



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
ΦΩΣΦΟΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΑΠΟ ΓΕΩΜΗΛΑ



Κούρεντα Ευγενία του Παναγιώτη
2020

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΑΠΟ ΓΕΩΜΗΛΑ**

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

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΥ ΑΠΟ ΓΕΩΜΗΛΑ

Όνομα: Κούρεντα Ευγενία του Παναγιώτη

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτριος Δ. Λεωνίδας

Εργαστήριο: Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας : Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας
Και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστήμων
Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Νικόλαος Μπαλατσός: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα
Βιοχημείας Και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή
Επιστήμων Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Βασιλική Σκαμνάκη : Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας Λέκτορας
Βιοχημείας– Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας Και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστήμων Υγείας, Λάρισα,
Ελλάδα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	7
Περίληψη.....	8
Abstract.....	9
Εισαγωγή.....	10
1. Χαρακτηρισμός του γεώμηλου.....	10
2. Μεταβολισμός του αμύλου.....	10
2.1 Χαρακτηρισμός του αμύλου.....	10
2.2 Μοριακή δομή του αμύλου.....	11
2.3 Μονοπάτι βιοσύνθεσης του αμύλου.....	14
2.4 Σύνθεση της ADP-γλυκόζης.....	15
2.5 Ένζυμο διακλάδωσης του αμύλου.....	15
2.6 Ένζυμο αποδιακλάδωσης του αμύλου.....	16
2.7 Ένζυμο D.....	16
3. Φωσφορυλάση του αμύλου.....	17
3.1 Χαρακτηρισμός της φωσφορυλάσης του αμύλου.....	17
3.2 Ισομορφές της φωσφορυλάσης του αμύλου.....	18
3.3 Φωσφορυλάση του αμύλου από γεώμηλο (Potato Starch Phosphorylase, PSP).....	19
3.4 Πρωτεολυτική αποικοδόμηση της PSP.....	20
3.5 Διαμερισματοποίηση της PSP.....	21
3.6 Ρύθμιση της δράσης της Φωσφορυλάσης του αμύλου (SP).....	21
3.7 Αντίδραση κατάλυσης.....	22
3.8 Σύγκριση της φωσφορυλάσης του αμύλου από γεώμηλα (PSP) με τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου από μύες κουνελιών (rmGP) και την ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (hlGP).....	23
4. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων.....	24
4.1 Χαρακτηρισμός των ενζύμων.....	24

4.2 Κινητική των ενζύμων.....	24
4.3 Κινητική Michaelis-Menten.....	25
4.4 Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου ή Lineweaver-Burk	27
4.5 V_{max} & k_{cat}	28
4.6 K_i	28
4.7 Τα αλλοστερικά ένζυμα δεν υπακούουν στην κινητική Michaelis-Menten.....	30
4.8 IC_{50}	31
5. Υλικά, οργανολογία & μέθοδοι.....	32
5.1 Αντιδραστήρια.....	32
5.2 Οργανολογία.....	33
5.3 Κινητικές μελέτες έναντι της L-PSP.....	33
5.4 Αρχή της μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας.....	33
5.5 Προσδιορισμός της K_m	35
5.6 Έλεγχος για την επίδραση της AMP.....	37
5.7 Προσδιορισμός της IC_{50} του αναστολέα SZK158 έναντι της PSP.....	37
5.8 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα SZK158 έναντι της PSP.....	39
6. Αποτελέσματα.....	41
6.1 Προσδιορισμός της K_M	41
6.2 Έλεγχος για την επίδραση της AMP.....	41
6.3 Προσδιορισμός της IC_{50} του αναστολέα SzK158 έναντι της PSP.....	42
6.4 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα SzK158 έναντι της PSP.....	43
7. Συζήτηση.....	44
Βιβλιογραφία.....	45

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.....	12
Εικόνα 2.....	13
Εικόνα 3.....	13
Εικόνα 4.....	13
Εικόνα 5.....	17
Εικόνα 6.....	20
Εικόνα 7.....	22
Εικόνα 8.....	26
Εικόνα 9.....	27
Εικόνα 10.....	29
Εικόνα 11.....	29
Εικόνα 12	30
Εικόνα 13.....	30
Εικόνα 14.....	31
Εικόνα 15.....	32
Εικόνα 16.....	38
Εικόνα 17.....	41
Εικόνα 18.....	42
Εικόνα 19.....	42
Εικόνα 20.....	43

