE*) αντιστοίχως, για να σχηματίσουν αμυλοπεκτίνη (Ian J. Tetlow, 2011).

### 1.3.6 Ένζυμα αποικοδόμησης του αμύλου

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

## 2. Φωσφορυλάση του αμύλου

Οι φωσφορυλάσες της α-γλυκάνης (*EC 2.4.1.1*) ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοσυλοτρανσφερασών 35 (*GT35*). Αυτά τα ένζυμα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης και η αμινοξική τους αλληλουχία είναι ιδιαίτερα συντηρημένη σε φυτά, ζώα, και προκαρυώτες. Λειτουργούν κυρίως ως αποικοδομητικά ένζυμα των πολυγλυκανών μέσω φωσφορόλυσης και είναι κυρίως δραστικά στην ομοδιμερή μορφή με την 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (*PLP*) να λειτουργεί ως συμπράγοντας (Newgard, Hwang, & Fletterick, 1989; Rathore et al., 2009). Οι πολυσακχαρίτες με τη μορφή αμύλου και γλυκογόνου είναι οι κύριες αποθήκες άνθρακα και ενέργειας για πολλούς οργανισμούς. Το φυτικό ανάλογο της φωσφορυλάσης των α-γλυκανών, ονομάζεται φωσφορυλάση του αμύλου (*Starch phosphorylase, SP*) και καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή της α-1,4-γλυκόζης και του ανόργανου φωσφόρου σε 1-φωσφορική γλυκόζη (*G1P*) και παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό του αμύλου. Η *SP* συμμετέχει στη σύνθεση και στην αποικοδόμηση του αμύλου όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (Rathore et al., 2009)



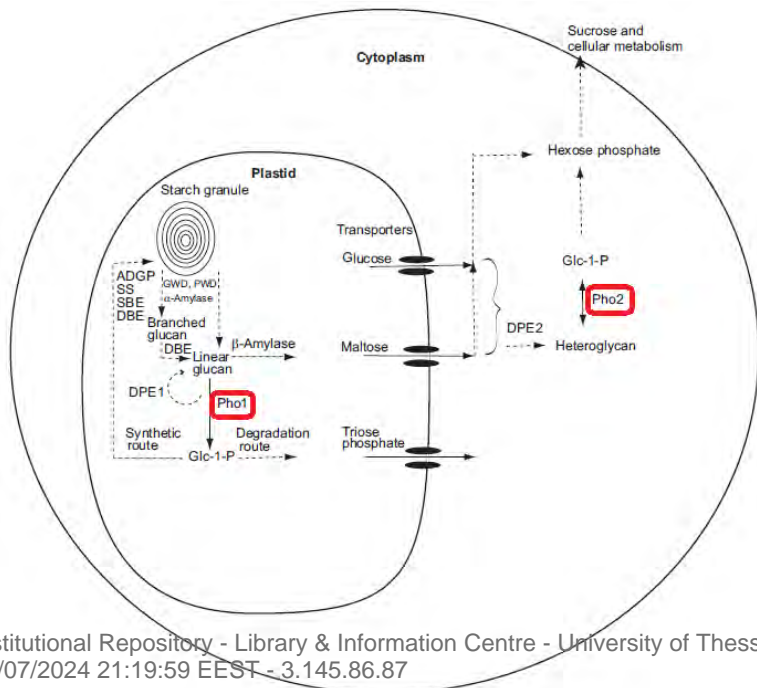
Τα μη αναγωγικά άκρα των ολιγο- ή πολύ-σακχαριτών μπορούν να λειτουργήσουν τόσο ως δέκτες όσο και δότες καταλοίπων γλυκόζης, και έτσι οι φωσφορυλάσες δρουν ως ένζυμα σύνθεσης και αποικοδόμησης γλυκανών, ανάλογα με την τιμή του λόγου  $G1P/Pi$ . Το ελάχιστο μέγεθος ενός ολιγοσακχαρίτη που μπορεί να δράσει ως δέκτης και ως δότης καταλοίπων γλυκόζης είναι η μαλτοτετραόζη και η μαλτοπενταόζη αντίστοιχα.

## 2.1 Ισομορφές της φωσφορυλάσης του αμύλου

Οι φωσφορυλάσες του αμύλου (*SPs*) κατανέμονται ευρέως σε φυτά και επίσης βρίσκονται σε ορισμένα βακτήρια και άλγη. Οι πολλαπλές μορφές και ο διαφορετικός ενδοκυτταρικός εντοπισμός είναι χαρακτηριστικά των *SP*. Αυτές οι πολλαπλές μορφές ενδεχομένως προκύπτουν ως αποτέλεσμα της βιοχημικής απόκρισης στην ετερογένεια των μορίων αμύλου και τη δομή των κοκκίων αμύλου. Διαφοροποιούνται εύκολα από τη κινητική τους συμπεριφορά και τη διαφορετική κατανομή στους ιστούς του φυτού. Στους βολβούς και στα φύλλα πατάτας (*Solanum tuberosum*) υπάρχουν δύο μορφές, η *L* και η *H*, που βρίσκονται στα πλαστίδια και στο κυτταρόπλασμα αντίστοιχα και έχουν χαμηλή και υψηλή συγγένεια για γλυκάνες. Παρόμοια ζεύγη φωσφορυλασών έχουν βρεθεί στο *Arabidopsis Thaliana* (*AtPHS1* και *AtPHS2*), στη γλυκοπατάτα (*Ipomoea batatas*), και σε άλλα φυτά. Σε γενικές γραμμές, τα περισσότερα φυτά διαθέτουν δύο τύπους *SP*, που ονομάζονται *Pho1*, *L*-μορφή ή *L-SP* (πλαστιδιακή) και *Pho2*, *H*-μορφή ή *H-SP* (κυτταροπλασματική). Η πλαστιδιακή *L*-μορφή έχει μέγεθος μονομερούς περίπου 105 *kDa* και έχει χαμηλή συγγένεια για διακλαδισμένες γλυκάνες, όπως το γλυκογόνο και το άμυλο. Αντίθετα η *H*-μορφή έχει μέγεθος μονομερούς περίπου 90 *kDa* και έχει υψηλή συγγένεια για γραμμικές και

διακλαδισμένες γλυκάνες (Rathore et al., 2009).

**Εικόνα 6**: Διάγραμμα που απεικονίζει τους ρόλους των φυτικών φωσφορυλασών στο μεταβολισμό του αμύλου. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν ότι υπάρχουν και ενδιάμεσα βήματα στα μονοπάτια (Rathore et al., 2009)



## 2.2 Φωσφορυλάση του αμύλου από γεώμηλο (Potato Starch Phosphorylase, PSP)

Όλες οι φωσφορυλάσες α-γλυκάνης (*EC 2.4.1.1*) που απομονώνονται από διάφορες πηγές έχουν κάποιες κοινές ιδιότητες. Είναι διμερή ή τετραμερή με μοριακό βάρος υπομονάδας περίπου 100 *kDa* και περιέχουν ένα συνδεδεμένο μόριο πυριδοξάλης ανά υπομονάδα. Ωστόσο, οι ρυθμιστικές ιδιότητες τους είναι εντελώς διαφορετικές ανάλογα με την πηγή από την οποία προέρχονται (Nakano et al., 1980). Η πλήρης αλληλουχία των αμινοξέων της *PSP* έχει προσδιοριστεί και το μονομερές έχει μοριακό βάρος 103.9 *kDa* (Nakano & Fukui, 1986).

Το μονομερές περιέχει δύο συντηρημένες *N*-τελικές και *C*-τελικές περιοχές. Η *N*-τελική επικράτεια περιέχει την πλειονότητα των θέσεων σύνδεσης προσδετών και είναι ρυθμιστική περιοχή, ενώ η συντηρημένη *C*-τελική περιοχή διαθέτει μέρος του ενεργού κέντρου και την περιοχή δέσμευσης για την PLP. Το ενεργό κέντρο βρίσκεται ανάμεσα στην *N*- και *C*-τελική περιοχή. Η ρυθμιστική περιοχή περιέχει κατάλοιπα που εμπλέκονται σε διμερείς συνδέσεις, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αλλαγή στη διαμόρφωση στις υπομονάδες κατά τη δέσμευση ενός προσδέτη στο ένζυμο (Buchbinder, Rath, & Fletterick, 2001).

Η *SP* εμφανίζει δύο ισομορφές την *Pho1* (*L*-μορφή) που βρίσκεται στα πλαστίδια και την *Pho2* (*H*-μορφή) που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Η *Pho-1* ισομορφή περιέχει μια ένθεση 78 αμινοξέων (*Lloop 78, L78*). Αυτή η ένθεση βρίσκεται στην περιοχή δέσμευσης του αμύλου, η ελικοειδής δομή της επεκτείνεται εκτός του μορίου και εκτίθεται στο υδρόφιλο περιβάλλον του ενζύμου. Η *L78* εμποδίζει την πρόσδεση της *L-PSP* στο άμυλο, πιθανώς μειώνοντας και τη συγγένεια της για το άμυλο (Mori et al., 1993; Nakano & Fukui, 1986). Η *L78* δεν έχει βρεθεί σε φωσφορυλάσες βακτηρίων ή ζώων ή στη *H-PSP* ισομορφή. Το γονίδιο για την *L-PSP* κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο 966 αμινοξέων, 50 από τα οποία αποτελούν το *N*-τελικό μεταβατικό πεπτίδιο για τη μεταφορά μέσα στον αμυλοπλάστη, και τα 916 αμινοξέα αποτελούν την ώριμη πρωτεΐνη. Το γονίδιο για την *H-PSP* κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο 838 αμινοξέων, τα οποία αντιστοιχούν στην ώριμη πρωτεΐνη. Παρά τις διαφορές στις ενζυμικές τους ιδιότητες, η σύγκριση της αλληλουχίας των δύο ώριμων πρωτεϊνών αποκαλύπτει 63% ομολογία, εκτός της περιοχής *L78* (Mori et al., 1993).

Η *Pho1* (*L-PSP*) υπάρχει και ως ομοδιμερές (*Pho1a*)<sub>2</sub> και ως ετεροδιμερές (*Pho1a-Pho1b*), ενώ οι υπόλοιπες φωσφορυλάσες συμπεριλαμβανομένης και της *Pho2* (*H-PSP*) υπάρχουν ως ομοδιμερή, τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις μετατρέπονται σε ομοτετραμερή (Albrecht et al., 2001). Και τα 2 ισοπολυπεπτίδια, *Pho1a* και *Pho1b*

παρουσιάζουν υψηλή ομολογία (81-84% ομοιότητα) με εξαίρεση δύο περιοχές: το *N*-τελικό μεταβατικό πεπτιδίο και την εσωτερική ένθεση των 78 αμινοξέων. Θεωρείται ότι οι φωσφορυλάσες των φυτών είναι ένζυμα αποικοδόμησης του αμύλου. Αυτό όμως δεν αντικατοπτρίζει τις μεταβολικές τους λειτουργίες. Σε *in vivo* συνθήκες η *Pho2* (*H-PSP*) δεν έχει πρόσβαση στα κοκκία του αμύλου (εκτός και αν η μεμβράνη του φακέλου του πλαστιδίου διαρρηχθεί). Επίσης η *Pho1* (*L-PSP*), ενώ βρίσκεται στο εσωτερικό του πλαστιδίου, τουλάχιστον σε *in vitro* συνθήκες δεν μπορεί να αποικοδομήσει το άμυλο (Albrecht et al., 2001).

Για να διαπιστωθεί αν η ένθεση στην *L-PSP* παίζει ρόλο στις ενζυμικές λειτουργίες, και ιδιαίτερα στην εξειδίκευση για το υπόστρωμα, οι Mori et. al (1992) κατασκεύασαν ένα χιμαιρικό ένζυμο στο οποίο η ένθεση των 78 αμινοξέων και οι πλευρικές της περιοχές αντικαθίστανται από την αντίστοιχη αλληλουχία του ισοενζύμου τύπου-*H* που δε διαθέτει την ένθεση. Το χιμαιρικό ένζυμο που εκφράζεται σε κύτταρα *E. coli* είναι περίπου πέντε φορές λιγότερο ενεργό από την *L-PSP* αγρίου τύπου, με την δραστηριότητα του όμως να παραμένει υψηλή υποδηλώνοντας ότι έχει αναδιπλωθεί σωστά. Ωστόσο, το σημαντικότερο εύρημα για το χιμαιρικό ένζυμο που δε διαθέτει την *L78* περιοχή είναι ότι παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για μεγάλους και διακλαδισμένους πολυσακχαρίτες (αμυλοπεκτίνη, γλυκογόνο). Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να ερμηνευθεί με δύο τρόπους. Είτε παρατηρείται εξαιτίας της απουσίας της ένθεσης των 78 αμινοξέων που μπλοκάρει το ενεργό κέντρο, είτε λόγω της ύπαρξης μιας περιοχής με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης που έχει προέλθει από την *H-PSP*, όπως το κέντρο πρόσδεσης για το γλυκογόνο στη φωσφορυλάση από μύες κόνικλων (*rmGP*) (Mori et al., 1993).

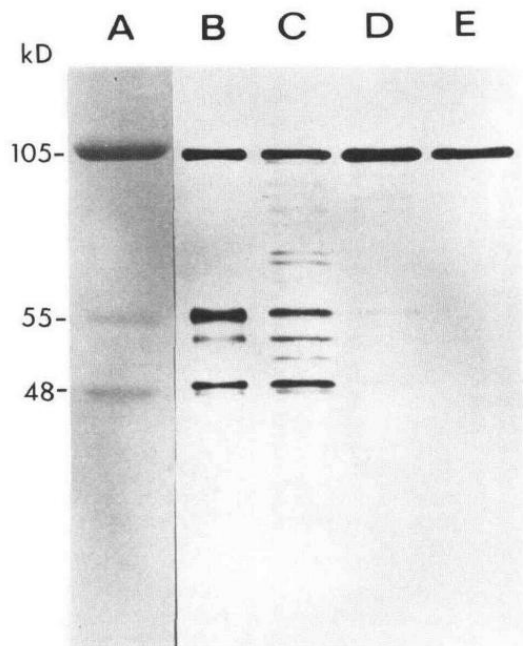
### 2.2.1 Πρωτεολυτική αποικοδόμηση της PSP

Η *L-PSP* είναι ευαίσθητη σε αποικοδόμηση είτε από πρωτεόλυση είτε από θερμική κατεργασία. Το μονομερές της φωσφορυλάσης του αμύλου από φύλλα ώριμης μπανάνας, κασάβας και από ρίζες γλυκοπατάτας μετά την πρωτεόλυση διαχωρίζεται σε δύο υπομονάδες μεγέθους ~ 50 *kDa*, που αντιστοιχούν στις *N*- και *C*-τελικές περιοχές (Brisson, Giroux, Zollinger, Camirand, & Simard, 1989). Είναι ενδιαφέρον ότι η *SP* διατηρεί την τεταρτοταγή δομή και την πλήρη καταλυτική της δραστηριότητα, υποδεικνύοντας τον πιθανό μηχανισμό για μια πρωτεολυτικά καθοδηγούμενη ρύθμιση της (Chen et al., 2002). Η μεγαλύτερη ευαισθησία αποικοδόμησης της *L-PSP* σε σχέση με την *H-PSP* υποδηλώνει ότι η ένθεση των 78 αμινοξέων (*L78*) είναι ο πρωταρχικός στόχος της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης. Πράγματι, η ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας αποκαλύπτει την εμφάνιση μιας περιοχής *PEST* (περιοχή

πλούσια σε προλίνη (*P*), γλουταμικό οξύ (*E*), σερίνη (*S*) και θρεονίνη (*T*). Οι περιοχές *PEST* έχουν δειχθεί ότι εμφανίζονται σε πρωτεΐνες που αποικοδομούνται γρήγορα. Μελέτες έδειξαν ότι με το βρόχο *L78* να μπλοκάρει το ενεργό κέντρο η *L-PSP* μπορεί να συμμετέχει στην σύνθεση του αμύλου. Ενώ μετά την πρωτεολυτική αποικοδόμηση που ο βρόχος απουσιάζει, το ενεργό κέντρο είναι πλέον προσβάσιμο στους πολυσακχαρίτες και μπορεί να καταλύει φωσφορολυτικά την αποικοδόμηση του αμύλου (Rathore et al., 2009). Ως εκ τούτου, η πρωτεολυτική διάσπαση του βρόγχου *L78* μπορεί να χρησιμεύσει ως ένας διακόπτης για να ξεκινήσει η σύνθεση της αμυλόζης ή να καταλυθεί η φωσφορόλυση για την αποικοδόμηση του αμύλου (Chen et al., 2002)

### 2.2.2 Συσχέτιση της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης της *PSP* με τα αναπτυξιακά στάδια

Σε μελέτη των Brisson et al. (1989) η φωσφορυλάση που απομονώθηκε από ώριμους βολβούς γεωμήλων αναλύθηκε σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*). Όπως φαίνεται στην εικόνα 7A, ανιχνεύθηκε μία κύρια ζώνη που αντιστοιχεί στο ενζυμικό μονομερές (105 *kDa*), όπως επίσης διακρίνονται και τουλάχιστον τρεις άλλες ζώνες μικρότερου μοριακού βάρους. Αυτά τα μικρά πολυπεπτίδια παρατηρήθηκε ότι πάντα συνδέονται με το καθαρό ένζυμο και το άθροισμα του μοριακού βάρους των δύο μικρών κύριων ζωνών (55 *kDa* και 48 *kDa*) αντιστοιχεί περίπου σε εκείνο του μονομερούς της φωσφορυλάσης (105 *kDa*). Όταν ένα αντίσωμα φωσφορυλάσης που δημιουργήθηκε έναντι του μονομερούς ενζύμου χρησιμοποιήθηκε για το απομονωμένο ένζυμο και για πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από βολβούς γεωμήλων, δεν ελήφθη ένα θετικό σήμα μόνο για το μονομερές των 105 *kDa* αλλά και για τα πολυπεπτίδια μικρότερου μοριακού βάρους (Εικόνα 7, Β και C, αντιστοίχως). Το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον προσδιορισμό της έκτασης της συσσώρευσης του ενζύμου στους βολβούς γεωμήλου που συλλέχθηκαν σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Σε νεαρούς βολβούς, μόνο το άθικτο μονομερές φωσφορυλάσης ήταν παρόν (Εικόνα 7E), ενώ τα προϊόντα μικρότερου μοριακού βάρους που παρατηρήθηκαν στο καθαρό ενζυμικό παρασκεύασμα εμφανίστηκαν προοδευτικά σε μεταγενέστερα στάδια της ωρίμανσης των κονδύλων (Εικόνα 7 D, νέοι κόνδυλοι, και Εικόνα 7C, ώριμοι κόνδυλοι) (Brisson et al., 1989)

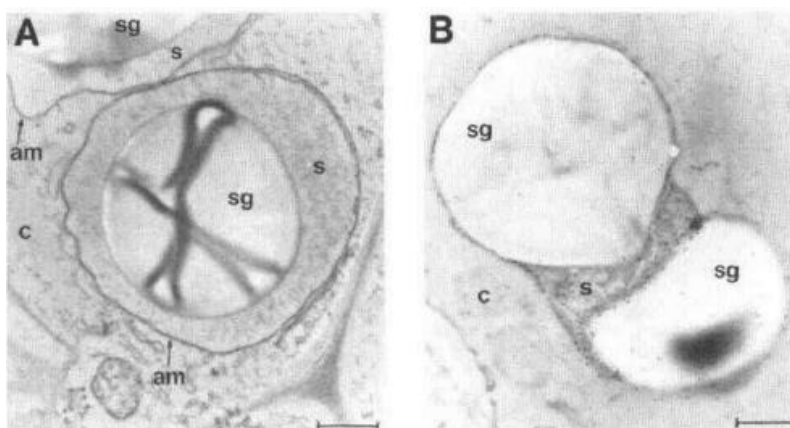


**Εικόνα 7 :** Βαθμός πρωτεόλυσης της φωσφορυλάσης σε ρίζες πατάτας (A) Πηκτή ακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE) με δείγμα Φωσφορυλάση του αμύλου απομονωμένη και καθαρισμένη από ώριμους βολβούς πατάτας. Η χρώση έγινε με *Coomassie Blue* (20  $\mu$ g). (B) έως (E) Ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα φωσφορυλάσης. (B) Φωσφορυλάση απομονωμένες από ώριμους βολβούς πατάτας (1 $\mu$ g), συνολικές πρωτεΐνες (100  $\mu$ g σε κάθε διαδρομή) από ώριμες (C), νέες (D) και πολύ νέες (E) ρίζες πατάτας (Brisson et al., 1989).