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Φεβρουάριο του 2020 έως τον Ιούνιο του 2020, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Δρ. Λεωνίδα Δημήτρη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για όλες τις υποδείξεις και συμβουλές του, καθώς για την προθυμία και για τις γνώσεις που αποκόμισα καθ' όλη την διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων. 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. Μπαλατσό Νικόλαο και Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική, για τη συνεργασία και για τις πολύτιμες συμβουλές τους. Ένα τεράστιο ευχαριστώ στο Συμεών Κούλα υποψήφιο διδάκτορα του εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την αδιάκοπη βοήθεια, το χρόνο του, αλλά και τις στοχευμένες παρατηρήσεις και συμβουλές. Πάντοτε ήταν πρόθυμος να με καθοδηγήσει και επέδειξε υπομονή στην αντιμετώπιση κάθε προβλήματος που πρόκυπτε κατά τη διαδικασία του πειράματος. Οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια και τη δημιουργία ενός ευχάριστου κλίματος. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τους συμφοιτητές μου και φίλους μου για τη συμπαράστασή και τη στήριξή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Ιδιαίτερες θερμές ευχαριστίες θέλω να δώσω στην οικογένεια μου για την συνεχής συμπαράστασή τους, για τις πολύτιμες συμβουλές τους και για όλα όσα μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια της ζωής μου αλλά και των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το άμυλο είναι η κύρια μορφή αποθήκευσης υδατανθράκων στα φυτά καθώς και σε πολλούς άλλους φωτοαυτότροφους οργανισμούς. Οι φωσφορυλάσες του αμύλου SP (Starch Phosphorylase) είναι μέλη της οικογένειας των γλυκοσυλτρανσφερασών CAZy GT35 και καταλύουν την αντιστρεπτή μεταφορά καταλοίπων γλυκόζης από έναν δότη στο μη αναγωγικό άκρο μιας αλυσίδας α-γλυκάνης. Πιο συγκεκριμένα καταλύουν 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. Τα φυτά περιέχουν δύο διαφορετικά ισoenζυμα φωσφορυλάσης α-1,4-γλυκάνης. Συγκεκριμένα στα γεώμηλα υπάρχουν δύο ισομορφές ισομορφές φωσφορυλάσης του αμύλου (Potato Starch Phosphorylase, PSP), η Pho1 (L-PSP) και η Pho2 (H-PSP) που βρίσκονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Η L-PSP είναι μια διμερής πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος περίπου 105 kDa και χαμηλή συγγένεια για διακλαδισμένες γλυκάνες, όπως το γλυκογόνο και το άμυλο. Από την άλλη πλευρά, η μορφή H έχει μοριακό βάρος περίπου 90 kDa και υψηλή συγγένεια για γραμμικές και διακλαδισμένες γλυκάνες. Η L-PSP είναι μεγαλύτερη από την H-PSP, καθώς περιέχει μια ένθεση 78 αμινοξέων κοντά στο κέντρο πρόσδεσης του πολυσακχαρίτη. Η δραστηριότητα της PSP δεν επηρεάζεται από νουκλεοτίδια και ακολουθεί κινητική Michaelis – Menten.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες του ενζύμου. Αρχικά, προσδιορίστηκε η K_M του ενζύμου αλλά πραγματοποιήθηκε και έλεγχος της επίδρασης της AMP. Στη συνέχεια μελετήθηκε η σύνδεση ενός ανάλογου της γλυκόζης (SzK158), στη φωσφορυλάση του αμύλου (L-PSP) με κινητικές μεθόδους. Για τον συγκεκριμένο αναστολέα, SzK158, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των σταθερών IC_{50} και K_i έναντι της L-PSP.

ABSTRACT

Starch is the main form of carbohydrate storage in plants as well as in many other phototrophic organisms. Starch Phosphorylases SP are members of the CAZy GT35 family of glycosyltransferases and catalyze the reversible transfer of glucose residues from a donor to the non-reducing end of an α -glucan chain. More specifically, they catalyze the reversible conversion of α -1,4-glucose and inorganic phosphorus to glucose 1-phosphate (G1P) and play a substantial role in starch metabolism. Plants contain two different α -1,4-glucan phosphorylase isoenzymes. In potatoes, specifically, there are two isoforms of PSP (Potato Starch Phosphorylase), Pho1 (L-PSP) and Pho2 (H-PSP), located in different cell compartments. L-PSP is a dimeric protein with a molecular weight of approximately 105 kDa displaying low affinity for branched glucans such as glycogen and starch. Form H, on the contrary, has a molecular weight of about 90 kDa and very high affinity for linear and branched glucans. L-PSP is larger than H-PSP as it contains an insertion of 78 residues near the starch binding site. PSP activity is not affected by nucleotides, followed by Michaelis-Menten kinetics.

In the current study, kinetic studies of the enzyme were performed. Initially, the K_M of the enzyme was determined. The effect of AMP was also tested. Consequently, the binding of a glucose analogue, (SZk158), to starch phosphorylase (L-PSP) by kinetic methods was examined. For this specific inhibitor (SZk158), the IC_{50} and K_i values for L-PSP were determined.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Χαρακτηρισμός του γεώμηλου

Το γεώμηλο, το οποίο είναι γνωστό και ως πατάτα (*Solanum tuberosum*), είναι ένα από τα πιο σημαντικά φυτά στον κόσμο με ετήσια παραγωγή 380 εκατομμυρίων τόνων, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Στρυχνοειδών. Καλλιεργείται, κυρίως στη Κίνα, για τους κονδύλους του, οι οποίοι είναι πλούσιοι σε άμυλο και περιέχουν ανόργανα άλατα και βιταμίνες καθώς και απαραίτητα αμινοξέα καθιστώντας το τροφή μεγάλης θρεπτικής αξίας. Χρησιμεύει ως βασική τροφή, ζωοτροφή, αλλά και σε πληθώρα βιομηχανικών διεργασιών (Jessica K. Van Harselaar, 2017).

Σε σύγκριση με τα άμυλα καλαμποκιού, ρυζιού και σίτου, το άμυλο πατάτας, ο κύριος υδατάνθρακας των κονδύλων πατάτας, έχει χαμηλότερη θερμοκρασία ζελατινοποίησης, υψηλότερη διαφάνεια και ιξώδες. Επομένως, το άμυλο πατάτας χρησιμεύει ως πρώτη ύλη ή πρόσθετο τροφίμων στη βιομηχανία τροφίμων (Wei Zhang, 2018).

2. Μεταβολισμός του αμύλου

2.1 Χαρακτηρισμός του αμύλου

Το άμυλο είναι ένας από τους πολυσακχαρίτες που αποτελούν τη κύρια μορφή αποθήκευσης υδατανθράκων σε πολλούς οργανισμούς. Το αποταμιευτικό άμυλο που παράγεται σε κονδύλους είναι μια πολύτιμη πρώτη ύλη και αντιπροσωπεύει μια σημαντική πηγή θερμίδων για τον άνθρωπο και για τα ζώα εδώ και πολλές χιλιάδες χρόνια. Ωστόσο, τα άμυλα που παράγονται σε διάφορους ιστούς των φυτών διαδραματίζουν ζωτική λειτουργία κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του φυτού, ρυθμίζοντας έτσι τη διαθεσιμότητα σακχάρων για την ανάπτυξη τους (Asena Goren, 2018). Το άμυλο των φυτών σχετίζεται με το γλυκογόνο, ωστόσο η βιοσύνθεση και η δομή του είναι πιο περίπλοκη. Όπως το γλυκογόνο, το άμυλο χρησιμεύει ως υδατάνθρακας αποθήκευσης σε καταστάσεις αυξημένης ενεργειακής ανάγκης. Το άμυλο είναι γνωστό ότι συγκεντρώνεται στους αμυλοπλάστες και στους χλωροπλάστες των πράσινων ιστών (Melanie R Abt and Samuel C Zeeman, 2020).

Σε μη φωτοσυνθετικά όργανα (π.χ. ρίζες, κόνδυλοι και σπόροι), η σουκρόζη μπορεί να μετατραπεί σε άμυλο στους αμυλοπλάστες τα οποία είναι εξειδικευμένα πλαστίδια. Αυτό το αποταμιευτικό άμυλο απομακρύνεται εκ

νέου για να υποστηρίξει φάσεις ανάπτυξης ή για να ικανοποιεί τοπικά υψηλή ζήτηση άνθρακα για συγκεκριμένες διεργασίες. Το άμυλο συσσωρεύεται επίσης παροδικά σε ορισμένους τύπους κυττάρων σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Για παράδειγμα, εμφανίζεται συχνά σε ιστούς πίσω από τις ζώνες διαίρεσης των μερισμάτων (Samuel C. Zeeman, 2010).

Στους χλωροπλάστες των πράσινων ιστών συντίθεται το μεταβατικό άμυλο κατά τη διάρκεια της ημέρας και αποικοδομείται τη νύχτα σε σουκρόζη για να παρέχει άνθρακα και ενέργεια για το μη φωτοσυνθετικό μεταβολισμό (Ian J. Tetlow, 2011). Πιο συγκεκριμένα στα φύλλα, ένα κλάσμα του άνθρακα που εξομοιώνεται μέσω της φωτοσύνθεσης διατηρείται στους χλωροπλάστες ως άμυλο αντί να μετατρέπεται σε σουκρόζη και μεταφέρεται στις περιοχές ανάπτυξης. Το μεταβατικό άμυλο, δηλαδή, αποικοδομείται τη νύχτα για να παρέχει υποστρώματα για την αναπνοή φύλλων και για συνεχή σύνθεση σουκρόζης για εξαγωγή στο υπόλοιπο φυτό (Samuel C. Zeeman, 2010).