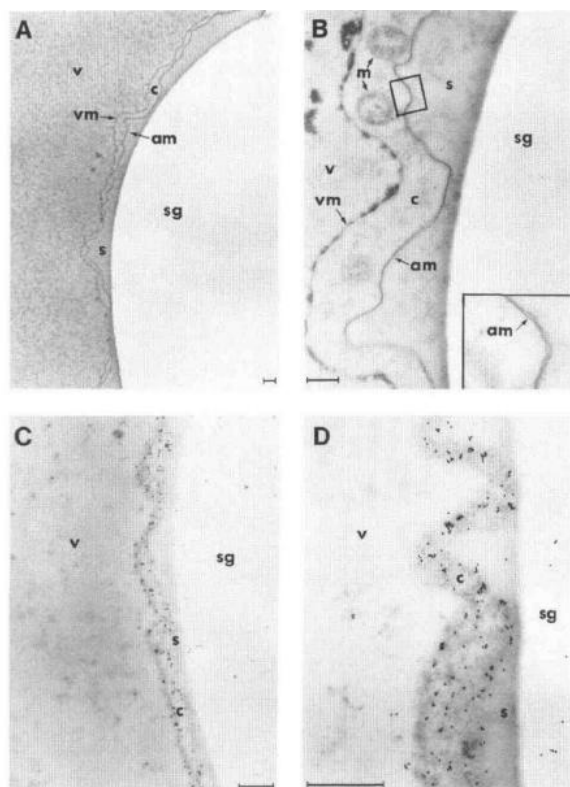
Η πρωτεόλυση δεν μπορούσε να μειωθεί τροποποιώντας τη διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού ή χρησιμοποιώντας συνδυασμούς διαφόρων αναστολέων πρωτεασών, υποδεικνύοντας πάλι ότι συμβαίνει πρωτεόλυση *in vivo* και δεν είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας απομόνωσης. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα η πρωτεόλυση να συμβαίνει *in vitro* από πρωτεάσες που παράγονται κατά την ανάπτυξη των βολβών πατάτας (Brisson et al., 1989).

### 2.2.3 Διαμερισματοποίηση της PSP

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός της φωσφορυλάσης του αμύλου παρατηρήθηκε να εξαρτάται από την ηλικία, καθώς σε νέες ρίζες γεωμήλων όλο το ένζυμο περιέχεται εντός του στρώματος των αμυλοπλαστών, ενώ η φωσφορυλάση των ώριμων βολβών είναι κυτταροπλασματική (Εικόνες 8 και 9). Είναι γνωστό ότι η εισαγωγή σε πλαστίδια μιας πυρηνικά κωδικοποιημένης πρωτεΐνης απαιτεί αυτή η πρωτεΐνη να συντίθεται ως πρόδρομος με ένα *N*-τελικό μεταβατικό πεπτιδίο (Brisson et al., 1989). Αυτή η αλληλουχία στη συνέχεια απομακρύνεται μέσα στο οργανίδιο με πρωτεολυτική διάσπαση για παραγωγή της ώριμης πρωτεΐνης (Della-Cioppa, Kishore, Beachy, & Fraley, 1987). Μια σύγκριση του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών από την *in vitro* μετάφραση στους νέους και ώριμους κονδύλους, αποκάλυψε ότι και στους δύο ιστούς το μονομερές της φωσφορυλάσης συντίθεται ως πρόδρομος των 112 *kDa* (Brisson et al., 1989).



**Εικόνα 8 :** Ανοσοκυτταρολογικός εντοπισμός της φωσφορυλάσης σε πολύ νεαρά κύτταρα βολβών γεωμήλου. (Α) Λεπτά τμήματα από το μυελώδες τμήμα πολύ νεαρών κονδύλων σταθεροποιημένα με τετροξείδιο του οσμίου. (Β) Λεπτά τμήματα από το μυελώδες τμήμα πολύ νεαρών κονδύλων που έχουν σταθεροποιηθεί με γλουταραλδεΐδη και έχουν αντιδράσει με αντίσωμα φωσφορυλάσης και στη συνέχεια με αντίσωμα συζευγμένο με χρυσό (Brisson et al., 1989). *am*: διπλή μεμβράνη αμυλοπλάστη, *s*: στρώμα, *c*: κυτταρόπλασμα, *sg*: κοκκίο αμύλου. *Bar*= 1μm



**Εικόνα 9 :** Ανοσοκυτταρολογικός εντοπισμός της φωσφορυλάσης σε ώριμα κύτταρα κονδύλων πατάτας. (Α) και (Β) Λεπτά τμήματα από το μυελώδες ώριμων κονδύλων που σταθεροποιήθηκαν με τετροξείδιο του οσμίου. Το ένθεμα στο (Β) δείχνει τη μεγέθυνση της διπλής μεμβράνης των αμυλοπλαστών, (C) και (D) Λεπτά τμήματα από το μυελώδες τμήμα ώριμων κονδύλων που σταθεροποιήθηκαν με γλουταραλδεΐδη. Τα τμήματα αντέδρασαν με αντίσωμα φωσφορυλάσης, και μετά με αντίσωμα συζευγμένο με χρυσό (Brisson et al., 1989). *am*: διπλή μεμβράνη αμυλοπλάστη, *s*: στρώμα, *c*: κυτταρόπλασμα, *v*: κενοσωμάτιο, *vm*: μεμβράνη κενοσωματίων, *sg*: κοκκίο αμύλου. *Bar*= 0.5μm

## 2.2.4 Σύγκριση της φωσφορυλάσης του αμύλου από γεώμηλα (PSP) και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από μύες κόνικλων ( gmGP)

Η μυϊκή φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι διμερής, με το μοριακό βάρος του μονομερούς να είναι 97.4 *kDa* και υπάρχει σε δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές: μια συνήθως ενεργό φωσφορυλάση *a* και μια συνήθως ανενεργό φωσφορυλάση *b*. Κάθε μία από τις δύο αυτές μορφές βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ μιας ενεργούς



χαλαρής *R* και μιας πολύ λίγο ενεργού τεταμένης κατάστασης *T*, όμως η ισορροπία για τη φωσφορυλάση *a* ευνοεί την κατάσταση *R* ενώ η ισορροπία για την φωσφορυλάση *b* ευνοεί την κατάσταση *T*. Η φωσφορυλάση *a* και η φωσφορυλάση *b* διαφέρουν κατά μία φωσφορική ομάδα σε κάθε υπομονάδα. Η φωσφορυλάση *b* μετατρέπεται στη φωσφορυλάση *a* όταν αυτή φωσφορυλιώνεται σε ένα απλό κατάλοιπο σερίνης (*Ser 14*) σε κάθε υπομονάδα, από το ρυθμιστικό ένζυμο κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Επίσης απαιτείται η πρόσδεση ενός μορίου φωσφορικής πυριδοξάλης (*PLP*) για την πραγματοποίηση της φωσφορολυτικής αντίδρασης (Berg JM, 2012).

Όπως αναφέρθηκε, η φωσφορυλάση του αμύλου από γεώμηλα είναι μια διμερής πρωτεΐνη με μοριακό βάρος μονομερούς 104 *kDa*. Η *PSP* απομονώνεται μόνο στην ενεργή της μορφή, περιέχει ένα μόριο *PLP* και δεν φωσφορυλιώνεται από την κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Fukui, Shimomura, & Nakano, 1982) .

#### 2.2.4.1 Σύγκριση της αντίδρασης κατάλυσης

Η δραστικότητα της *rmGPb* εξαρτάται πλήρως από την παρουσία της *AMP* και η κινητική εμφανίζει σιγμοειδής καμπύλη. Η *rmGPa* έχει διακριτές αλλοστερικές ιδιότητες απουσία της *AMP*. Το ιδανικό *pH* αντίδρασης και για τα δύο ένζυμα είναι κοντά στην τιμή 6.5. Η  $\alpha$ -*D*-γλυκόζη λειτουργεί ως συναγωνιστικός αναστολέας για την *rmGP*. Ωστόσο η *rmGPa* και η *PSP* δεν αναστέλλονται ισχυρά από αυτό το σάκχαρο. Γενικά οι μυϊκές φωσφορυλάσες έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για διακλαδισμένους πολυσακχαρίτες (γλυκογόνο, αμυλοπεκτίνη) σε σχέση με γραμμικούς πολυσακχαρίτες (αμυλόζη, μαλτοδεξτρίνες) σε αντίθεση με την *PSP* που παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια για γραμμικούς πολυσακχαρίτες και την αμυλοπεκτίνη, αλλά όχι για το γλυκογόνο. Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν βρεθεί ότι αναστέλλουν ισχυρά τη σύνθεση του αμύλου από την *PSP* δρώντας ανταγωνιστικά ως προς την αμυλοπεκτίνη, αλλά δεν επηρεάζουν την *rmGP*, υποδηλώνοντας τις διαφορές στα κέντρα πρόσδεσης μεταξύ των δύο ενζύμων (Fukui et al., 1982).

## 2.2.4.2 Δομικές διαφορές των *rmGPb* και *PSP*



**Εικόνα 10**: Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της *rmGPb* (r) και της *L-PSP* (p). Η αρίθμηση των αμινοξέων είναι σύμφωνα με την *rmGP*.

Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των *rmGPb* και *L-PSP* δείχνει ότι τα δύο ένζυμα είναι κατά 43 % όμοια, με την *PSP* να είναι κατά δύο αμινοξέα μακρύτερη στο *N*-τελικό άκρο και κατά εννέα αμινοξέα κοντύτερη στο *C*-τελικό άκρο. Η θέση δέσμευσης για την *PLP* είναι ιδιαίτερα συντηρημένη ανάμεσα στα δύο ένζυμα. Η μεγάλη τους διαφορά έγκειται στην ένθεση των 78 αμινοξέων στην *L-PSP* που είναι κυρίως υπεύθυνη για τη διαφορά στο μοριακό βάρος των δύο ενζύμων αλλά και στην ανομοιότητα της αμινοξικής αλληλουχίας στο *N*-τελικό άκρο των δύο ενζύμων που έχει ως αποτέλεσμα τις διαφορετικές ρυθμιστικές ιδιότητες μεταξύ των δύο φωσφορυλασών. Η περιοχή *L78* βρίσκεται στην ένωση των *N*- και *C*-τελικών περιοχών και γειτονικά του κέντρου αποθήκευσης του γλυκογόνου (αμινοξέα 382-444) στην *rmGP*. Σημαντική διαφορά παρατηρείται στο βρόχο *280s* (αμινοξέα 282-286) που συγκροτεί το κέντρο αναστολής και στα αμινοξέα 610-615 στην *rmGP*,

καθώς στην *L-PSP* δύο από τα αμινοξέα που συνδέονται με τον αναστολέα (*Phe285*, *Tyr612*) δεν είναι συντηρημένα.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των υπομονάδων στην *gmGP* πραγματοποιείται μέσω 270 αμινοξέων στην *N*-τελική περιοχή (αμινοξέα 5-18, 28-43, 51, 61-73, 113-117, 162-196, 246-298). Όσον αφορά την *PSP* παρατηρείται ισχυρότερη αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο υπομονάδων τους, παρά την τοπολογική ομοιότητα των αλληλεπιδράσεων των υπομονάδων των δύο ενζύμων (Fukui et al., 1982; Nakano & Fukui, 1986).

### 2.2.5 Προέλευση της *PSP*

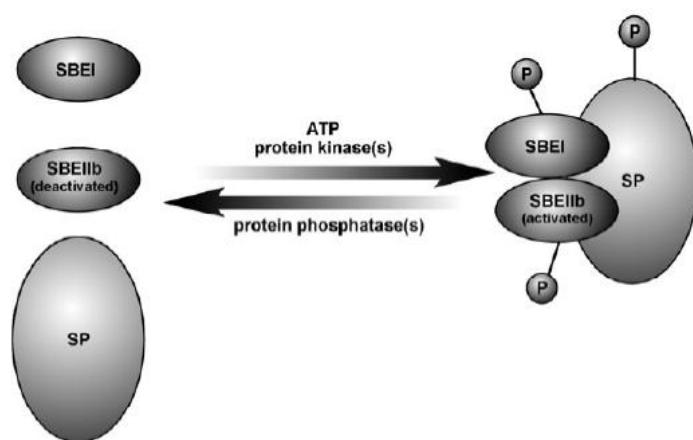
Έχει προταθεί ότι το γονίδιο της φωσφορυλάσης προέκυψε από την ένωση δύο γονιδίων, που το καθένα κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 50 *kDa*. Δεν υπάρχουν ξεκάθαρα ευρήματα για αυτά τα αρχέγονα γονίδια, ενώ δεν παρατηρούνται δομικές και λειτουργικές σχέσεις μεταξύ της φωσφορυλάσης και άλλων *B6* - εξαρτώμενων ενζύμων. Ωστόσο, έχει βρεθεί μεγάλη τοπολογική ομοιότητα μεταξύ της καρβοξυτελικής περιοχής της μυϊκής φωσφορυλάσης από κονίκλους και των δεϋδρογονασών. Το αρχέγονο ένζυμο μπορεί να μην διέθετε ρυθμιστικές ιδιότητες και να παρουσίαζε μεγάλη συγγένεια για τις  $\alpha$ -1,4 γλυκάνες και το μοριακό του βάρος να ήταν όμοιο με αυτό της *H-PSP*.

Η ένθεση των 78 αμινοξέων στην *L-PSP* βρίσκεται στην ένωση της *N*- και *C*-τελικής περιοχής και γειτονικά στην περιοχή που αντιστοιχεί στο κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου για τη μυϊκή φωσφορυλάση από κονίκλους. Η αλληλουχία που περιέχει την ένθεση μαζί με τις παρακείμενες περιοχές (αμινοξέα 402-510) είναι ασυνήθιστη καθώς περιέχει πολλά ιονισμένα αμινοξέα (*Asp*, *Glu*, *Lys*) και λίγα αρωματικά αμινοξέα (Nakano & Fukui, 1986). Η αλληλουχία αυτών των περιοχών είναι πιθανό να προέκυψε από άλλες πρωτεΐνες (ή από γειτονικά ιντρόνια μέσω αλλαγής του μηχανισμού ματίσματος) και μπορεί να εισήχθη στην *L-PSP* αργότερα συγκριτικά με την ένωση των γονιδίων παράγοντας πολλούς τύπους φωσφορυλασών μαζί με την προσθήκη των 50 πεπτιδίων στο *N*-τελικό άκρο του μεταβατικού πεπτιδίου (Mori et al., 1993). Μια άλλη περίπτωση είναι τα δύο ένζυμα (*L*- και *H*- *PSP*) διαφορετικού μοριακού βάρους, να προήλθαν την ίδια χρονική περίοδο από διαφορετικές ενώσεις μικρότερων γονιδίων (Nakano & Fukui, 1986).

### 2.2.6 Ρύθμιση της δράσης της Φωσφορυλάσης του αμύλου (SP)

Έχουν παρατηρηθεί πολλοί μηχανισμοί ρύθμισης για τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του αμύλου, οι οποίοι περιλαμβάνουν την εξάρτηση από το *pH* και το επίπεδο των ολιγοσακχαριτών, αλλοστερικές και ομοιοπολικές τροποποιήσεις. Ως έμμεσος μηχανισμός ρύθμισης λειτουργεί και η διαφορετική διαμερισματοποίηση των ενζύμων μέσα στο κύτταρο (Rathore et al., 2009).