Το άμυλο είναι μια αδιάλυτη στο νερό πολυγλυκάνη, που συντίθεται μέσα στο πλαστίδιο εντός των φυτικών κυττάρων. Τα πλαστίδια είναι εξειδικευμένα υποκυτταρικά οργάνια που προέρχονται προγονικά από φωτοσυνθετικούς προκαρυώτες μέσω της διαδικασίας της ενδοσυμβίωσης. Το άμυλο διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην παροχή του άνθρακα ολόκληρου του φυτού. Είναι ζωτικής σημασίας για την κανονική ανάπτυξη των φυτών, ενεργώντας ως βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη αποθήκη ενέργειας (Asena Goren, 2018). Το άμυλο ως ένας πολυσακχαρίτης αποτελείται από πολλές μονάδες γλυκόζης. Τα κατάλοιπα γλυκόζης συγκρατούνται με γλυκοζιδικούς δεσμούς. Συντίθεται με τη μορφή κοκκίων κατά τη φωτοσύνθεση στους αμυλοπλάστες και μεταφέρεται σε διαφορετικά όργανα του φυτού για αποθήκευση. Το μέγεθος των κοκκίων αμύλου κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 1 και 100 μm και το σχήμα τους μπορεί να είναι φακοειδές, ακανόνιστο, σφαιρικό και πολυεδρικό (Prarthana V. Kowsik, 2018).

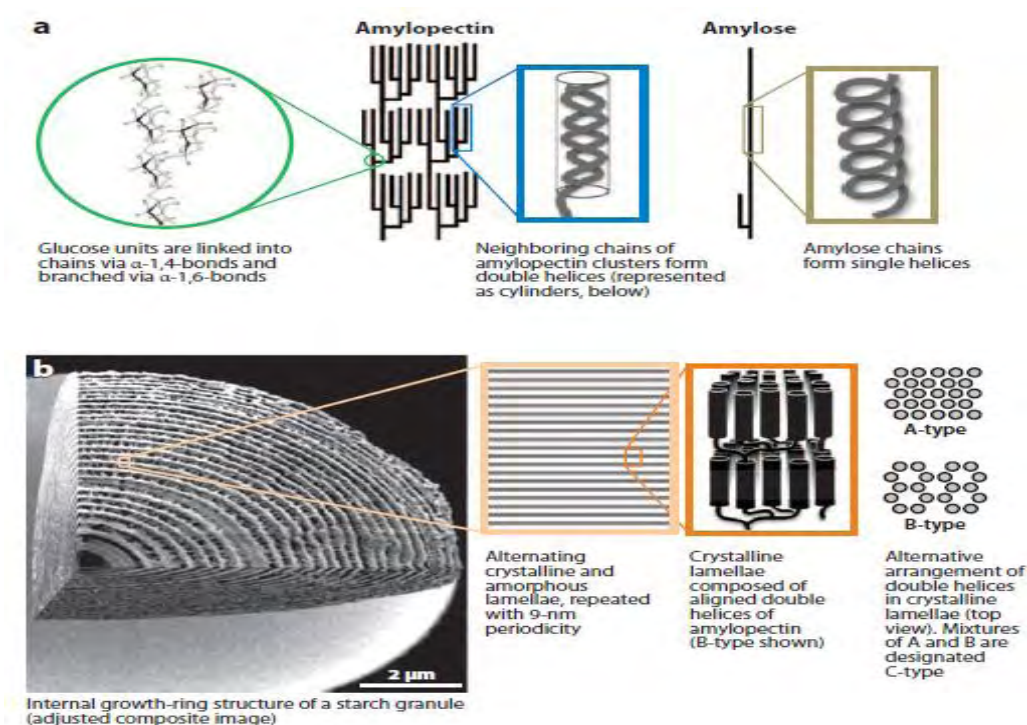
2.2 Μοριακή δομή του αμύλου

Οι περισσότεροι κόκκοι αμύλου περιέχουν ομόκεντρους «δακτυλίους ανάπτυξης» που είναι ορατοί με σάρωση ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας, μετά από χάραξη της μήτρας κοκκίων με οξέα ή υδρολυτικά ένζυμα. Αυτοί οι δακτύλιοι έχουν περιοδικότητες αρκετών εκατοντάδων νανομέτρων. Θεωρείται ότι αντικατοπτρίζουν την οργάνωση των εναλλασσόμενων κρυσταλλικών άμορφων ελασμάτων σε σχεδόν σφαιρικά μπλοκ, τα οποία

ποικίλλουν περιοδικά σε διάμετρο μεταξύ 20 και 500 nm (Samuel C. Zeeman,2010). (Εικόνα 1)

Σε κάποιο στάδιο ωστόσο, η δομή των κοκκίων του αμύλου θα πρέπει να αποικοδομηθεί και έτσι η δομή του κοκκίου πρέπει να έχει σημεία εισόδου για τα ένζυμα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση (I. J. Tetlow et al., 2004). (Εικόνα 1)

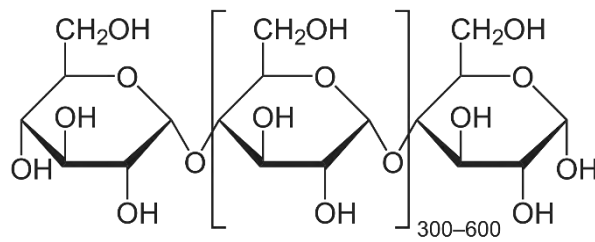
Το ομοπολυμερές άμυλο αποτελείται από δεκάδες χιλιάδες μόρια γλυκόζης, που ενώνονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς και σχηματίζουν σπειροειδή ή διακλαδισμένη αλυσίδα. Το άμυλο αποτελείται από την αμυλόζη και την αμυλοπηκτίνη (Styer L.). Η αμυλοπηκτίνη και η αμυλόζη σχηματίζουν μαζί ημικρυσταλλικούς, αδιάλυτους κόκκους με εσωτερική στρωματοειδή δομή. (Εικόνα 1)



Εικόνα 1: Η σύνθεση και η δομή των κόκκων αμύλου. (α) Σχηματική αναπαράσταση αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης (β) Η σχέση μεταξύ του κοκκίου αμύλου και της δομής αμυλοπηκτίνης. Τα κρυσταλλικά και άμορφα ελάσματα σχηματίζουν μπλοκ που αποτελούν τους δακτυλίους ανάπτυξης (Samuel C. Zeeman,2010)

Η αμυλόζη, η οποία είναι διαλυτή στο νερό, είναι ο τύπος αμύλου χωρίς διακλαδώσεις, δηλαδή, αποτελείται από πολλά μόρια γλυκόζης σε ευθεία διάταξη. Πιο συγκεκριμένα, η αλυσίδα αποτελείται από 350-1000 μόρια γλυκόζης και αποτελεί το 25% περίπου των κοκκίων του αμύλου. Τα κατάλοιπα αυτά γλυκόζης είναι συνδεδεμένα με α -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό σε

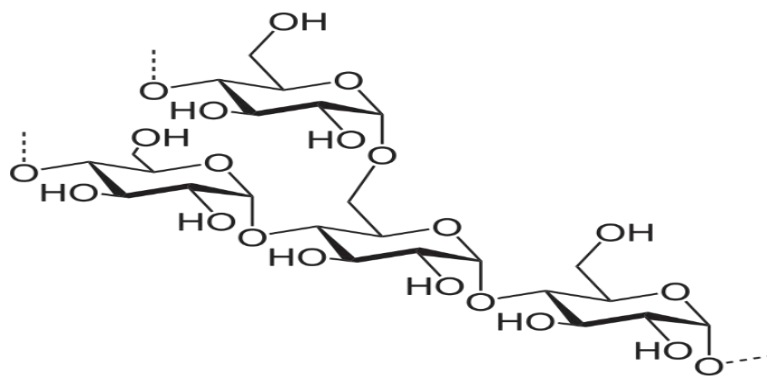
ευθεία δομή (Stryer, 2015). Παρ' όλα αυτά όμως η ακριβής θέση της αμυλόζης στα κοκκία του αμύλου δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα (Εικόνα 2).



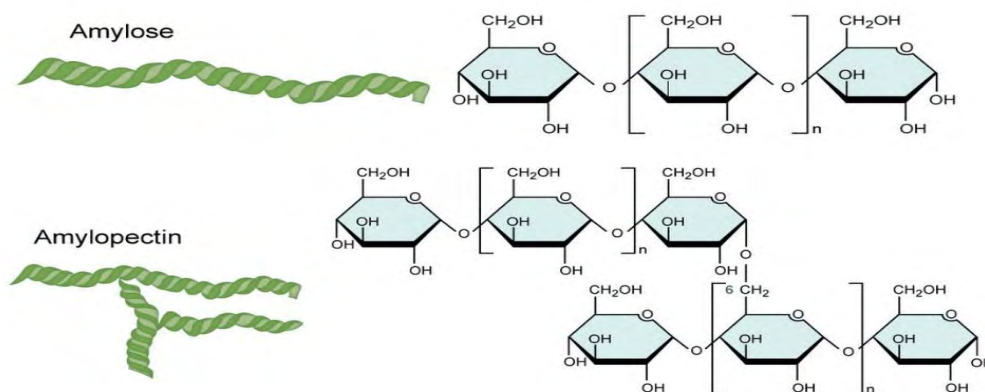
Εικόνα 2: Δομή του μορίου της αμυλόζης

Η αμυλοπηκτίνη, που είναι αδιάλυτη στο νερό, είναι ο τύπος αμύλου με διακλαδώσεις που διαθέτει έναν α -1,6 γλυκοζιτικό δεσμό ανά 30 δεσμούς α -1,4 με παρόμοιο τρόπο με το γλυκογόνο. Η αμυλοπηκτίνη βρίσκεται κυρίως στο εξωτερικό του κοκκίου του αμύλου. Αποτελεί το 75% περίπου των κοκκίων του αμύλου. (Stryer, 2015). (εικόνα 3)