Ένας πιθανός μηχανισμός για το συντονισμό και τον έλεγχο της δράσης των ενζύμων που συμμετέχουν στη σύνθεση και την αποικοδόμηση του αμύλου περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, και επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων των υπομονάδων των ενζύμων μεταξύ τους αλλά και με υποκυτταρικές δομές, μικρά μόρια και νουκλεϊκά οξέα. Οι Tetlow et al. 2004 απομόνωσαν αμυλοπλάστες από ενδόσπερμα σιτηρών και διαπίστωσαν ότι κάποια ένζυμα κλειδιά της βιοσύνθεσης του αμύλου σχηματίζουν σύμπλοκα πρωτεϊνών, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο ακριβής τους ρόλος. Έχει προταθεί ότι η *SP* συμμετέχει στη σύνθεση του αμύλου μέσω δύο μηχανισμών. Στον πρώτο μηχανισμό τα προϊόντα της αντίδρασης που καταλύει η *SP* μπορούν να χρησιμοποιηθούν από το ένζυμο αποδιακλάδωσης (*SBE*) που προσθέτει σημεία διακλάδωσης στις αλυσίδες γλυκάνης, δρώντας έτσι στο μονοπάτι σύνθεσης. Στο δεύτερο μηχανισμό η *SP* δρα μετά το *SBE* καταλύοντας την αντίδραση φωσφορύλισης της αμυλοπεκτίνης προς παραγωγή *G1P* στον αμυλοπλάστη. Η *G1P* μπορεί να μετατραπεί στη συνέχεια σε *ADP*-γλυκόζη από την *AGPase* και να μετατραπεί ξανά σε άμυλο. Η *SP* μπορεί να δράσει ως μια πρωτεΐνη σκαλωσιά για άλλες πρωτεΐνες συγκροτώντας ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, τα ένζυμα του οποίου μπορεί να εμφανίζουν αλλαγές στη διαμόρφωση και στις κινητικές τους ιδιότητες (I. J. Tetlow et al., 2004).



**Εικόνα 11 :** Ενεργοποίηση των *SBEI*, *SBEIIb* και *SP* με φωσφορυλίωση και δημιουργία του πρωτεϊνικού συμπλόκου που προωθεί τη σύνθεση της αμυλοπεκτίνης (I. J. Tetlow et al., 2004).

### 2.2.6 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές της φωσφορυλάσης του αμύλου (SP)

Ανάμεσα σε όλες τις φωσφορυλάσες, η φωσφορυλάση του αμύλου μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία. Μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλά βιοτεχνολογικά πεδία και τομείς που αφορούν την παραγωγή φαγητού, την κοσμητική, τη διάσπαση πλαστικών, την παραγωγή φαρμάκων τροποποιώντας την θερμική της σταθερότητα και τη συγγένεια για το υπόστρωμα της.

Η *SP* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή της *G1P*, τη σύνθεση αμυλόζης και μιας πληθώρας σημαντικών πολυσακχαριτών όπως είναι το άμυλο και οι τροποποιημένες μορφές αμύλου από διαγονιδιακά φυτά. Η *SP* έχει πλεονέκτημα έναντι των άλλων ενζύμων καθώς το άμυλο είναι φθινό και η ενζυμική αντίδραση που καταλύει είναι οικονομική ενισχύοντας την βιοτεχνολογική της σημασία. Οι πολυσακχαρίτες και τα παράγωγα τους είναι χρήσιμοι στις βιομηχανίες σύνθεσης αμύλου, σε πρόσθετα φαγητών και σε βιομηχανίες βιοδιασπώμενων πλαστικών. Η αμυλόζη μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα όπου μπορούν να εισαχθούν μόρια και να εφαρμοστεί στη μεταφορά μορίων φαρμάκων στα πλαίσια της νανοτεχνολογίας. Η *SP*, επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της ποσότητας του ανόργανου φωσφόρου στο περιβάλλον αλλά και λειτουργώντας ως ανιχνευτής για το ανόργανο φώσφορο και σε παθολογικές καταστάσεις στους οργανισμούς (Rathore et al., 2009).

## 3. Κρυσταλλογραφία

### 3.1 Τι είναι κρύσταλλος;

Οι κρύσταλλοι είναι στερεά σώματα που αποτελούνται από ακριβείς επαναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου. Τα μόρια σε ένα κρύσταλλο τοποθετούνται με τάξη, δηλαδή κανονικά, συμμετρικά και επαναλαμβανόμενα. Η μονάδα που περιγράφει έναν κρύσταλλο είναι η μοναδιαία κυψελίδα. Κατά συνέπεια ένας κρύσταλλος μπορεί να παραχθεί από ένα μόριο, επαναλαμβάνοντας την εφαρμογή ενός συνόλου πράξεων (ή τελεστών) συμμετρίας (μετατόπισης ή στροφής). Κατά συνέπεια στην περιγραφή ενός κρυστάλλου χρειάζεται να περιγραφεί μόνο η λιγότερο συμμετρική μονάδα καθώς και η συμμετρία που μας δίνει ένα κρύσταλλο. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα περιλαμβάνει όλα τα άτομα των μοτίβων του κρυσταλλικού πλέγματος και της ασύμμετρης μονάδας. Οι ακμές της μοναδιαίας κυψελίδας ορίζουν ένα σύνολο μοναδιαίων διανυσματικών αξόνων  $a$ ,  $b$  και  $c$ , με τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας να απεικονίζονται στα αντίστοιχα μήκη τους  $a$ ,  $b$  και  $c$ . Η σχέση μεταξύ των μηκών  $a$ ,  $b$ , και  $c$  και των γωνιών μεταξύ των αξόνων καθορίζουν μοναδικά τη

μορφή και το μέγεθος της μοναδιαίας κυψελίδας. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί για τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας. Ένας κρύσταλλος είναι μια επαναλαμβανόμενη σε τρεις διαστάσεις διάταξη (χωρίς κενά) των μοναδιαίων κυψελίδων, που οικοδομεί ένα κρυσταλλικό πλέγμα και κατασκευάζεται με τη μετατόπιση των μοναδιαίων κυψελίδων σε τρεις διαστάσεις, ώστε να γεμίσει ένας όγκος. Η μοναδιαία κυψελίδα κατασκευάζεται με τη μετατόπιση του επαναλαμβανόμενου μοτίβου (τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος) και το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος παράγεται με την εφαρμογή των πράξεων συμμετρίας στην ασύμμετρη μονάδα. Η μορφολογία ενός κρυστάλλου καθορίζεται από το μέγεθος και τη μορφή μιας μοναδιαίας κυψελίδας (τα μήκη του  $a$ , του  $b$  και του  $c$  και τις γωνίες του) καθώς και από τη συμμετρία του μοτίβου. Οι περιορισμοί που τίθενται για τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας επιτρέπουν την κατασκευή 14 μοναδικών κρυσταλλικών πλεγμάτων. Αυτά είναι τα κρυσταλλικά πλέγματα Bravais. Ο συνδυασμός των 32 τύπων συμμετρίας μαζί με τα 14 κρυσταλλικά πλέγματα Bravais περιγράφουν όλες τις πιθανές μορφολογίες των κρυστάλλων που παράγουν τις μορφές και τη συμμετρία 230 διαφορετικών ομάδων χώρου, όπου κάθε ομάδα χώρου καθορίζει μοναδικά τον αριθμό των ασύμμετρων μονάδων, που συναποτελούν τη μοναδιαία κυψελίδα του κρυστάλλου (Kensal E. van Holde, 2006).

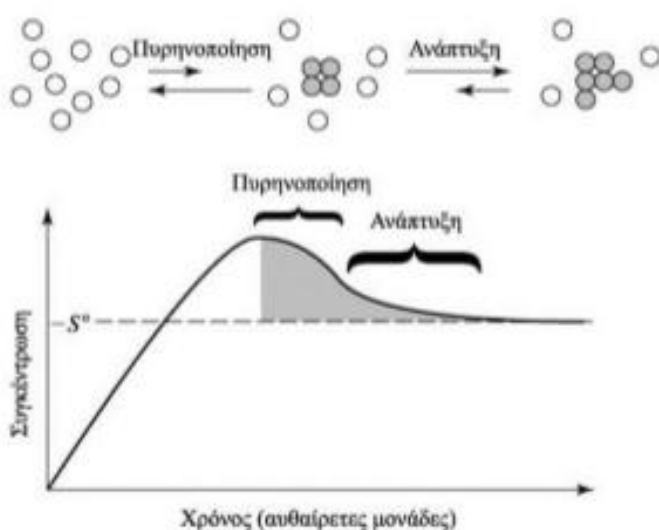
### 3.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων

Ένας κρύσταλλος είναι ένα στερεό σώμα, αλλά τα μακρομόρια υπάρχουν συνήθως σε μορφή υδατικών διαλυμάτων. Κατά συνέπεια για την δημιουργία ενός κρυστάλλου πρέπει τα διαλελυμένα μόρια να οδηγηθούν εκτός διαλύματος ή να κατακρημνιστούν με έναν ελεγχόμενο τρόπο που να ευνοεί την τάξη. Ένα μόριο εγκαταλείπει το διάλυμα, όταν η συγκέντρωση του υπερβεί την εγγενή του διαλυτότητα  $S_0$  ( η  $S_0$  δεν είναι πραγματικά μια εγγενής ιδιότητα, αλλά εξαρτάται από εξωγενείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, της πίεσης και του διαλύτη. Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου απαιτεί την αύξηση της συγκέντρωσης του υλικού στην υπέρκορη κατάσταση. Η συγκέντρωση του μορίου μπορεί να αυξηθεί με την αφαίρεση μέρος του διαλύτη, προκειμένου να μειωθεί ο συνολικός όγκος του διαλύματος. Μια δεύτερη στρατηγική για την κατακρήμνιση ενός μορίου είναι να μειωθεί η εγγενής του διαλυτότητα  $S_0$  για μια σταθερή συγκέντρωση του υλικού, μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία ή τροποποιώντας το διαλύτη (με αύξηση ή μείωση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος). Η βέλτιστη διαλυτότητα πολυηλεκτρολυτών όπως πολυπεπτίδια ή πολυνουκλεοτίδια εμπίπτει σε μια συγκεκριμένη περιοχή των συγκεντρώσεων αλάτων. Εάν η ιοντική ισχύς του διαλύματος αυξηθεί πέραν αυτής της περιοχής με την προσθήκη άλατος ή με εξάτμιση, ή μειωθεί κάτω από αυτήν με διαπίδυση, η

εγγενής διαλυτότητα θα μειωθεί και το μόριο θα κατακρημνιστεί. Αυτές είναι οι τυπικές διαδικασίες εναλάτωσης (*salting in*) και εξαλάτωσης (*salting out*) που χρησιμοποιούνται σε πολλές τεχνικές καθαρισμού μορίων. Υπάρχουν διάφοροι σημαντικοί παράγοντες, που επηρεάζουν την κρυστάλλωση ενός μορίου. Ο σημαντικότερος είναι η καθαρότητα του δείγματος. Ένα δείγμα θεωρείται ως βιοχημικά καθαρό, όταν κάθε μακρομόριο στο δείγμα έχει τον ίδιο μοριακό τύπο. Αυτή είναι η ιδανική κατάσταση και γενικά δεν επιτυγχάνεται. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένα μακρομόριο πρέπει να είναι περισσότερο από 95% καθαρό για να κρυσταλλωθεί. Ακόμη και ένα χημικά καθαρό δείγμα μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα ιδιαίτερα ετερογενή πληθυσμό διαμορφώσεων. Έτσι, τα διαλύματα και οι μέθοδοι κρυστάλλωσης επιλέγονται ώστε να διαμορφώσουν τη φυσική διαμόρφωση του μακρομορίου. Η κρυστάλλωση ενός μακρομορίου απαιτεί την εύρεση συνθηκών που ισορροπούν τη διαλυτότητα με τη δομική ομοιογένεια, ενώ παραμένει δύσκολος ο προσδιορισμός των συγκεκριμένων συνθηκών κρυστάλλωσης ακόμα και αν είναι γνωστές οι συνθήκες υπό τις οποίες ένα μακρομόριο έχει μια σταθερή στερεοδομή και είναι αδιάλυτο. Για αυτό το λόγο η εύρεση των συνθηκών κρυστάλλωσης είναι ουσιαστικά αποτέλεσμα εμπειρικών δοκιμών, που το μόριο τοποθετείται σε πλήθος διαφορετικών συνθηκών διαλύματος με στόχο την ανάπτυξη κρυστάλλου (Kensal E. van Holde, 2006).

Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου συμβαίνει σε δύο διακριτά βήματα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 12 :

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



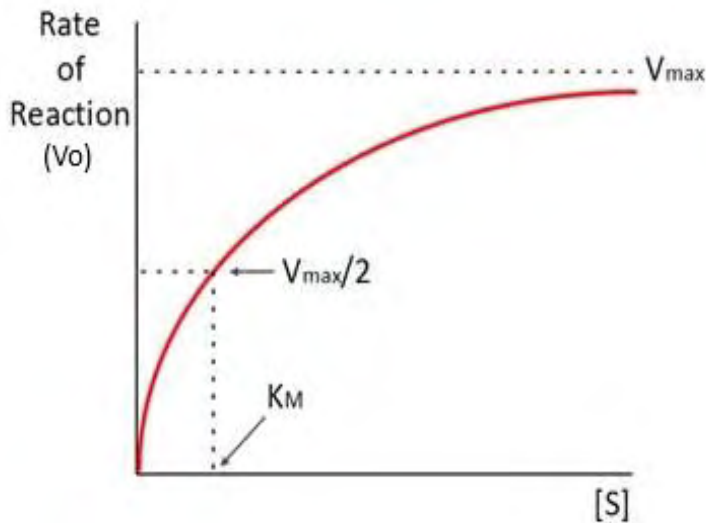
**Εικόνα 12** : Ο μηχανισμός της κρυστάλλωσης. Το αρχικό βήμα είναι ο σχηματισμός κρυστάλλων ενός ελάχιστου κρυσταλλικού πλέγματος. Αυτό είναι ένα μικρής πιθανότητας βήμα που εμφανίζεται σε ένα υπέρκορο διάλυμα. Ο κρύσταλλος αναπτύσσεται με την προσθήκη μορίων στην επιφάνεια του πυρήνα. Αυτό συμβαίνει σε συγκέντρωση κοντά στην εγγενή διαλυτότητα  $S_0$  (Kensal E. van Holde, 2006)

Το στάδιο της πυρήνωσης απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη. Η απαραίτητη οδηγός δύναμη για την πυρήνωση προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή αρκετά υψηλότερη από την εγγενή τους διαλυτότητα (υπερκορεσμός). Η επακόλουθη προσθήκη μορίων στις κρυσταλλικές επιφάνειες λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τον υπερκορεσμό, κοντά στην εγγενή διαλυτότητα. Κατά συνέπεια, η αύξηση είναι μια σειρά βημάτων μικροϊσορροπίας για τα μακρομόρια του διαλύματος που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του κρυσταλλικού πλέγματος. Η πυρήνωση είναι το σημαντικότερο από τα δύο βήματα. Εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, ο πυρήνας δε σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλαπλούς πυρήνες, που θα εξαντλήσουν γρήγορα τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μία πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Πρέπει να υπάρξει μία ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν αρκούντως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παρέχουν υψηλής ευκρίνειας δεδομένα περίθλασης ακτίνων Χ. Άρα το διάλυμα των μακρομορίων πρέπει να συμπυκνωθεί με έναν πολύ καλά ελεγχόμενο τρόπο (Kensal E. van Holde, 2006).

#### 4. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

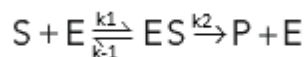
Η πρωταρχική λειτουργία των ενζύμων είναι να αυξάνουν τις ταχύτητες των αντιδράσεων, έτσι ώστε να είναι συμβατές με τις ανάγκες του οργανισμού. Για πολλά ένζυμα η ταχύτητα της κατάλυσης  $V_0$ , η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του προϊόντος που σχηματίζονται ανά δευτερόλεπτο, μεταβάλλεται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος,  $[S]$ . Η ταχύτητα της κατάλυσης αυξάνεται γραμμικά καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος και στη συνέχεια αρχίζει να σταθεροποιείται και να πλησιάζει μια μέγιστη τιμή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Πριν από περίπου 100 χρόνια οι *Michaelis* και *Menten* δημοσίευσαν την, πολύ διαδεδομένη πλέον, κλασική δημοσίευση, μέσα από την οποία έδειξαν ότι ο ρυθμός μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται από την εξίσωση *Michaelis-Menten*, είναι ανάλογος με τη συγκέντρωση του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, όπως δείχνεται και από την εξίσωση *Michaelis-Menten*, χρησιμοποιώντας της ιμπερτάση ως ένζυμο για τις μελέτες τους (Michaelis, Menten, Johnson, & Goody, 2011).





**Εικόνα 13 :** Διάγραμμα της ταχύτητας  $V_o$  μιας ενζυμικής αντίδρασης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $[S]$ , για ένα ένζυμο που υπακούει στην κινητική *Michaelis-Menten*, όπου η μέγιστη ταχύτητα  $V_{max}$  προσεγγίζεται ασυμπτωματικά. Η σταθερά  $K_M$  είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί στο μισό της μέγιστης ταχύτητας  $V_{max}/2$ .

Το μοντέλο που προτάθηκε το οποίο είναι το απλούστερο που εξηγεί τις κινητικές ιδιότητες πολλών ενζύμων, είναι :



Όπου:

$k_1, k_2, k_{-1}$  : οι σταθερές ταχύτητας των αντίστοιχων αντιδράσεων

S: υπόστρωμα

ES: σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P: προϊόν

Για να απλοποιηθούν τα πράγματα χρησιμοποιείται η υπόθεση της σταθεροποιημένης κατάστασης (*steady state*). Στη σταθερή κατάσταση οι συγκεντρώσεις των ενδιάμεσων, στην περίπτωση αυτή το ES, παραμένουν σταθερές, ενώ οι συγκεντρώσεις των αρχικών ενώσεων και των προϊόντων αλλάζουν.