Είναι γνωστό ότι η αμυλόζη, η αμυλοπηκτίνη και το γλυκογόνο υδρολύονται ταχύτατα από την α -αμυλάση (Stryer, 2015).



Εικόνα 3: Δομή του μορίου της αμυλοπηκτίνης



Εικόνα 4: Διαφορές αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης

2.3 Μονοπάτι βιοσύνθεσης του αμύλου

Το άμυλο συντίθεται κυρίως από το νουκλεοτιδικό διφωσφορικό σάκχαρο ADP γλυκόζη (ADP-Glc) μέσω της ενορχηστρωμένης δράσης πολλών ενζύμων που εντοπίζονται στα πλαστίδια. Η ADP-Glc είναι αυτή που συμμετέχει στην επιμήκυνση της α -1,4 αλυσίδας γλυκάνης με αντιδράσεις που εξαρτώνται από τις ADP-Glc γλυκοσυλοτρανσφεράσες. Οι γλυκοσυλοτρανσφεράσες διακρίνονται σε άμυλο συνθάσες (SS), που συμμετέχουν στη σύνθεση αμυλοπηκτίνης και σε συνθετάσες των αμυλοκοκκίων (GBSS) που συμμετέχουν στη σύνθεση αμυλόζης (Asena Goren, 2018). Οι συνθάσες αμύλου (SSs) είναι μια οικογένεια τουλάχιστον έξι συντηρημένων γλυκοσυλοτρανσφερασών (GTs) από την οικογένεια 5 των γλυκοσυλοτρανσφερασών, που μεσολαβούν στη βιογένεση της αμυλόζης (GBSS) και της αμυλοπηκτίνης (SS1- SS5). Οι αλυσίδες α -1,4 συνδεδεμένης γλυκάνης (MOS), οι οποίες παράγονται από τις ισομορφές του SS, διακλαδίζονται με την εισαγωγή α -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών από ένζυμα διακλάδωσης αμύλου (Starch Branching Enzymes, SBE). Τα ένζυμα αποδιακλάδωσης αμύλου (Debranching Enzymes, DBE) συμβάλλουν στη διαμόρφωση κοκκίων αμύλου, καθώς κόβουν συγκεκριμένα σημεία διακλάδωσης στο νεοσυντηθέμενο κοκκίο. Πολλές από αυτές τις ενζυμικές δράσεις συντονίζονται μέσω διαφόρων ρυθμιστικών διαδικασιών, μερικές από τις οποίες πιστεύεται ότι εμπλέκονται στη δημιουργία των κοκκίων (Asena Goren, 2018).

2.4 Σύνθεση της ADP-γλυκόζης

Η ADP-γλυκόζη είναι το πρόδρομο μόριο της βιοσύνθεσης του αμύλου. Ο σχηματισμός ADP-Glc σε φυτικά κύτταρα από το ένζυμο πυροφωσφορυλάση της ADPGlc (AGPase) πραγματοποιείται δεσμεύοντας τον φωτοσυνθετικό άνθρακα στη σύνθεση του αμύλου. Η AGPase είναι ένα ετεροτετραμερές ένζυμο που αποτελείται από δύο μεγάλες (AGP-L) και δύο μικρές (AGP-S) υπομονάδες, και μετατρέπει την 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc1P) και την ATP σε ADP-Glc και πυροφωσφορικό ιόν (PPi). Η αντίδραση αυτή είναι αντιστρεπτή και λαμβάνει χώρα σε διάφορα επίπεδα κυτταρικού και μεταβολικού ελέγχου.



Είναι γνωστό ότι η AGPase καταλύει μια αντίδραση ισορροπίας. *In vivo*, η αντίδραση μετατοπίζεται υπέρ της σύνθεσης ADP-Glc και άρα και της σύνθεσης του αμύλου με απομάκρυνση των PPi. Σε ιστούς ενδοσπερμίου οι αντιδράσεις που καταναλώνουν PPi στο κυτταρόπλασμα που συνδέονται με τη διάσπαση της σουκρόζης θεωρείται ότι είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό ADP-Glc από την κυτοσολική AGPase. Πιο συγκεκριμένα, η ADP-Glc που συντίθεται στο κυτοσόλιο μεταφέρεται στον αμυλοπλάστη για βιοσύνθεση αμύλου μέσω ενός εξειδικευμένου ADP-Glc-/ADP antiporter (BT1) που βρίσκεται στη μεμβράνη του πλαστιδίου του εσωτερικού φακέλου. Οι πλαστιδικές ισομορφές της AGPase ρυθμίζονται αλλοστερικά από το 3-φωσφογλυκερικό οξύ (3-PGA), που είναι ενεργοποιητής, και τα φωσφορικά ιόντα (Pi), που είναι αναστολείς. Οι δύο αλλοστερικοί τελεστές είναι σημαντικοί στον έλεγχο της σύνθεσης αμύλου στους φωτοσυνθετικούς ιστούς. Ωστόσο η πλαστιδική AGPase από τα γεώμηλα παρουσιάζει μειωμένη ευαισθησία σε αυτούς τους αλλοστερικούς παράγοντες (Asena Goren, 2018).

Η πυροφωσφορυλάση της ADP-γλυκόζης καταλύει τη βιοσύνθεση του αμύλου στα φυτά και τη βιοσύνθεση του γλυκογόνου στα βακτήρια. Είναι σημαντική για τη ρύθμιση της συσσώρευσης αποθήκευσης πολυσακχαριτών σε φυτά και βακτήρια, που ενεργοποιούνται αλλοστερικά ή αναστέλλονται από μεταβολίτες ενεργειακής ροής (Xiangshu Jin, 2005).

2.5 Ένζυμο διακλάδωσης του αμύλου

Η καταλυτική δράση των ενζύμων διακλάδωσης του αμύλου (Starch Branching Enzymes, SBEs, E.C. 2.4.1.18), έχει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της δομής της αμυλοπηκτίνης. Όλα τα SBE καταλύουν μια μη αναστρέψιμη

αντίδραση δημιουργώντας α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς σε μια γραμμική α -1,4-συνδεδεμένη γλυκάνη μέσω υδρολυτικής διάσπασης των εσωτερικών α -1,4 δεσμών. Δημιουργούν επίσης, ένα νέο μη αναγωγικό άκρο στην αλυσίδα ολιγοσακχαριτών και ένα πιθανό υπόστρωμα για διαλυτά SSs. Πειράματα *in vitro* με πρωτεϊνικά σύμπλοκα που αποτελούνται από SSs και SBEs έδειξαν αυξημένη καταλυτική δράση των SSs στο σύμπλεγμα. Τα SBE μπορούν να εκτελέσουν δύο τύπους σχηματισμού διακλάδωσης μετά από διάσπαση της α -1,4-σύνδεσης: η διασπασμένη γλυκάνη μπορεί να μεταφερθεί σε μια αλυσίδα, η οποία είναι είτε μέρος της αρχικής αλυσίδας γλυκάνης είτε μέρος μιας παρακείμενης αλυσίδας γλυκάνης. Οι πρώτες μελέτες στο γεώμηλο υποδηλώνουν ότι ο μηχανισμός αντίδρασης επηρεάζεται από τοπικές συγκεντρώσεις α -1,4-γλυκανών (MOS) (Asena Goren, 2018).

Υπάρχουν δύο σημαντικές τάξεις SBE: SBEI ή SBE B και SBEII ή SBE A. Αυτές διαφέρουν ως προς το μήκος της αλυσίδας γλυκάνης που μεταφέρεται *in vitro* και ως προς τις ιδιαιτερότητες των υποστρωμάτων τους. Τα SBEII μεταφέρουν μικρότερες αλυσίδες και εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια προς την αμυλοπηκτίνη σε σχέση με τα SBEI. Τα SBEI από την άλλη, παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά διακλάδωσης με την αμυλόζη (Rydberg, Andersson, Andersson, Aman, & Larsson, 2001)