Οι Michaelis και Menten κατέληξαν στη μαθηματική σχέση:

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

Όπου  $V_o$ : η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης,  $V_{max}$  : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Η μέγιστη ταχύτητα  $V_{max}$  αποκαλύπτει τον ρυθμό μετατροπής ενός ενζύμου, ο οποίος είναι ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετατρέπονται σε προϊόν ανά μονάδα χρόνου από ένα μόριο ενζύμου όταν το

ένζυμο είναι πλήρως κορεσμένο με υπόστρωμα. Η μέγιστη ταχύτητα,  $V_{max}$ , ισούται με την κινητική σταθερά  $k_2$ , η οποία ονομάζεται και  $k_{cat}$ .

$K_M$ : σταθερά Michaelis Menten που ορίζεται ως :

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

Επισημαίνεται ότι η  $K_M$  έχει μονάδες συγκέντρωσης. Είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αλληλεπιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος. Όταν  $[S]=K_M$ , τότε  $V_o=V_{max}/2$ . Έτσι η  $K_M$  είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η  $[S]$  είναι πολύ μικρότερη από την  $K_M$ ,  $V_o=(V_{max}/K_M)/[S]$ , δηλαδή η ταχύτητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, όταν η  $[S]$  είναι πολύ μεγαλύτερη από την  $K_M$ ,  $V_o=V_{max}$ , δηλαδή η ταχύτητα είναι μέγιστη, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του υποστρώματος (Berg JM, 2012).

## 5. Υλικά και μέθοδοι

### 5.1 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
Acetic acid (CH <sub>3</sub> COOH)	Sds
α-D-Glucose 1-Phosphate Dipotassium Salt hydrate	Sigma
Acrylamide	Serva
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma
Adenosine Triphosphate (ATP)	Sigma
Ammonium Molybdate	Sigma
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Ammonium sulfate	ChemLab
Bis acrylamide	Serva
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay 5x	Biorad
Bromophenole blue	Research Organics
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Panreac
Glycogen from oyster type II	Sigma
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Appllichem
KHCO <sub>3</sub>	Merck
L-Ascorbic acid	Sigma

NaCl	Scharleu
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
NaOH	Merck
PMSF	AppliChem
Potassium chloride (KCl)	Merck
SDS	Serva
Sodium carbonate anhydrous	Sds
Sodium citrate	Appllichem
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Spermine	Sigma
Starch	Merck
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra Pure	Appllichem
Zinc acetate	Sigma
α-D-glucose-1-Phosphate	Sigma
Πυκνό διάλυμα αμμωνίας	Fluka
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Appllichem

## 5.2 Οργανολογία

Όργανο	Εταιρεία
Φυγόκεντρος - Z36HK	HermLe
Πεχάμετρο	Metrohm
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρηση (mini gel)	BioRad
Υδατόλουτρο, WiseBath	Wisd
Φωτόμετρο	VWR
ÄKTA Purifier (FPLC)	GE Healthcare Life Sciences
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.45 μM	Sartorius Stedim
Φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.2 μM	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 100000 cut-off	Sartorius Stedim
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 30000 cut-off	Sartorius Stedim
Μεμβράνες διαπίδυσης	Sigma
Θερμόμετρο	

## 5.3 Στήλες υγρής χρωματογραφίας

DEAE Cellulose XK 50/20	GE Healthcare
Superose 12 10/300	GE Healthcare

## 5.4 Υγρή χρωματογραφία –Σύστημα FPLC

Η χρωματογραφία περιλαμβάνει μια ποικιλία τεχνικών που διαχωρίζουν μίγματα τα οποία περνάνε δια μέσου πορώδους υλικού, με διαφορετική ταχύτητα μετατόπισης των συστατικών τους. Σε αυτές τις διαδικασίες τα συστατικά του μίγματος διαχωρίζονται ως αποτέλεσμα της συνάφειας των ουσιών με μια στατική φάση (στερεή ή υγρή) ή μια κινούμενη φάση (αέρια ή υγρή). Τα κύρια φαινόμενα είναι η προσρόφηση, η ανταλλαγή ιόντων και η διάλυση σε μια στατική μήτρα ή διαλύτη. Οι

διάφορες μορφές χρωματογραφίας περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα από αυτά τα φαινόμενα, ενώ κατά την διάρκεια μιας χρωματογραφικής ανάλυσης λαμβάνουν χώρα δύο ή περισσότερα φαινόμενα (Clark John M. Jr, 2005).

Το είδος της χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται υγρές κινητές φάσεις ονομάζεται υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC). Στην υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός συμβαίνει στη στήλη που αποτελεί την στατική φάση. Ο όγκος και το σχήμα της στήλης εξαρτάται από την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται αλλά και από την χρωματογραφική μέθοδο που χρησιμοποιείται. Η στατική φάση πακετάρεται στη στήλη και όσο το δείγμα διέρχεται από τη στατική φάση, συμβαίνει ο διαχωρισμός.

Τα κυριότερα είδη χρωματογραφίας είναι: χρωματογραφία συγγένειας, χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, χρωματογραφία μοριακής διήθησης, χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (Clark John M. Jr, 2005).

#### **5.4.1 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής**

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

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

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

#### ➤ Εξισορρόπηση

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

#### ➤ Εισαγωγή του δείγματος και πλύση

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

#### ➤ Έκλυση

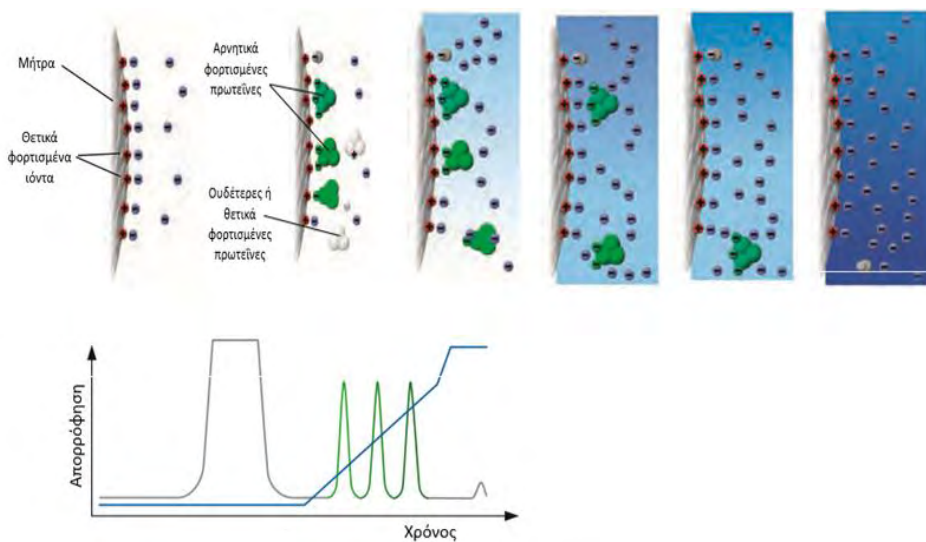
Αφού φορτωθεί όλο το δείγμα και η στήλη πλυθεί με διάλυμα εξισορρόπησης, οι συνθήκες μεταβάλλονται για να εκλουθούν οι δεσμευμένες πρωτεΐνες. Πιο συχνά, οι πρωτεΐνες εκκλύονται αυξάνοντας την ιοντική ισχύ (συγκέντρωση άλατος) του διαλύματος ή αλλάζοντας το pH. Καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνει, τα ιόντα των αλάτων

(τυπικά  $\text{Na}^+$  ή  $\text{Cl}^-$ ) ανταγωνίζονται τους προσδεμένους παράγοντες στις φορισμένες ομάδες της επιφάνειας του υλικού της στήλης και ένα ή περισσότερα προσδεμένα συστατικά θα αρχίσουν να εκλούνται και να κινούνται προς τα κάτω στη στήλη. Οι πρωτεΐνες με το χαμηλότερο καθαρό φορτίο στο επιλεγμένο pH θα είναι οι πρώτες που εκλούνται από τη στήλη καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνεται. Παρομοίως, οι πρωτεΐνες με το υψηλότερο φορτίο σε ένα ορισμένο pH θα διατηρηθούν με μεγάλη δύναμη και θα εκλουθούν τελευταίες. Όσο υψηλότερο είναι το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης, τόσο μεγαλύτερη είναι η ιοντική ισχύς που απαιτείται για την έκλυση. Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο θα γίνει η διαβάθμιση της συγκέντρωσης του παράγοντα έκλυσης, οι πρωτεΐνες εκλούνται σε διαφορετικό στάδιο σε πιο καθαρή και συμπυκνωμένη μορφή.

#### ➤ Αναγέννηση

Μια τελική πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος αναγεννά τη στήλη και απομακρύνει ότι έχει μείνει ισχυρά προσδεμένο στη στήλη. Αυτό οδηγεί σε πλήρη ανάκτηση της δεσμευτικής ικανότητας της στήλης ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά. Τέλος, η στήλη επανα-εξισορροπείται στο αρχικό διάλυμα πριν χρησιμοποιηθεί ξανά.

(Healthcare, 2010a)



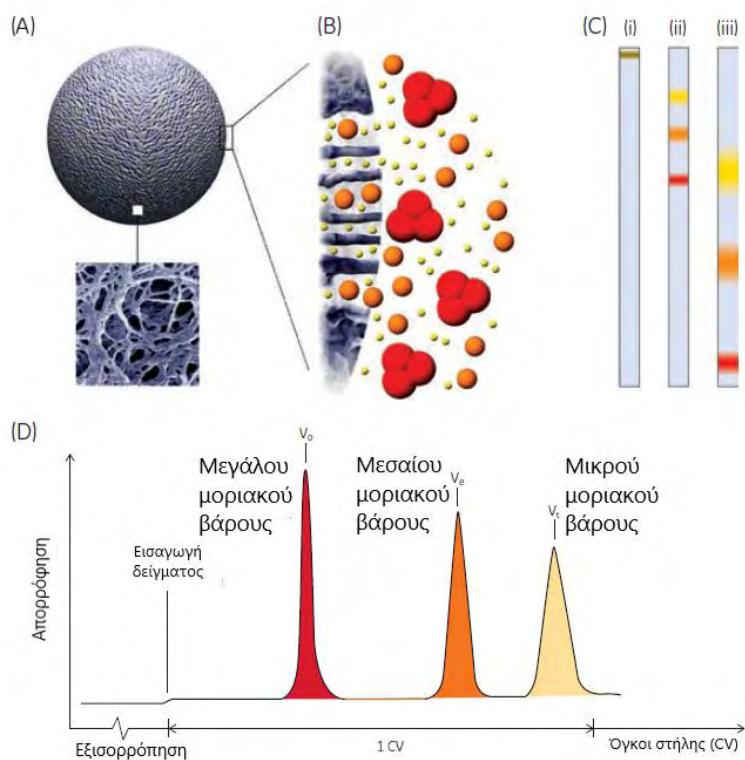
**Εικόνα 14 :** Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Παράδειγμα απομόνωσης και καθαρισμού αρνητικά φορισμένης πρωτεΐνης. Παρατηρούμε ότι οι λιγότερο ισχυρά προσδεμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται πρώτες στα κλάσματα της έκλυσης (Healthcare, 2010a).

#### 5.4.2 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Size exclusion chromatography, SEC) τα μόρια διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους μέγεθος καθώς περνάνε μέσω μιας ρητίνης μοριακής διήθησης πακεταρισμένη σε στήλη. Σε αντίθεση με άλλες τεχνικές όπως είναι η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και συγγένειας, τα μόρια δεν

προσδένονται στη ρητίνη κάτι που σημαίνει ότι το ρυθμιστικό διάλυμα δεν επηρεάζει την ικανότητα διαχωρισμού. Έτσι, ένα σημαντικό πλεονέκτημα της SEC είναι ότι οι συνθήκες μπορούν να μεταβάλλονται και να προσαρμόζονται στον τύπο του δείγματος ή στις απαιτήσεις για επίτευξη καλύτερου καθαρισμού, για ανάλυση ή για αποθήκευση, χωρίς να αλλάζει η διαδικασία του διαχωρισμού.

Για την εκτέλεση μιας διαδικασίας καθαρισμού, η ρητίνη πακετάρεται σε στήλη. Οι ρητίνες της SEC αποτελούνται από μια πορώδης μήτρα χημικών σταθερών μορίων που ελαχιστοποιούν την απορρόφηση των βιομορίων. Το πακεταρισμένο υλικό εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο γεμίζει τους πόρους του μέσου και τον χώρο μεταξύ των μορίων. Το υγρό μέσα στους πόρους, ή της στατικής φάσης, είναι σε ισορροπία με το υγρό (κινητή φάση) έξω από τους πόρους. Τα συστατικά του δείγματος εκλούνται ισοκρατικά με τη σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος να παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του διαχωρισμού. Δεν χρειάζεται αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού, ωστόσο στο τέλος απαιτείται μια πλύση με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να απομακρυνθούν τα μόρια που παραμένουν στη στήλη και για να είναι έτοιμη η στήλη για επόμενη χρήση (Healthcare, 2010b).



**Εικόνα 15 :** A) Σχηματική απεικόνιση ενός μορίου μετά από μεγέθυνση στο μικροσκόπιο, B) Σχηματική απεικόνιση των μορίων του δείγματος που εισχωρούν στους πόρους του μέσου, C) Γραφική περιγραφή του διαχωρισμού i) Εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, ii) το μικρότερο μοριακού βάρους μόριο (κίτρινο χρώμα) εκλούεται πιο αργά, iii) τα μεγαλύτερα μοριακού βάρους μόρια εκλούνται πρώτα από τη στήλη, D) Χρωματογράφημα SEC (Healthcare, 2010b).

## 5.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να παρέχει πληροφορίες για το μοριακό βάρος και το φορτίο, την δομή των υπομονάδων και την καθαρότητα μιας πρωτεΐνης. Είναι μια αρκετά απλή τεχνική και η πιο συχνή της χρήση είναι η ποσοτική ανάλυση των συστατικών ενός δείγματος πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή παρέχει την υψηλότερη ανάλυση από όλες τις διαθέσιμες μεθόδους διαχωρισμού, καθώς μπορεί να διαχωρίσει πολυπεπτίδια που διαφέρουν κατά λίγες εκατοντάδες daltons στο μοριακό τους βάρος και κατά 0,1 μονάδα του pΗ στο ισοηλεκτρικό τους σημείο.

Η αρχή της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στην ελεγχόμενη κίνηση των σωματιδίων σε ηλεκτρικά πεδία. Οι πρωτεΐνες είναι φορτισμένα σωματίδια και μετακινούνται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικών πεδίων. Οι πιο σημαντικές φυσικές τους ιδιότητες είναι οι ηλεκτροφορητικές τους κινητικές ικανότητες, που εξαρτάται από το μέγεθος, το φορτίο και το σχήμα, και τα ισοηλεκτρικά τους σημεία, που εξαρτώνται μόνο από το φορτίο. Οι πρωτεΐνες ως επαμφοτερικά μόρια μπορούν να φέρουν θετικό, αρνητικό ή καθόλου φορτίο ανάλογα με το pΗ του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται. Για κάθε πρωτεΐνη υπάρχει ένα συγκεκριμένο pΗ στο οποίο είναι αφόρτιστη που ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο ή pI. Μία πρωτεΐνη είναι θετικά φορτισμένη σε διαλύματα με pΗ χαμηλότερο του pI της και αρνητικά φορτισμένη σε διαλύματα με pΗ υψηλότερο του pI της. Αυτή η εξάρτηση του φορτίου από το pΗ επηρεάζει την κινητικότητα των πρωτεϊνών και την κατεύθυνση της μετακίνησης τους στο πήκτωμα.

Το σημείο “κλειδί” της ηλεκτροφόρησης είναι το πήκτωμα. Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται κυρίως πολυακρυλαμίδη αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η αγαρόζη για πρωτεΐνες με μέγεθος μεγαλύτερο από 500 kDa. Υπάρχουν ορισμένα χαρακτηριστικά της πολυακρυλαμίδης την καθιστούν ιδανική για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, όπως: i) Είναι δυνατόν να παρασκευαστεί πήκτωμα με διαφορετικό μέγεθος πόρων, για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. ii) Η αντίδραση πολυμερισμού είναι εύκολη. iii) Το μέγεθος των πόρων καθορίζεται από τις συνθήκες πολυμερισμού και μπορεί εύκολα να μεταβληθεί αλλάζοντας τη συγκέντρωση του μονομερούς. iv). Τα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης είναι υδρόφιλα και ηλεκτρικά ουδέτερα τη στιγμή που παρασκευάζονται. v) Τα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης είναι διάφανα στο φως σε μήκη κύματος πάνω από 250 nm και δεν προσδέχουν χρωστικές των πρωτεϊνών. Για τον σχηματισμό του πηκτώματος, αναμιγνύονται το ακρυλαμίδιο με το N'-N'methylbisacrylamide (bis) και ξεκινούν να συν-πολυμερίζονται παρουσία ελευθέρων ριζών. Τα μονομερή του ακρυλαμιδίου πολυμερίζονται σε μακριές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με το μόριο bis ακρυλαμιδίου.



Η παρουσία των ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητη για την έναρξη του πολυμερισμού και δημιουργούνται από την παρουσία ammonium persulfate και N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED). Το TEMED επιταχύνει την μετατροπή του APS σε ελεύθερες ρίζες θείου οι οποίες ξεκινούν τον πολυμερισμό με μεγαλύτερη απόδοση σε αλκαλικό pH.

### 5.5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE)

Το πιο διαδεδομένο σύστημα ηλεκτροφόρησης είναι η μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής που ανακαλύφθηκε από το Laemmli (1970) όπου το SDS αποτελεί το κύριο συστατικό της πηκτής. Το SDS είναι ένα απορρυπαντικό που μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και είναι αρνητικά φορτισμένο, ενώνεται με όλες τις περιοχές των πρωτεϊνών, και προσδίδει σε όλες καθαρό αρνητικό φορτίο αλλά και ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα. Ο διαχωρισμός στην πηκτή SDS βασίζεται στο μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης στο πήκτωμα αυξάνεται γραμμικά από πάνω προς τα κάτω με αποτέλεσμα το μέγεθος των πόρων να μειώνεται όσο μεγαλώνει η απόσταση στο πήκτωμα. Καθώς οι πρωτεΐνες κινούνται κατά μήκος της πηκτής από περιοχές με μεγάλους πόρους σε περιοχές με μικρούς πόρους, ο ρυθμός μετακίνησης τους μειώνεται. Έτσι οι μικρότερες πρωτεΐνες κινούνται γρηγορότερα και περισσότερο, ενώ οι μεγαλύτερες κινούνται πιο αργά, καθώς το μεγαλύτερο μέγεθος αυξάνει την τριβή και μειώνει την κινητικότητα.

Η κατασκευή όπου θα δημιουργηθεί η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου είναι μια κάθετη διάταξη 2 τζαμιών τα οποία στην συγκεκριμένη απέχουν μεταξύ τους 1 mm. Οι θέσεις υποδοχής του δείγματος (ή πηγάδια) δημιουργούνται με την προσθήκη μιας χτένας που δημιουργεί τα πηγάδια κατά την πήξη της πηκτής επιστοίβαξης. Μόλις παρασκευαστεί η πηκτή τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1 % SDS) το οποίο πρέπει να είναι σε επαφή με την πηκτή σε όλο της το μήκος και πλάτος. Τα δείγματα προετοιμάζονται με ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων 4× έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραίωση των δειγμάτων να είναι 1× (10 % glycerol, 154 mM Tris, 2 % SDS, 0.01 % bromophenol blue, 1.25 % β-Mercaptoethanol). Στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5 min στους 95-98 °C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί η φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια, ενώ παράλληλα σε ένα από αυτά φορτώνεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών. Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται στο τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 120 V στο κλειστό

κύκλωμα μεταξύ της δεξαμενής της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Στον Πίνακα 1 φαίνεται η σύσταση για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης σε διαφορετικές πυκνότητες.

**Πίνακας 1** : Αναλογία συστατικών για την παρασκευή πηκτωμάτων για SDS PAGE ανάλυση.

Παρασκευή πηκτωμάτων (% πυκνότητα)			
		10 %	12 %
	Επιστοιβάξης (3ml)	Διαχωρισμού (5ml)	
dH <sub>2</sub> O	2,1	1,9	1,6
30% Acrylamide-mix	0,5	1,7	2.0
Tris 1.5 M, pH8.8	-	1,3	1,3
Tris 1.0 M, pH 8.8	0,38	-	-
SDS (10%)	0,03	0,05	0,05
APS 10%	0,03	0,05	0,05
TEMED	0,003	0,002	0,002

Σε ένα εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο οι πρωτεΐνες, οι οποίες είναι πια αρνητικά φορτισμένες λόγω και του SDS, κινούνται προς τη θετική άνοδο με διαφορετικούς ρυθμούς ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Συνήθως, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, χρησιμοποιείται η μη συνεχής ηλεκτροφόρηση πηκτής του Laemmli, όπου το ρυθμιστικό διάλυμα στο πήκτωμα και στη δεξαμενή είναι διαφορετικά. Το σύστημα αποτελείται από το πήκτωμα επιστοιβάξης που έχει pH 6.8 (Tris-HCl, pH 6.8) το πήκτωμα διαχωρισμού με pH 8.8 (Tris HCl pH 8.8) και το διάλυμα ηλεκτροδίου με pH 8.3 (Tris-Glycine pH 8,3). Πρέπει να επισημανθεί ότι η γλυκίνη μπορεί να είναι θετικά, ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένη, ανάλογα με το pH. Όταν η ισχύς είναι ενεργοποιημένη, τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα γλυκίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων pH 8.3 αναγκάζονται να εισέλθουν στο πήκτωμα, όπου το pH είναι 6.8. Σε αυτό το περιβάλλον, η γλυκίνη μεταβαίνει κυρίως στην ουδέτερα φορτισμένη κατάσταση. Αυτή η απώλεια φορτίου τους αναγκάζει να μετακινούνται πολύ αργά στο ηλεκτρικό πεδίο. Τα ιόντα Cl<sup>-</sup> (από το Tris-HCl), από την άλλη, κινούνται πολύ πιο γρήγορα στο ηλεκτρικό πεδίο και σχηματίζουν ένα μέτωπο ιόντων που μεταναστεύει μπροστά από τη γλυκίνη. Ο διαχωρισμός του Cl<sup>-</sup> από το ιόν Tris (που κινείται τώρα προς την άνοδο) δημιουργεί μια στενή ζώνη που τραβάει τη γλυκίνη πίσω από αυτό, με αποτέλεσμα δύο στενά διαχωρισμένα μέτωπα μεταναστευτικών ιόντων, τα οποία είναι το εξαιρετικά κινητικό μέτωπο Cl<sup>-</sup>, ακολουθούμενο από το πιο αργό, κυρίως ουδέτερο μέτωπο γλυκίνης. Όλες οι πρωτεΐνες στο δείγμα πηκτώματος έχουν ηλεκτροφορητική κινητικότητα που είναι ενδιάμεση της κινητικότητας της γλυκίνης και του Cl<sup>-</sup>, και έτσι οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται στη στενή ζώνη μεταξύ του Cl<sup>-</sup> και γλυκίνης. Αυτό συνεχίζεται μέχρι

να φτάσουν στο σημείο του πήκτωματος, όπου το pH είναι 8,8. Σε αυτό το pH τα μόρια γλυκίνης είναι ως επί το πλείστον αρνητικά φορτισμένα και μπορούν να μεταναστεύσουν πολύ γρηγορότερα από τις πρωτεΐνες. Έτσι, το μέτωπο γλυκίνης επιταχύνει αφήνοντας πίσω του τις πρωτεΐνες. Το αποτέλεσμα είναι ότι οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε μία πολύ στενή ζώνη ανάμεσα στο πήκτωμα επιστοιβάξης και στο πήκτωμα διαχωρισμού και δεδομένου ότι η πήκτη διαχωρισμού έχει αυξημένη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου, η οποία επιβραδύνει την κίνηση των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους, αρχίζει ο διαχωρισμός (Clark John M. Jr, 2005; Garfin, 2003).

### 5.5.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native PAGE)

Στην ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες (Native PAGE), οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το επιφανειακό τους φορτίο, το μέγεθος, το σχήμα τους και την δομή τους. Η κίνηση των πρωτεϊνών κατά την ηλεκτροφόρηση συμβαίνει γιατί οι πρωτεΐνες διαθέτουν αρνητικό φορτίο στα αλκαλικά διαλύματα της ηλεκτροφόρησης. Όσο πιο μεγάλο είναι το αρνητικό φορτίο, τόσο πιο γρήγορα η πρωτεΐνη κινείται στην πήκτη. Επίσης, το μέγεθος των πόρων της πήκτης δεν επιτρέπει στις πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους να κινηθούν με την ίδια ταχύτητα συγκριτικά με τις πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους. Επομένως σε μια πήκτη πολυακρυλαμιδίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σύμφωνα με το φορτίο και το μέγεθος τους. Στο Native PAGE δεν χρησιμοποιούνται απορρυπαντικά, με αποτέλεσμα να διατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων των πρωτεϊνών και να είναι δυνατό να διαπιστωθεί η τεταρτοταγής δομή του προς ανάλυση μορίου. Επίσης, κάποιες πρωτεΐνες διατηρούν την ενζυμική τους δραστηριότητα κατά την Native PAGE ανάλυση, καθιστώντας αυτή την τεχνική χρήσιμη για ανάλυση απομονωμένων ενεργών πρωτεϊνών (Clark John M. Jr, 2005; Garfin, 2003).

**Πίνακας 2**: Αναλογία συστατικών για την παρασκευή πήκτωμάτων για Native PAGE ανάλυση.

Παρασκευή πήκτωμάτων (% πυκνότητα)		
	4 %	7 %
	Επιστοιβάξης (3ml)	Διαχωρισμού (6ml)
dH <sub>2</sub> O	3,285	3,112
30% Acrylamide-mix	0,5	1,4
Tris 1.5 M, pH 8.8	-	1,462
Tris 1.0 M, pH 6.8	0,625	-
APS 10%	0,05	0,02
TEMED	0,005	0,0028

## 5.6 Χρώση πηκτώματος

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε 10% v/v διάλυμα οξικού οξέος μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 λεπτό. Το διάλυμα οξικού οξέος αποχύνεται και προστίθεται το διάλυμα χρώσης το οποίο περιέχει 0.1 % Coomassie Blue R250, 10 % οξικό οξύ και 50 % μεθανόλη. Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται και πάλι στο φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό και αφήνεται να αναδευτεί για 10 λεπτά. Μετά το πέρας των 10 λεπτών αποχύνεται το διάλυμα χρώσης και προστίθεται ξανά διάλυμα οξικού οξέος 10% v/v. Ακολουθεί ξανά βράσιμο σε φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό και το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται 3-5 φορές. Τέλος το πήκτωμα μένει με διάλυμα οξικού οξέος 10 % v/v μέχρι να απομακρυνθεί εντελώς ο θόρυβος που προκαλεί η χρώση με Coomassie Blue.

## 5.7 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών – Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για να μετρήσει την ολική ποσότητα πρωτεΐνης σε ένα δείγμα. Αρχή αυτής της μεθόδου είναι η δέσμευση των μορίων της πρωτεΐνης στη χρωστική Coomassie κάτω από όξινες συνθήκες κάτι το οποίο οδηγεί σε αλλαγή του χρώματος από καφέ σε μπλε. Αυτή η μέθοδος ουσιαστικά μετράει την παρουσία των αμινοξέων αργινίνη, λυσίνη και ιστιδίνη τα οποία συμβάλλουν στο σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής Coomassie, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Τυχόν αύξηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 595 nm είναι ενδεικτική της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη. Αρχικά, παρασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας μια σειρά προτύπων διαλυμάτων πρωτεΐνης BSA γνωστής συγκεντρώσεως. Σε όγκο 20  $\mu$ L από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα προσθέτονται 780  $\mu$ L απιονισμένο ύδωρ και 200  $\mu$ L αντιδραστηρίου Bradford 5x, έτσι ώστε να γίνει 1x. Στη συνέχεια τα διαλύματα αναδεύονται και αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι για 10 λεπτά. Ακολούθως αναδεύονται και φασματοφωτομετρούνται σε μήκος κύματος 595 nm, ενώ τέλος υπολογίζεται η συγκέντρωσή τους με βάση την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης.

## 5.8 Απομόνωση της L-PSP από βολβούς πατάτας

Η απομόνωση της L-PSP έγινε με τροποποιήσεις στο πρωτόκολλο των Kamogawa και Fukui (Kamogawa et al., 1968).

### Παρασκευή διαλύματος άμυλο

- Ζυγίζουμε 50 g άμυλο
- Παρασκευάζουμε διάλυμα όγκου 25 ml που περιέχει 0.5 M sodium citrate pH 6.0 και 4 L dH<sub>2</sub>O.
- Τοποθετούμε το άμυλο στο παραπάνω διάλυμα και το αφήνουμε να βράσει υπό δυνατή ανάδευση για αρκετά λεπτά ( σε ατμοσφαιρική πίεση).
- Αφήνουμε το διάλυμα overnight σε θερμοκρασία δωματίου και την επόμενη μέρα το μίγμα αραιώνεται στα 2.5 L με την προσθήκη κρύου dH<sub>2</sub>O και αφήνεται στους 4 °C στο ψυγείο.

### Πρωτόκολλο καθαρισμού της L-PSP

#### 1<sup>η</sup> Ημέρα

- Χρειαζόμαστε 2.5 kg γεώμηλα τα οποία πλένουμε με τη φλούδα με νερό και τις κόβουμε σε κομμάτια πάχους περίπου 1.5-2 cm.
- Τα κομμάτια επωάζονται σε 3.5 L διαλύματος 0.7% sodium citrate και 0.7 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> για 60 min.
- Τα κομμάτια στη συνέχεια ομογενοποιούνται με τη βοήθεια αποχυμητή. Ο χυμός που παραλαμβάνεται διηθείται μέσω γάζας για να απομακρυνθούν οι ιστοί και αφήνεται σε πάγο για 60 min.
- Ο χυμός διηθείται και με υαλοβάμβακα και αφήνεται για άλλα 60 min σε πάγο.
- Στο εκχύλισμα που προκύπτει (περίπου 1.2 L) ρυθμίζουμε το pH στο 7.2 με 1 M NaOH.
- Στη συνέχεια τοποθετούμε το εκχύλισμα σε μεγάλο δοχείο και το βυθίζουμε σε υδατόλουτρο στους 56-57 °C.
- Το εκχύλισμα αναδεύεται συνεχώς ώστε να αποφευχθεί η τοπική θέρμανση, ενώ παράλληλα παρακολουθούμε την αύξηση της θερμοκρασίας με την χρήση θερμομέτρου. Όταν η θερμοκρασία αγγίξει τους 55 °C, τότε το δοχείο που περιέχει το εκχύλισμα μεταφέρεται γρήγορα σε ένα υδατόλουτρο πάγου-νερού και παράλληλα αναδεύουμε.
- Αφού ψυχθεί το εκχύλισμα, φυγοκεντρείται στους 4 °C για 15 min σε 12.000 rcf ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά.

- Το καθαρό υπερκείμενο αναμιγνύεται με το κρύο διάλυμα αμύλου και το δοχείο ψύχεται σε θερμοκρασία 4 °C σε υδατόλουτρο πάγου-νερού, με το δείγμα να αναδεύεται ελαφρώς με γυάλινη ράβδο.
- Παράλληλα με την ανάδευση προστίθεται αργά (για περίπου 2 min) παγωμένη αιθανόλη, ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 14%.
- Η ανάδευση σταματάει μετά την προσθήκη όλης της ποσότητας της αιθανόλης.
- Παρατηρείται ότι το άμυλο αρχίζει να καθιζάνει και μετά από περίπου 90 min δημιουργείται στρώμα ιζήματος στον πυθμένα του δοχείου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4 °C για 20 min σε 12.000 rcf.
- Το ίζημα που λαμβάνεται διαλυτοποιείται σε 1 L 5 mM κιτρικού νατρίου pH 6.3 και αφήνεται για ανάδευση για μία νύκτα στον ψυκτικό θάλαμο.

Αν το εκχύλισμα θερμανθεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 55 °C ή παραμείνει σε θερμοκρασία 55 °C για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα τότε το ένζυμο μπορεί να απενεργοποιηθεί κατά ένα ποσοστό, Είναι ασφαλέστερο η θέρμανση του εκχυλίσματος να γίνει σε θερμοκρασία ελαφρώς χαμηλότερη από θερμοκρασία 55 °C. Η θερμική κατεργασία μπορεί να παραληφθεί αν μεταχειριζόμαστε μεγάλους όγκους εκχυλίσματος. Σε αυτή την περίπτωση, θα παρατηρηθεί αμαύρωση του εκχυλίσματος και εμφάνιση μιας δεύτερης κορυφής με χαμηλή ειδική δραστηριότητα στη στήλη DEAE Cellulose.

## 2<sup>η</sup> Ημέρα

- Το δείγμα φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4 °C για 20 min σε 12.000 rcf.
- Συλλέγουμε το υπερκείμενο και το εφαρμόζουμε στη στήλη DEAE Cellulose με ροή 4 ml/min. Η στήλη είχε εξισορροπηθεί με 1.5 L διαλύματος 5 mM sodium citrate pH 6.3.
- Ακολουθεί πλύση της στήλης με 1.2 L διαλύματος 5 mM κιτρικού νατρίου pH 6.3.
- Η έκλουση γίνεται overnight με διαβάθμιση συγκέντρωσης 0-100 % διαλύματος που περιέχει 5 mM κιτρικού νατρίου / 1 M NaCl pH 6.3 με ταχύτητα ροής 2 ml/min σε κλάσματα των 17 ml.

### 3<sup>η</sup> Ημέρα

- Με βάση το χρωματογράφημα και την SDS PAGE ανάλυση συλλέγονται τα ενεργά κλάσματα και ακολουθεί καταβύθιση των πρωτεϊνών με θειϊκό αμμώνιο. Επιλέγουμε τα κλάσματα 18 έως 35 (18 x 17ml = 306 mL) και προστίθεται  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  μέχρι τελικής συγκέντρωσης 2.46 M (60% κορεσμένο). Άρα 459 mL 4.1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  προστίθενται αργά και με συνεχή ανάδευση στο δείγμα. Στη συνέχεια αφήνεται σε θερμοκρασία 4 °C σε υδατόλουτρο πάγου-νερού χωρίς ανάδευση, ώστε να πραγματοποιηθεί η καταβύθιση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4 °C για 20 min σε 12.000 rcf, Το ίζημα που προκύπτει διαλυτοποιείται σε 20 ml διαλύματος 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.125 M NaCl. Έπειτα πραγματοποιείται διαπίδυση έναντι 1 L διαλύματος 25 mM Tris-HCl, 0.125 M NaCl pH 7.5 για περίπου 12 ώρες.

### 4<sup>η</sup> Ημέρα

- Μετά τη διαπίδυση το δείγμα συμπυκνώνεται με φίλτρο 100.000 cut-off έως τα 2 mL και συγκέντρωση 24 mg/mL. Έπειτα πραγματοποιούνται 5 runs σε στηλή Superose 12 10/300 με ταχύτητα ροής 0.5 mL/min και συλλέγονται κλάσματα του 1 mL. Η στηλή έχει εξισορροπηθεί με 1.5 όγκο στηλής διάλυμα 25 mM Tris-HCl, 0.125 M NaCl pH 7.5. Μετά και την SDS PAGE ανάλυση τα κλάσματα τα οποία περιέχουν την L-PSP είναι το 8 και το 9.

### 5<sup>η</sup> Ημέρα

- Τα κλάσματα τα οποία περιέχουν την L-PSP (συνολικός όγκος 10 mL) συμπυκνώνονται με φίλτρο 30.000 cut-off μέχρι τελικού όγκου 150  $\mu\text{L}$  και τελικής συγκέντρωσης 21.9 mg/mL.

## 5.9 Κρυστάλλωση της L-PSP

Η L-PSP κρυσταλλώθηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική της καθήμενης σταγόνας χρησιμοποιώντας ως καταβυθιστικό διάλυμα 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 mM Tris-HCl pH 7.5 και συγκέντρωση ενζύμου 21.9 mg/mL.

## 5.10 Κινητικές μελέτες έναντι της L-PSP

Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση είναι αμφίδρομη. Στις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήσαμε in vitro έναντι της φωσφορυλάσης του αμύλου μελετήσαμε

την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, προς τη σύνθεση του άμυλου, δηλαδή την ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο άμυλο, ώστε να προκύψει άμυλο με ένα περισσότερο κατάλοιπο γλυκόζης με παράλληλη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών από την G1P. Τα ιόντα αυτά μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά ώστε να ποσοτικοποιηθούν.

### 5.10.1 Περιγραφή και αρχή μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας

Η αρχή της μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων βασίζεται στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό του φωσφόρου, με τη δημιουργία χρωμοφόρου συμπλόκου ένωσης. Το ανόργανο φωσφορικό σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία  $Zn^{2+}$  σε pH 5, το οποίο απορροφά ισχυρά την υπεριώδη ακτινοβολία. Μετά από αναγωγή με το ασκορβικό οξύ, παράγεται ένα χρωμόφορο σύμπλοκο το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 850 nm. Απουσία ορθοφωσφορικών ιόντων το χρωμόφορο σύμπλοκο δεν παράγεται.

Το σύμπλοκο φωσφομολυβδενικού μειώνεται από το ασκορβικό οξύ σε pH 5 παρουσία  $Zn^{2+}$ . Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό αντιδράσεων απελευθέρωσης ορθοφωσφορικών ιόντων.

Διαλύματα: Μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100 mM οξικού ψευδαργύρου. Το pH του μίγματος ρυθμίστηκε στο 5.0, και διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), pH 5.0.

Τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται σε αναλογία 4:1 σε ένα αδιαφανές σκούρο δοχείο. Αφήσαμε το μίγμα για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση. Στη συνέχεια προσθέσαμε στα δείγματα κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος και αφήσαμε να γίνει επώαση σε θερμοκρασία 30° C για άλλα 15 min σε υδατόλουτρο. Ο ανόργανος φώσφορος που υπάρχει σχηματίζει σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία ιόντων ψευδαργύρου ( $Zn^{2+}$ ) το οποίο ανάγεται από το ασκορβικό οξύ και παράγεται ένα χρωμόφορο που έχει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm. Για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε την ποσότητα των ορθοφωσφορικών ανιόντων σε ένα δείγμα, πρέπει να παρασκευάσουμε ένα δείγμα αναφοράς ορθοφωσφορικών ανιόντων, στο οποίο θα μετρήσουμε την οπτική απορρόφηση, ώστε να το χρησιμοποιήσουμε ως πρότυπο για τον υπολογισμό της ποσότητας στο άγνωστο δείγμα (Saheki, Takeda, & Shimazu, 1985).



**Γενικά** η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

Αφήνουμε το ενζυμικό διάλυμα σε υδατόλουτρο για 15 min ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του ενζύμου με το άμυλο. Το υποστρώμα στις παρούσες κινητικές μελέτες ήταν η α-D-1-φωσφορική γλυκόζη, καθώς μελετάμε την αντίστροφη πορεία της αντίδρασης που καταλύει η L-PSP, δηλαδή την προσθήκη της G1P στο μακρομόριο του αμύλου.

Τα υποστρώματα τοποθετούνται για επώαση για 3 min, όταν έχουν περάσει 12 min από την στιγμή που τοποθετήσαμε για επώαση το ενζυμικό διάλυμα.

Λαμβάνονται 36  $\mu\text{L}$  από το ενζυμικό διάλυμα και προστίθενται στα 144  $\mu\text{L}$  διαλύματος υποστρώματος για την κάθε θερμοκρασία. Εκείνη τη χρονική στιγμή, όπου  $t=0$ , ξεκινά η ενζυμική αντίδραση η οποία εξελίσσεται σε όγκο αντίδρασης 180  $\mu\text{L}$ . Στη συνέχεια του πειράματος λαμβάνονται 40  $\mu\text{L}$  από το μίγμα της αντίδρασης ανά 5, 10, 15, 20 min, και αποθέτονται σε 10  $\mu\text{L}$  SDS 1 % με έντονη ανάδευση.

Για κάθε κινητική μελέτη, παρασκευάστηκαν διαλύματα τα οποία είχαν ρόλο “τυφλού μάρτυρα” και περιείχαν μόνο την ένωση ή το μίγμα. Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάστηκαν εις διπλούν τα οποία περιείχαν όλα 10  $\mu\text{L}$  SDS 1 % (w/v).

<b>Τυφλό H<sub>2</sub>O</b>	10 $\mu\text{L}$ SDS 1 % (w/v)+ 40 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O
<b>Τυφλό ενζυμικού διαλύματος</b>	10 $\mu\text{L}$ SDS 1 % (w/v)+ 32 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O + 8 $\mu\text{L}$ ενζυμικού διαλύματος
<b>Τυφλό G1P</b>	10 $\mu\text{L}$ SDS 1 % (w/v)+ 31.1 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O + 8.9 $\mu\text{L}$ από τη μεγαλύτερη συγκέντρωση G1P
<b>Τυφλό φωσφορικών</b>	10 $\mu\text{L}$ SDS 1 % (w/v)+ 30 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O + 10 $\mu\text{L}$ Pi 1 mM

Μετά το πέρας της διαδικασίας παρασκευάσθηκε το διάλυμα φωτομέτρησης, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Μετά τα 15 min επώασης του μίγματος του διαλύματος φωτομέτρησης, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα, αλλά και στα τυφλά, 700  $\mu\text{L}$  διαλύματος φωτομέτρησης.

### 5.10.2 Έλεγχος για την εύρεση του βέλτιστου pH

Ελέγχθηκαν 6 διαφορετικές τιμές pH, ώστε να διαπιστωθεί η βέλτιστη τιμή στην οποία η L-PSP παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα. Η δραστηριότητα μετρήθηκε σε τελική συγκέντρωση 20 mM οξικού νατρίου pH 4.5 ή 5.5, 20 mM κιτρικού νατρίου pH 6, ή 6.5, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, ή 8.5.

Το ενζυμικό διάλυμα που παρασκευάστηκε είχε συγκέντρωση 0.25 mg/mL για την L-PSP σε όγκο 100 µL ώστε στον όγκο της αντίδρασης, που ήταν 270 µL, να είχαμε συγκέντρωση 50 µg/mL L-PSP. Στο ενζυμικό διάλυμα προστέθηκαν L-PSP, άμυλο και διάλυμα 400 mM KCl, 4 mM EDTA, 4 mM DTT, 133 mM (οξικό νάτριο, κιτρικό νάτριο, Tris-HCl) σε αναλογίες:

<b>Ενζυμικό διάλυμα : 100 µL</b>	
<b>Αρχικές συγκεντρώσεις</b>	<b>Τελικές συγκεντρώσεις</b>
Starch 10 % (w/v) : 10 µL	Άμυλο 0.4 % (w/v)
KCl 400 mM, EDTA 4 mM ,DTT 4 mM, (οξικό νάτριο, κιτρικό νάτριο, Tris-HCl) 133 mM : 75 µL	KCl 60 mM, EDTA 0.6 mM, DTT 0.6 mM, (οξικό νάτριο, κιτρικό νάτριο, Tris-HCl) 20 mM : 75 µL
L-PSP 6.95 mg/ml : 10 µL	L-PSP : 50 µg/ml
dH <sub>2</sub> O : 5 µL	

Το υπόστρωμα περιείχε :

<b>Υποστρώματα : 240 µL</b>	
<b>Αρχικές συγκεντρώσεις</b>	<b>Τελικές συγκεντρώσεις</b>
G1P 400 mM : 8.4 µL	G1P 14 mM
KCl 400 mM, EDTA 4 mM ,DTT 4 mM, (οξικό νάτριο, κιτρικό νάτριο, Tris-HCl) 133 mM : 36 µL	KCl 60 mM, EDTA 0.6 mM, DTT 0.6 mM, (οξικό νάτριο, κιτρικό νάτριο, Tris-HCl) 20 mM
dH <sub>2</sub> O : 195.6 µL	

### 5.10.3 Έλεγχος για εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας

Ελέγχθηκαν 4 διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας, ώστε να διαπιστωθεί η θερμοκρασία στην οποία η L-PSP παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δραστικότητα. Η δραστικότητα μετρήθηκε σε θερμοκρασίες 20 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C.

Το ενζυμικό διάλυμα περιείχε :

<b>Ενζυμικό διάλυμα : 200 µL</b>	
<b>Αρχικές συγκεντρώσεις</b>	<b>Τελικές συγκεντρώσεις</b>
Starch 10 % (w/v) : 40 µL	Starch 0.4 % (w/v)
KCl 500 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, κιτρικό νάτριο 166 mM pH 6.0: 120 µL	KCl 60 mM, EDTA 0.6 mM, DTT 0.6 mM, κιτρικό νάτριο 20 mM pH 6.0
L-PSP 3 mg/mL : 16.6 µL	L-PSP : 50 µg/ml
dH <sub>2</sub> O : 23.4 µL	

Το υπόστρωμα περιείχε :

<b>Υπόστρώματα : 1000 <math>\mu</math>L</b>	
<b>Αρχικές συγκεντρώσεις</b>	<b>Τελικές συγκεντρώσεις</b>
G1P 80 mM : 50 $\mu$ L	G1P 4 mM
KCl 500 mM, EDTA 5 mM ,DTT 5 mM, κιτρικό νάτριο 166 mM pH 6.0: 120 $\mu$ L	KCl 60 mM, EDTA 0.6 mM, DTT 0.6 mM, κιτρικό νάτριο 20 mM pH 6.0
dH <sub>2</sub> O : 830 $\mu$ L	

#### 5.10.4 Προσδιορισμός της $K_m$

Παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 1 (Assay Buffer 1) που περιέχει 400 mM KCl, 4 mM DTT, 4 mM EDTA. Από αυτό με αραιώση προκύπτει το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 2 (Assay Buffer 2) 270 mM KCl, 2.7 mM DTT, 2.7 mM EDTA. Σε αυτό βρίσκονται οι συγκεντρώσεις του υπό μελέτη υποστρώματος.

<b>Αρχικές συγκεντρώσεις</b>	<b>Τελικές συγκεντρώσεις</b>
G1P 400 mM 225 $\mu$ L	G1P 90 mM
dH <sub>2</sub> O 100 $\mu$ L	Assay Buffer 2
Assay Buffer 675 $\mu$ L	
<b>Όγκος = 1000 <math>\mu</math>L</b>	

Οι υπόλοιπες αραιώσεις G1P που παρασκευάστηκαν με αραιώση από την G1P 90 mM χρησιμοποιώντας το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης 2.

<b>Αρχικές συγκεντρώσεις</b>	<b>Τελικές συγκεντρώσεις</b>	<b>[G1P] mM σε 180 <math>\mu</math>L της αντίδρασης</b>
G1P 90 mM 150 $\mu$ L Assay buffer 50 $\mu$ L	G1P 67.5 mM Όγκος = 200 $\mu$ L	15
G1P 90 mM 100 $\mu$ L Assay buffer 100 $\mu$ L	G1P 45 mM Όγκος = 200 $\mu$ L	10
G1P 90 mM 60 $\mu$ L Assay buffer 140 $\mu$ L	G1P 27 mM Όγκος = 200 $\mu$ L	6
G1P 27 mM 40 $\mu$ L Assay buffer 160 $\mu$ L	G1P 18 mM Όγκος = 200 $\mu$ L	4
G1P 90 mM 30 $\mu$ L Assay buffer 170 $\mu$ L	G1P 13.5 mM Όγκος = 200 $\mu$ L	3

Το ενζυμικό διάλυμα περιείχε :

<b>Ενζυμικό διάλυμα : 240 <math>\mu</math>L</b>	
<b>Αρχικές συγκεντρώσεις</b>	<b>Τελικές συγκεντρώσεις</b>
Άμυλο 10 % (w/v) : 24 $\mu$ L	Άμυλο 0.4 % (w/v)
KCl 500 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, κιτρικό νάτριο 166 mM pH 6.0: 144 $\mu$ L	KCl 60 mM, EDTA 0.6 mM ,DTT 0.6 mM, κιτρικό νάτριο 20 mM pH 6.0

L-PSP 3 mg/mL : 20 $\mu$ L	L-PSP : 50 $\mu$ g/mL
dH <sub>2</sub> O : 28 $\mu$ L	

Το υπόστρωμα περιείχε :

Υποστρώματα : 144 $\mu$ L	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
G1P (13.5, 18, 27, 45, 67.5, 90) mM : 40 $\mu$ L	G1P (3, 4, 6, 10, 15, 20) mM
dH <sub>2</sub> O : 104 $\mu$ L	

Για τον προσδιορισμό της  $K_M$  ελήφθησαν 36  $\mu$ L από το ενζυμικό διάλυμα και προστέθηκαν σε 144  $\mu$ L του πρώτου διαλύματος υποστρώματος. Εκείνη τη χρονική στιγμή, όπου  $t=0$ , ξεκίνησε η ενζυμική αντίδραση η οποία εξελίχθηκε σε όγκο αντίδρασης 180  $\mu$ L. Οι συγκεντρώσεις της G1P ήταν 3, 4, 6, 10, 15 και 20 mM. Στη συνέχεια του πειράματος ελήφθησαν 40  $\mu$ L από το μίγμα της αντίδρασης ανά 5, 10, 15, 20 min, και αποτέθηκαν σε 10  $\mu$ L SDS 1 % με έντονη ανάδευση ώστε να σταματήσει πλήρως η αντίδραση.

### 5.10.5 Έλεγχος για την επίδραση της AMP

Το ενζυμικό διάλυμα περιείχε :

Ενζυμικό διάλυμα : 60 $\mu$ L	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
Άμυλο 10 % (w/v) : 12 $\mu$ L	Άμυλο 0.4 % (w/v)
KCl 400 mM, EDTA 4 mM ,DTT 4 mM, (κιτρικό νάτριο, sodium citrate, Tris-HCl) 133 mM : 36 $\mu$ L	KCl 60 mM, EDTA 0.6 mM ,DTT 0.6 mM, (κιτρικό νάτριο, sodium citrate, Tris-HCl) 20 mM : 75 $\mu$ L
L-PSP 3 mg/mL : 5 $\mu$ L	L-PSP : 50 $\mu$ g/ml
dH <sub>2</sub> O : 7 $\mu$ L	

Το υπόστρωμα περιείχε :

Υποστρώματα : 144 $\mu$ L	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
G1P 90 mM : 40 $\mu$ L	G1P 20 mM
AMP 25 Mm : 7.2 $\mu$ L	AMP 1 mM
dH <sub>2</sub> O : 96.8 $\mu$ L	

### 5.10.5 Ανάλυση των κινητικών δεδομένων

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

Προκειμένου να υπολογιστούν οι κινητικές παράμετροι ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_i$ ) υπολογίστηκε αρχικά η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου ως προς κάθε συγκέντρωση υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε. Αυτή ορίζεται ως τα μολ υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε mg πρωτεΐνης, δηλαδή  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ .

Για να υπολογιστεί η ειδική δραστηριότητα πρώτα υπολογίζονται τα μολ ορθοφωσφορικών ιόντων που παρήχθησαν από την αντίδραση. Για το λόγο αυτό είχαμε παρασκευάσει ένα πρότυπο διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων το οποίο είχε συγκέντρωση 0.25 mM. Τα 0.25 mM ορθοφωσφορικών ιόντων αντιστοιχούσαν σε 0.01 μολ ορθοφωσφορικών ιόντων, διότι:

$$0.25 \text{ mM} = 0.25 \text{ mmol/L} = 0.25 \mu\text{mol/mL}$$

Άρα στα 1000  $\mu\text{L}$  περιέχονταν 0.25 μολ ορθοφωσφορικών ιόντων. Επομένως, σε 40  $\mu\text{L}$  που ήταν ο όγκος του τυφλού των ορθοφωσφορικών ιόντων που φωτομετρήθηκε υπήρχαν 0.01 μολ ορθοφωσφορικών ιόντων. Αν υποθεθεί ότι το τυφλό των ορθοφωσφορικών ιόντων είχε απορρόφηση A, τότε αυτή η απορρόφηση δηλώνει την παρουσία 0.01 μολ ορθοφωσφορικών ιόντων. Με αυτό τον τρόπο υπολογίστηκε η ποσότητα των ορθοφωσφορικών ιόντων σε μολ για κάθε δείγμα. Αν υποθέσουμε ότι μία μέτρηση έδωσε απορρόφηση B. Για να υπολογίσουμε μόνο τα μολ ορθοφωσφορικών ιόντων που υπήρχαν μέσα στο δείγμα έπρεπε να αφαιρέσουμε τις απορροφήσεις που προήλθαν από το ενζυμικό διάλυμα και την G1P. Έτσι, η απορρόφηση των ορθοφωσφορικών ιόντων ισούταν με

$$(B - \text{Abs}_{\text{τυφλού ενζυμικού διαλύματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού G1P}}) = \text{Abs}_{\text{φωσφορικών του δείγματος}} = C$$

Εφόσον γνωρίζουμε ότι τα 0.01 μολ έδωσαν απορρόφηση A, τότε τα μολ των ορθοφωσφορικών ιόντων στο δείγμα ισούταν με:

$$\frac{c \times 0.01}{A} \text{ ή } \frac{B}{A * 100} = \mu\text{mol ορθοφωσφορικών ιόντων στο άγνωστο δείγμα}$$

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

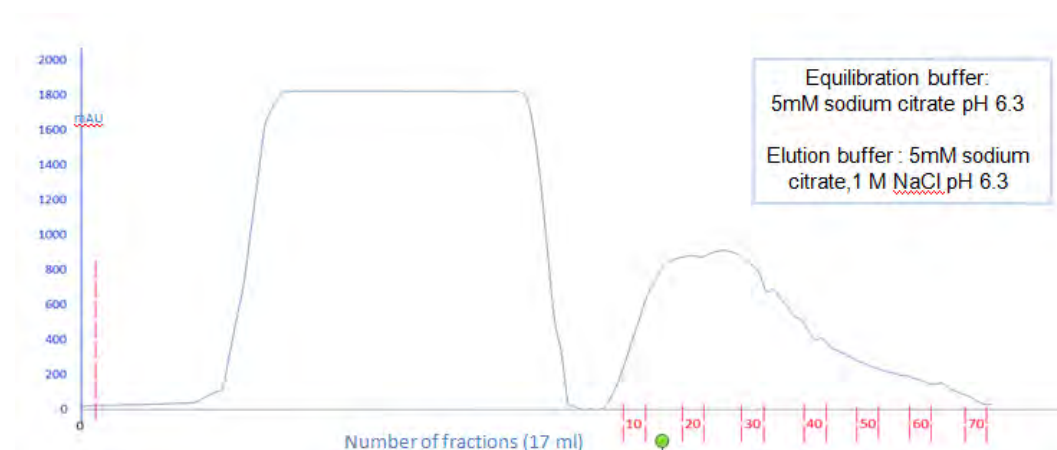
## 6. Αποτελέσματα

### 6.1 Καθαρισμός και απομόνωση της L-PSP

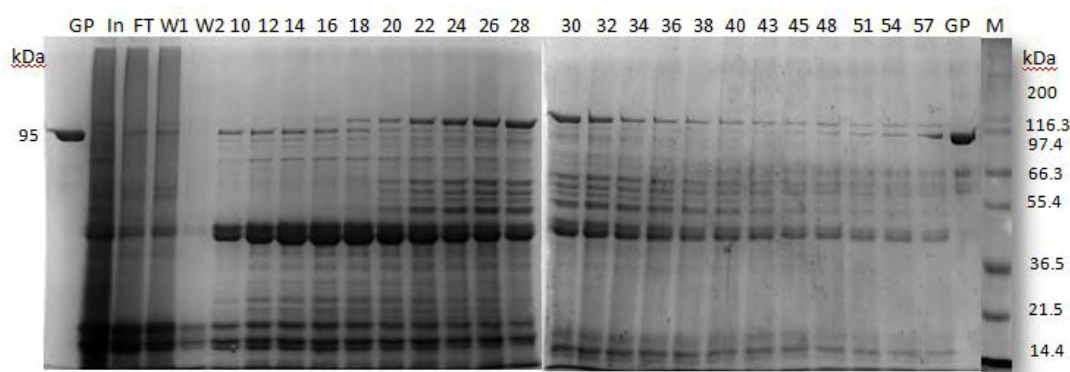
Η απομόνωση της L-PSP έγινε από 2.5 kg γεωμήλων. Το πρώτο στάδιο αφορά την συλλογή του χυμού από τα γεώμηλα, την διήθηση του, τη ρύθμιση του pH, τη

θερμική κατεργασία και την καταβύθιση με άμυλο και παγωμένη αιθανόλη. Το ίζημα που προκύπτει διαλυτοποιείται σε 1 L διαλύματος 5 mM κιτρικού νατρίου pH 6.3 και εισάγεται σε στήλη DEAE Cellulose XK 50/20. Η στήλη DEAE Cellulose XK 50/40 είναι ένας ασθενής ανιοντοανταλλάκτης.

Αυτό το στάδιο του καθαρισμού βασίζεται στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης. Η L-PSP έχει ισοηλεκτρικό σημείο  $pI = 5.14$ . Επομένως σε  $pH=6.3$  η πρωτεΐνη είναι αρνητικά φορτισμένη και προσδένεται στη στήλη. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 5 mM κιτρικού νατρίου pH 6.3 (διάλυμα A). Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος που περιείχε 5 mM κιτρικού νατρίου pH 6.3, 1 M NaCl καθώς αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος και καταργούνται οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – ρητίνης. Συλλέγονται κλάσματα των 17 mL. Στην εικόνα 16 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα:



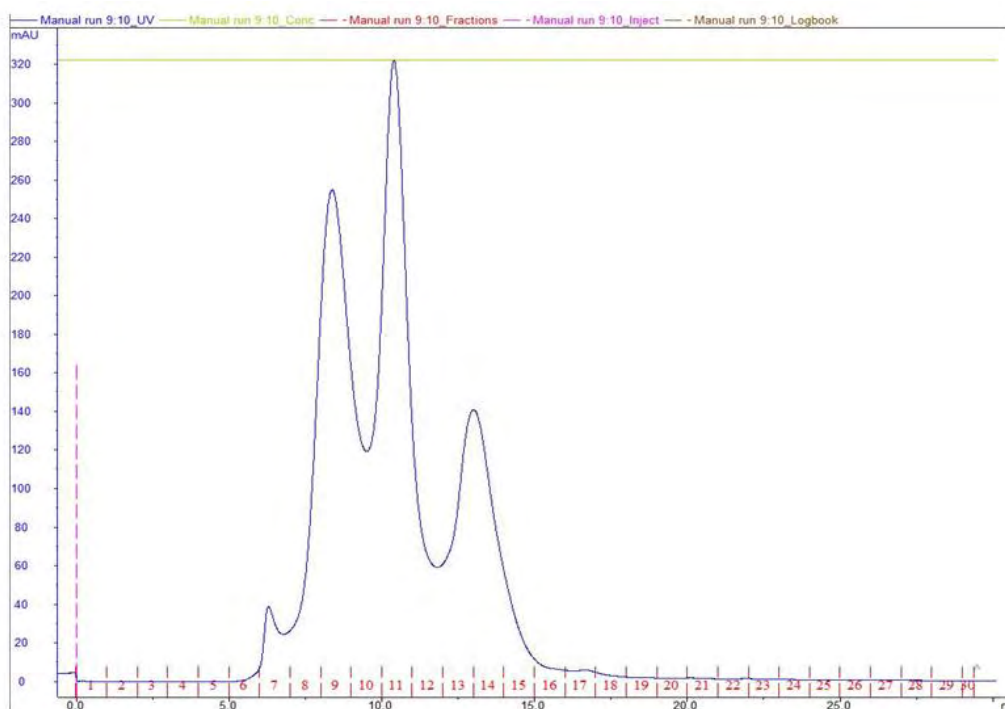
**Εικόνα 16 :** Καθαρισμός της L-PSP με στήλη DEAE Cellulose XK 50/20. Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης 0-100 % του διαλύματος B (5 mM κιτρικού νατρίου pH 6.3, 1 M NaCl)



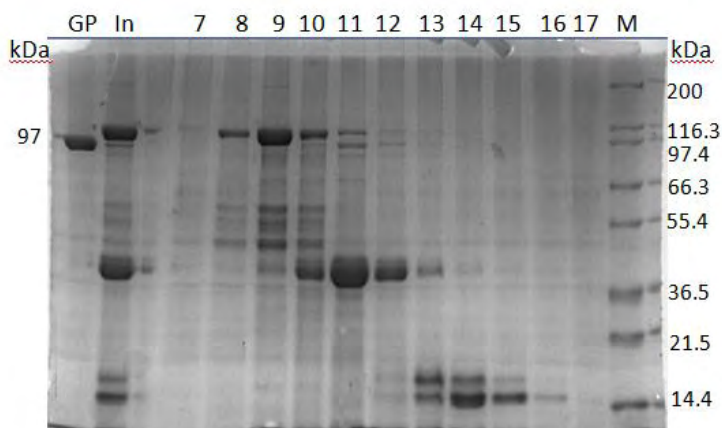
**Εικόνα 17 :** 10 % SDS PAGE ανάλυση των κλασμάτων που προκύπτουν από τη χρήση της στήλης DEAE Cellulose XK 50/20. Διαδρομές 1 και 28 : Φωσφορυλάση του γλυκογόνου απομονωμένη από μύες κονίκλων (mGPb), διαδρομή 2 : εφαρμογή στη στήλη (Input), διαδρομή 3 : πρωτεΐνες χωρίς συγγένεια προς τη στήλη ( Flow Through), διαδρομή 4 και 5 : κλάσματα πλύσης της στήλης (wash), διαδρομές 6 – 27 : έκλυση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών (κλάσματα 10 – 57 ).

Τα κλάσματα 18 έως 35 (18 x 17ml = 306 ml) επιλέγονται και προστίθεται (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> μέχρι τελικής συγκέντρωσης 2.46 M (60% κορεσμένο). Άρα 459 mL 4.1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> προστίθενται αργά και με συνεχή ανάδευση στο δείγμα, ώστε να πραγματοποιηθεί καταβύθιση. Το ίζημα που προκύπτει διαλυτοποιείται σε 20 mL διαλύματος 25 mM Tris-HCl, 0.125 M NaCl pH 7.5. Έπειτα πραγματοποιείται για 12 ώρες διαπίδυση έναντι 1 L διαλύματος 25 mM Tris-HCl, 0.125 M NaCl pH 7.5. Στη συνέχεια το δείγμα συμπυκνώνεται με φίλτρο 100.000 cut-off έως τα 2 ml και συγκέντρωση 24 mg/mL.

Έπειτα πραγματοποιούνται 5 runs στη στήλη Superose 12 10/300 με ταχύτητα ροής 0.5 ml/min και συλλέγονται κλάσματα του 1 mL. Η στήλη έχει εξισορροπηθεί με 1.5 όγκο στήλης διάλυμα 25 mM Tris-HCl, 0.125 M NaCl pH 7.5. Το χρωματογράφημα παρουσιάζεται στην εικόνα 18.



**Εικόνα 18 :** Καθαρισμός της L-PSP με στήλη Superose 12 10/300. Χρησιμοποιείται διάλυμα 25 mM Tris-HCl, 0.125 M NaCl pH 7.5.

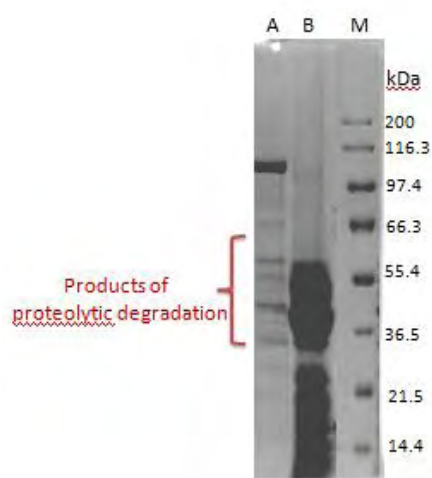


**Εικόνα 19 :** 10 % SDS PAGE ανάλυση των κλασμάτων που προκύπτουν από τη χρήση της στήλης Superose 12 10/300. Διαδρομή 1 : Φωσφορυλάση του γλυκογόνου απομονωμένη από μύες κονίκλων (rmGPb), διαδρομή 2 : εφαρμογή στη στήλη (Input), διαδρομές 4 -14 : έκλυση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών (κλάσματα 7 - 17).

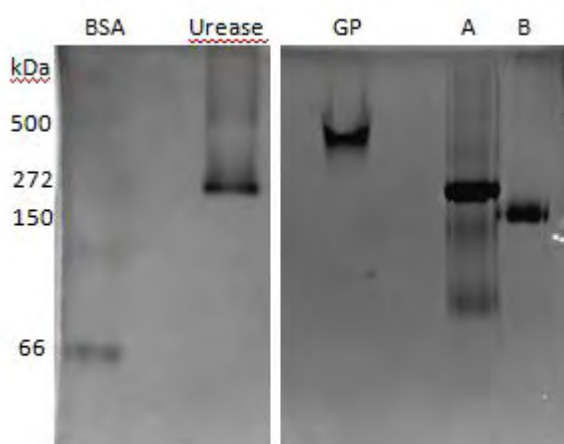
Μετά και την SDS PAGE ανάλυση τα κλάσματα τα οποία περιέχουν την L-PSP είναι το 8 και το 9 από κάθε run. Έτσι τα κλάσματα τα οποία περιέχουν την L-PSP (συνολικός όγκος 10 mL) συμπυκνώνονται με φίλτρο 30.000 cut-off μέχρι τελικού όγκου 150  $\mu$ L και τελικής συγκέντρωσης 21.9 mg/mL.

Κατά τη διάρκεια αυτών των πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι η L-PSP πρωτεολύεται, ένα φαινόμενο που παρατηρείται περισσότερο όταν το ένζυμο αφήνεται προς αποθήκευση σε θερμοκρασία 4 °C, δίνοντας ένα πρότυπο 4 ζωνών κατά την ανάλυση σε SDS PAGE που αντιστοιχούν στα προϊόντα της πρωτεόλυσης (Εικόνα 20).

**Εικόνα 20** : 10 % SDS PAGE. M : Marker, Διαδρομή A : L-PSP μετά την απομόνωση, Διαδρομή B : L-PSP μετά από 5 μήνες αποθήκευση στους 4 °C.



Επίσης κατά την ανάλυση σε Native PAGE, η απομονωμένη L-PSP έδωσε μια ζώνη στα 210 kDa, αλλά μετά το πέρασμα 5 μηνών τα προϊόντα πρωτεόλυσης δίνουν μια ζώνη με μοριακό βάρος 150 kDa, όπως φαίνεται στην εικόνα 21.

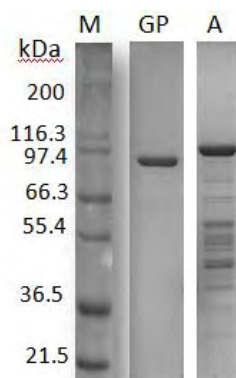


**Εικόνα 21** : 7 % Native PAGE. BSA : 66 kDa (μονομερές), 132 kDa (διμερές), Ουρεάση 272 kDa (τριμερές), 545 kDa (εξαμερές), GP : Φωσφορυλάση του γλυκογόνου απομονωμένη από μύες κονίκλων (rmGPb) παρουσία AMP (τετραμερές). Διαδρομή A : L-PSP μετά την απομόνωση, Διαδρομή B : L-PSP μετά από 5 μήνες αποθήκευση σε θερμοκρασία 4 °C.

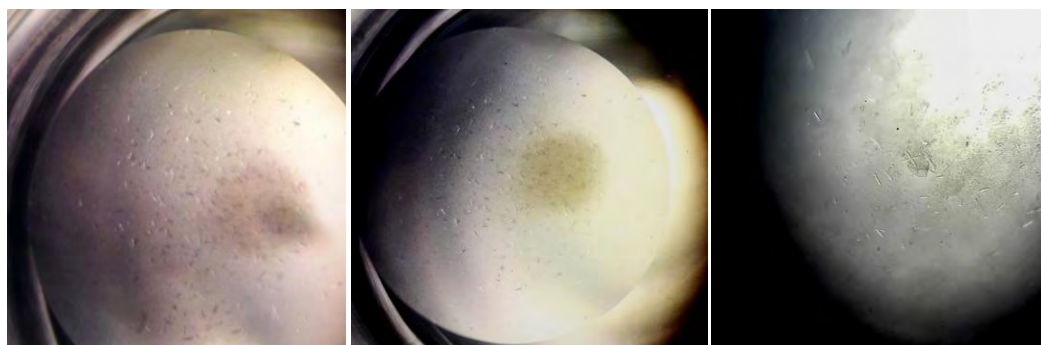


## 6.2 Κρυστάλλωση της L-PSP

Η κρυστάλλωση της L-PSP πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική της καθημένης σταγόνας σε καταβυθιστικό διάλυμα το οποίο περιείχε 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  και 5 mM Tris-HCl pH 7.5 σε συγκέντρωση ενζύμου 21.9 mg/mL.



**Εικόνα 22** : 10 % SDS PAGE ανάλυση. GP: Φωσφορυλάση του γλυκογόνου απομονωμένη από μύες κονίκλων (rmGPb), διαδρομή A : Συμπυκνωμένο δείγμα L- PSP μετά την συμπύκνωση με φίλτρο 30.000 cut off και τελική συγκέντρωση 21.9 mg/ml. Στην πηκτική φορτώθηκαν 30 μg πρωτεΐνης

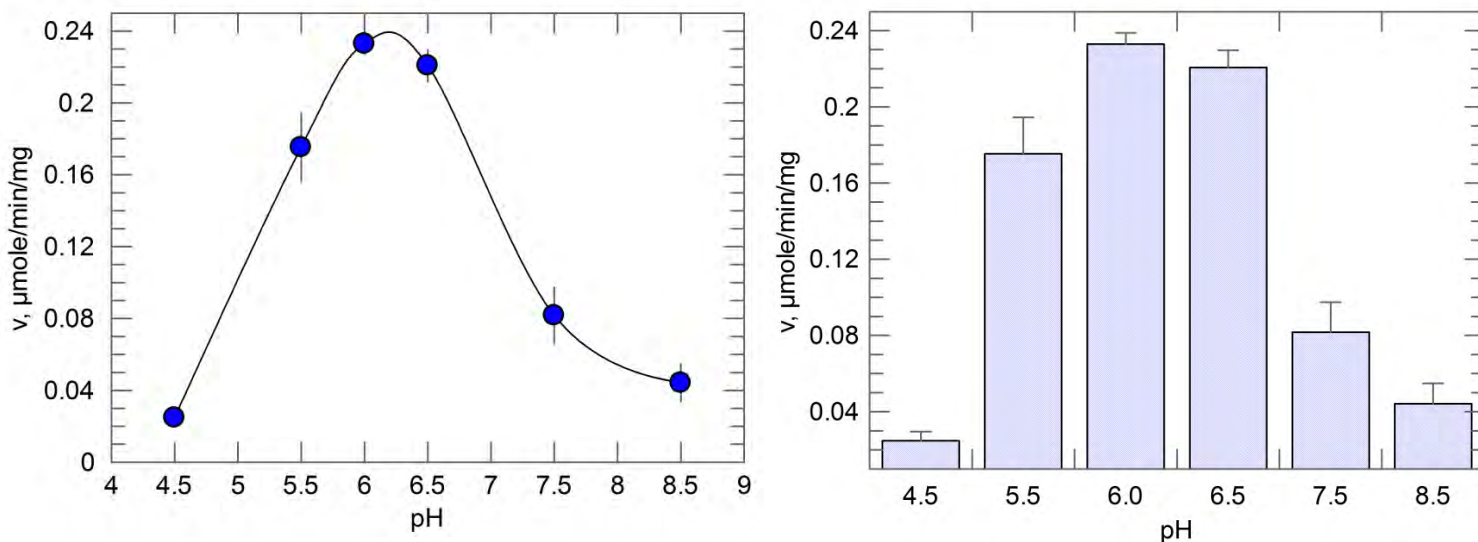


**Εικόνα 23** : Κρύσταλλοι L-PSP που αναπτύχθηκαν σε μέσο που περιείχε 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  και 5 mM Tris-HCl pH 7.5 σε συγκέντρωση ενζύμου 21.9 mg/ml.

## 6.3 Κινητικές Μελέτες

### 6.3.1 Έλεγχος για εύρεση του βέλτιστου pH

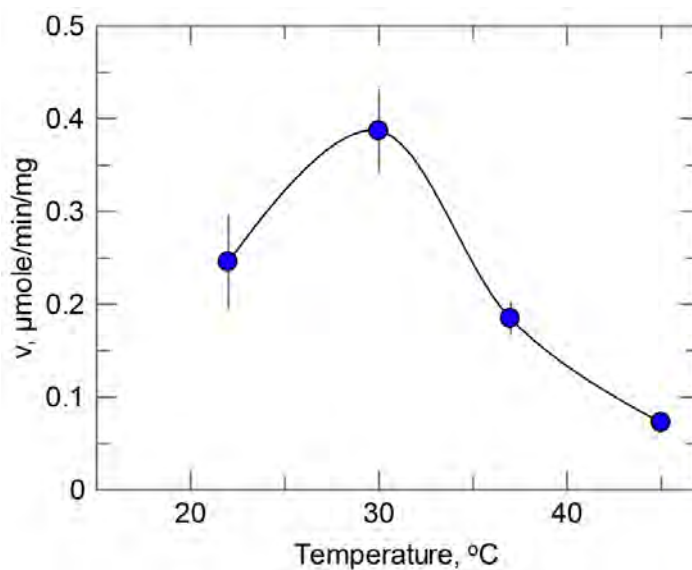
Το βέλτιστο pH για την L-PSP προσδιορίστηκε σε τιμή 6, όπως φαίνεται και στην εικόνα 24 και 25.



**Εικόνα 24 και 25:** Ελέγχθηκαν 6 διαφορετικές τιμές pH (4.5, 5.5, 6, 6.5, 7.5, 8.5), ώστε να διαπιστωθεί η βέλτιστη τιμή στην οποία η L-PSP παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα.

### 6.3.2 Έλεγχος για εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας

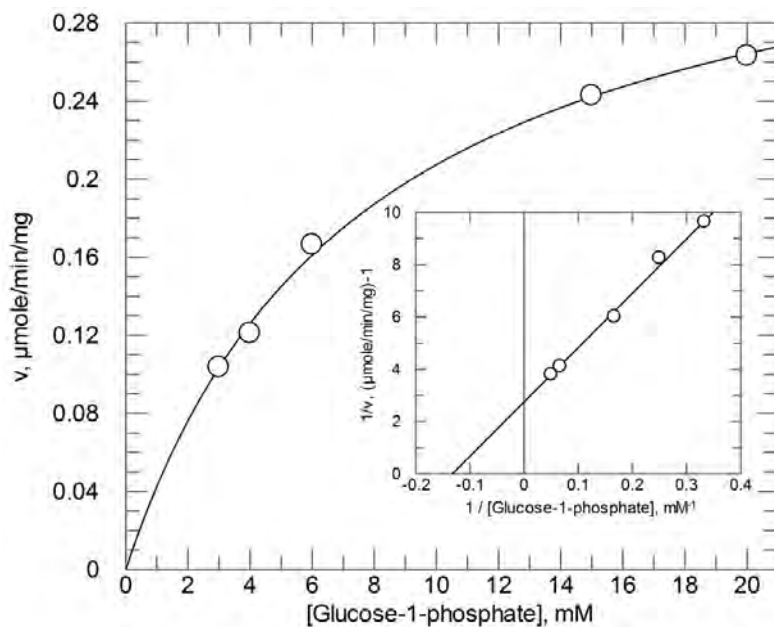
Η βέλτιστη θερμοκρασία για την L-PSP προσδιορίστηκε στους 30 °C όπως φαίνεται και στην εικόνα 26.



**Εικόνα 26:** Ελέγχθηκαν 4 διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας (20 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C), ώστε να διαπιστωθεί η θερμοκρασία στην οποία η L-PSP παρουσιάζει τη μεγαλύτερη δραστηριότητα.

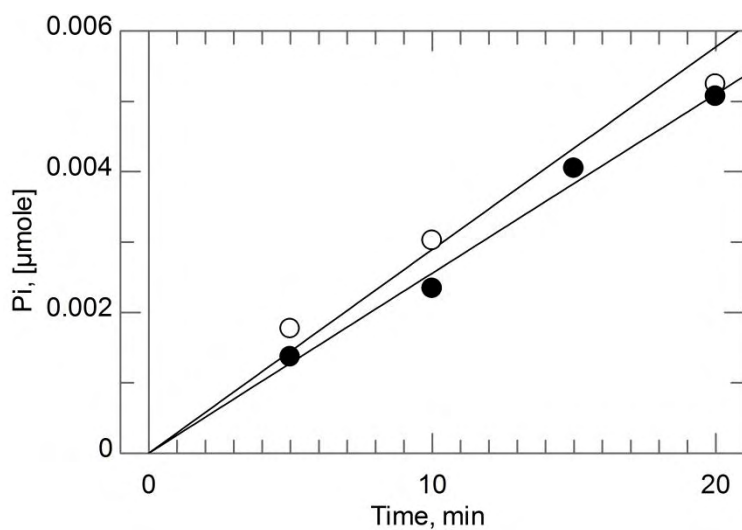
### 6.3.3 Προσδιορισμός της $K_m$

Η  $K_M$  για την G1P έναντι της L-PSP υπολογίστηκε σε  $7.58 \pm 0.53$  mM και η  $V_{max}$  ίση με  $0.36 \pm 0.01$   $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ .



**Εικόνα 27** : Διάγραμμα από τον προσδιορισμό της  $K_m$  για την G1P έναντι της L-PSP

### 6.3.3 Επίδραση της AMP



**Εικόνα 28** : Διάγραμμα όπου απεικονίζεται η παραγωγή  $P_i$  ( $\mu\text{moles}$ ) απουσία AMP (άσπρες κουκίδες) και παρουσία 25 mM AMP (μαύρες κουκκίδες).

Παρατηρείται ότι η L-PSP δεν επηρεάζεται από την AMP.

## 7. Συζήτηση

Οι φωσφορυλάσες του αμύλου έχουν ανακαλυφθεί εδώ και 70 χρόνια. Ωστόσο, ο ακριβής τους ρόλος στο μεταβολισμό του αμύλου δεν έχει γίνει ακόμα γνωστός. Πιο συγκεκριμένα η φωσφορυλάση του αμύλου από γεώμηλο (*Potato Starch Phosphorylase, PSP*) είναι ένα διμερές ένζυμο που απαντάται σε δύο ισομορφές στους βολβούς πατάτας. Η *Pho1* (*L- μορφή*) που βρίσκεται στα πλαστίδια και έχει χαμηλή συγγένεια για το άμυλο και την *Pho2* (*H- μορφή*) που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλότερη συγγένεια για το άμυλο. Η *Pho-1* ισομορφή περιέχει μια ένθεση 78 αμινοξέων (*Loop 78, L78*). Η *PSP* συμμετέχει στη σύνθεση και στην αποικοδόμηση του αμύλου, καθώς καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή της α-1,4-γλυκόζης και του ανόργανου φωσφόρου σε 1-φωσφορική γλυκόζη (*G1P*). Πολύ λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό ρύθμισης της *PSP* και τον ακριβή ρόλο που κατέχει η *L78* στη ρύθμιση της δράσης του ενζύμου. Στη φωσφορυλάση που προέρχεται από βολβούς γλυκοπατάτας έχουν βρεθεί κατάλοιπα σερίνης στην *L78*, τα οποία φωσφορυλιώνονται και καθιστούν το ένζυμο ευάλωτο προς πρωτεολυτική αποικοδόμηση.

Σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός της *L-PSP* από βολβούς γεωμήλων, με χρήση τεχνικών υγρής χρωματογραφίας και καταβύθισης με θειικό αμμώνιο. Πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες και βρέθηκε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία είναι οι 30 °C (Εικόνα 26), και το βέλτιστο *pH* είναι 6 (Εικόνα 24 και 25). Έτσι προσδιορίστηκε η  $K_M$  για την *G1P* έναντι της *L-PSP*, η οποία ήταν  $7.58 \pm 0.53$  mM. Όσον αφορά την αντίδραση σύνθεσης που μελετάμε κινητικά, δηλαδή την ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στον πολυσακχαρίτη, ώστε να προκύψει πολυσακχαρίτης με ένα περισσότερο κατάλοιπο γλυκόζης με παράλληλη απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων από την *G1P*, διαπιστώθηκε επίσης ότι η *L-PSP* δεν επηρεάζεται από την *AMP*.

Τέλος, έγινε κρυστάλλωση της *L-PSP* με την τεχνική της καθήμενης σταγόνας σε μέσο το οποίο περιείχε 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 mM Tris-HCl pH 7.5. Μελλοντικές προοπτικές αποτελούν ο χαρακτηρισμός της δομής του ενζύμου, ώστε να βρεθούν τα πιθανά κέντρα πρόσδεσης καθώς και ο ακριβής ρόλος της ένθεσης των 78 αμινοξέων που θεωρείται ότι ευθύνεται για την χαμηλή συγγένεια ως προς τους διακλαδισμένους πολυσακχαρίτες, αλλά και για την πρωτεόλυση που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Απώτερος στόχος είναι η αποσαφήνιση του ρόλου της *L-PSP* στο μεταβολισμό του αμύλου των ανώτερων φυτών αλλά και η μελέτη των συμπλόκων που πιθανώς δημιουργεί με άλλα ένζυμα του μεταβολισμού του αμύλου.

## Βιβλιογραφία

- Albrecht, T., Koch, A., Lode, A., Greve, B., Schneider-Mergener, J., & Steup, M. (2001). Plastidic (Pho1-type) phosphorylase isoforms in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants: expression analysis and immunochemical characterization. *Planta*, 213(4), 602-613.
- Berg JM, T. J., Stryer L. (2012). *Biochemistry*. 7th ed: New York: W.H. Freeman.
- Brisson, N., Giroux, H., Zollinger, M., Camirand, A., & Simard, C. (1989). Maturation and subcellular compartmentation of potato starch phosphorylase. *Plant Cell*, 1(5), 559-566. doi:10.1105/tpc.1.5.559
- Buchbinder, J. L., Rath, V. L., & Fletterick, R. J. (2001). Structural relationships among regulated and unregulated phosphorylases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 30, 191-209. doi:10.1146/annurev.biophys.30.1.191
- Burrell, M. M. (2003). Starch: the need for improved quality or quantity--an overview. *J Exp Bot*, 54(382), 451-456.
- Chen, H. M., Chang, S. C., Wu, C. C., Cuo, T. S., Wu, J. S., & Juang, R. H. (2002). Regulation of the catalytic behaviour of L-form starch phosphorylase from sweet potato roots by proteolysis. *Physiol Plant*, 114(4), 506-515.
- Clark John M. Jr, S. R. L. (2005). Πειραματική Βιοχημεία: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Dauvillee, D., Chochois, V., Steup, M., Haebel, S., Eckermann, N., Ritte, G., . . . Ball, S. G. (2006). Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 48(2), 274-285. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02870.x
- Della-Cioppa, G., Kishore, G. M., Beachy, R. N., & Fraley, R. T. (1987). Protein trafficking in plant cells. *Plant Physiol*, 84(4), 965-968.
- Echt, C. S., & Schwartz, D. (1981). Evidence for the Inclusion of Controlling Elements within the Structural Gene at the Waxy Locus in Maize. *Genetics*, 99(2), 275-284.
- Fukui, T., Shimomura, S., & Nakano, K. (1982). Potato and rabbit muscle phosphorylases: comparative studies on the structure, function and regulation of regulatory and nonregulatory enzymes. *Mol Cell Biochem*, 42(3), 129-144.
- Garfin, D. E. (2003). *Gel electrophoresis of proteins (Vol. 1)*. Oxford UK: Oxford University Press.
- Goren, A., Ashlock, D., & Tetlow, I. J. (2018). Starch formation inside plastids of higher plants. *Protoplasma*, 255(6), 1855-1876. doi:10.1007/s00709-018-1259-4
- Gross, P., & Ap Rees, T. (1986). Alkaline inorganic pyrophosphatase and starch synthesis in amyloplasts. *Planta*, 167(1), 140-145. doi:10.1007/BF00446381
- Healthcare, G. (2010a). *Ion Exchange Chromatography - Principles and Method*.
- Healthcare, G. (2010b). *Size Exclusion Chromatography - Principles and Method*.
- Hwang, S. K., Nishi, A., Satoh, H., & Okita, T. W. (2010). Rice endosperm-specific plastidial alpha-glucan phosphorylase is important for synthesis of short-chain malto-oligosaccharides. *Arch Biochem Biophys*, 495(1), 82-92. doi:10.1016/j.abb.2009.12.023
- Jenkins, P. J., & Donald, A. M. (1995). The influence of amylose on starch granule structure. *Int J Biol Macromol*, 17(6), 315-321.
- Kamogawa, A., Fukui, T., & Nikuni, Z. (1968). Potato alpha-glucan phosphorylase: crystallization, amino acid composition and enzymatic reaction in the absence of added primer. *J Biochem*, 63(3), 361-369.
- Keeling, P. L., & Myers, A. M. (2010). Biochemistry and genetics of starch synthesis. *Annu Rev Food Sci Technol*, 1, 271-303. doi:10.1146/annurev.food.102308.124214
- Kensal E. van Holde, W. C. J., P. Shing Ho (2006). *Principles of physical biochemistry (2nd ed.)*: Pearson Prentice Hall

- La Cognata, U., Willmitzer, L., & Muller-Rober, B. (1995). Molecular cloning and characterization of novel isoforms of potato ADP-glucose pyrophosphorylase. *Mol Gen Genet*, 246(5), 538-548.
- Michaelis, L., Menten, M. L., Johnson, K. A., & Goody, R. S. (2011). The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264-8269. doi:10.1021/bi201284u
- Mori, H., Tanizawa, K., & Fukui, T. (1993). A chimeric alpha-glucan phosphorylase of plant type L and H isozymes. Functional role of 78-residue insertion in type L isozyme. *J Biol Chem*, 268(8), 5574-5581.
- Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., & Hidaka, S. (1993). Identification of three Wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochem Genet*, 31(1-2), 75-86.
- Nakano, K., & Fukui, T. (1986). The complete amino acid sequence of potato alpha-glucan phosphorylase. *J Biol Chem*, 261(18), 8230-8236.
- Nakano, K., Fukui, T., & Matsubara, H. (1980). Structural basis for the difference of the regulatory properties between potato and rabbit muscle phosphrylases. The NH<sub>2</sub>-terminal sequence of the potato enzyme. *J Biol Chem*, 255(19), 9255-9261.
- Newgard, C. B., Hwang, P. K., & Fletterick, R. J. (1989). The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 24(1), 69-99. doi:10.3109/10409238909082552
- Nichols, D. J., Keeling, P. L., Spalding, M., & Guan, H. (2000). Involvement of conserved aspartate and glutamate residues in the catalysis and substrate binding of maize starch synthase. *Biochemistry*, 39(26), 7820-7825.
- Pilling, E., & Smith, A. M. (2003). Growth ring formation in the starch granules of potato tubers. *Plant Physiol*, 132(1), 365-371. doi:10.1104/pp.102.018044
- Preiss, J., Ball, K., Smith-White, B., Iglesias, A., Kakefuda, G., & Li, L. (1991). Starch biosynthesis and its regulation. *Biochem Soc Trans*, 19(3), 539-547.
- Rathore, R. S., Garg, N., Garg, S., & Kumar, A. (2009). Starch phosphorylase: role in starch metabolism and biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol*, 29(3), 214-224. doi:10.1080/07388550902926063
- Recondo, E., & Leloir, L. F. (1961). Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 6, 85-88.
- Roach, P. J. (2002). Glycogen and its metabolism. *Curr Mol Med*, 2(2), 101-120.
- Rydberg, U., Andersson, L., Andersson, R., Aman, P., & Larsson, H. (2001). Comparison of starch branching enzyme I and II from potato. *Eur J Biochem*, 268(23), 6140-6145.
- 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(2), 277-281.
- Sano, Y. (1984). Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theor Appl Genet*, 68(5), 467-473. doi:10.1007/BF00254822
- Staines, E. S. L. (1998). GraFit version 4.06.
- Tetlow, I. J. (2011). Starch biosynthesis in developing seeds. *Seed Science Research*, 21(01), 5-32. doi:0.1017/S0960258510000292
- Tetlow, I. J., Davies, E. J., Vardy, K. A., Bowsher, C. G., Burrell, M. M., & Emes, M. J. (2003). Subcellular localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. *J Exp Bot*, 54(383), 715-725.
- Tetlow, I. J., Morell, M. K., & Emes, M. J. (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot*, 55(406), 2131-2145. doi:10.1093/jxb/erh248