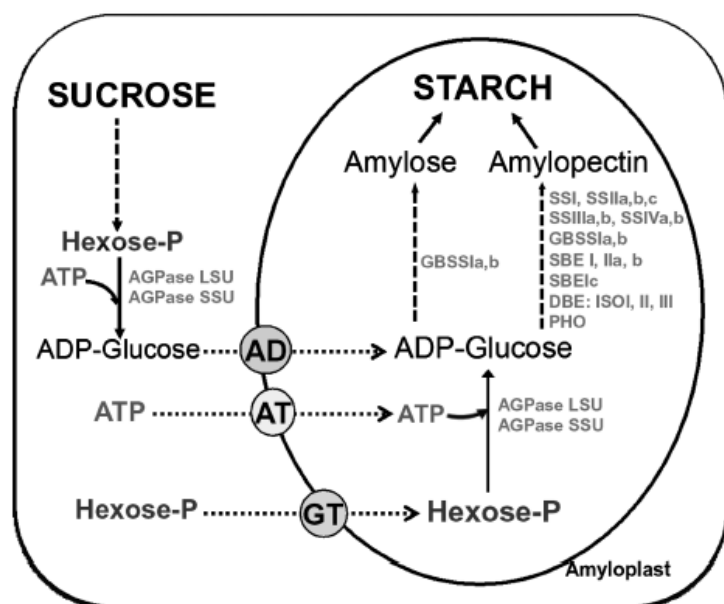
2.6 Ένζυμο αποδιακλάδωσης του αμύλου

Τα ένζυμα αποδιακλάδωσης του αμύλου στα φυτά (Debranching enzymes, EC 3.2.1.41 και EC 3.2.1.68) (DBEs) περιλαμβάνουν ένα σύνολο σημαντικών ενζύμων απαραίτητων για το σχηματισμό αμύλου. Τα DBEs καταλύουν την υδρόλυση α -1,6 γλυκοζιδικών δεσμών, απελευθερώνοντας γραμμικές αλυσίδες γλυκάνης. Υπάρχουν δύο τύποι DBE. Ο πρώτος, είναι ο τύπος ισοαμυλάσης (ISA) και ο δεύτερος πουλουλανάσης (PUL). Ενώ το ISA παίζει κυρίαρχο ρόλο στα ενδοσπερμικά δημητριακά, το PUL μπορεί να αντισταθμίσει το ρόλο του ISA. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι τα βιοσυνθετικά ένζυμα αμύλου λειτουργούν, όχι μόνο μεμονωμένα αλλά και με τη μορφή συμπλοκών ενζύμων (Gilbert, 2015).

2.7 Ένζυμο D

Το ένζυμο D (Disproportionating enzyme, D-enzyme, E.C. 2.4.1.25) καταλύει τη μεταφορά δύο καταλοίπων γλυκόζης από τη μαλτοριόζη σε μια μακρύτερη αλυσίδα α -γλυκάνης, με αποτέλεσμα την παραγωγή Glc. Σε περίπτωση που δημιουργηθεί στο πλαστίδιο, μπορεί να εξαχθεί στο κυτταρόπλασμα, μέσω

του μεταφορέα Glc στην εσωτερική μεμβράνη του φακέλου. Επιπλέον, το ένζυμο D παίζει ρόλο στη σύνθεση αμύλου μέσω της τροποποίησης των MOS που παράγονται από το DBE. *In vitro* μελέτες ενζύμου στο ενδοσπέρμιο σίτου και ρυζιού δείχνουν ότι η μαλτοεπταόζη (DP 7) είναι ένας αποτελεσματικός δότης για την προσθήκη α-γλυκανών στην αμυλοπηκτίνη ή το γλυκογόνο. Ένας πιθανός ρόλος για το σύμπλοκο D-ένζυμο / SP κατά τη σύνθεση της αμυλοπηκτίνης θα μπορούσε να είναι στη χρήση των MOS που απελευθερώνονται από τα DBEs. Η βραχεία αλυσίδα MOS που απελευθερώνεται από την δράση των DBEs μπορεί να επεκταθεί με το ένζυμο D. Είναι σαφές ότι, η φωσφορολυτική αντίδραση SP διεγείρεται από την παρουσία ενζύμου D (Asena Goren,2018).



Εικόνα 5: Βιοσυνθετικό μονοπάτι του αμύλου (Diane M. Beckles and Maysaya Thitisaksaku,2014)

3. Φωσφορυλάση του αμύλου

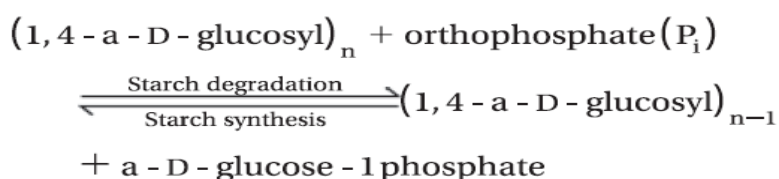
3.1 Χαρακτηρισμός της φωσφορυλάσης του αμύλου

Είναι γνωστό ότι οι φωσφορυλάσες του αμύλου είναι μέλη της οικογένειας των γλυκοσυλτρανσφερασών CAZy GT35 που καταλύουν την αντιστρεπτή μεταφορά καταλοίπων γλυκόζης από έναν δότη στο μη αναγωγικό άκρο μιας αλυσίδας α-γλυκάνης. Οι γλυκοσυλοτρανσφεράσες (GTs) αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες ενζύμων μεταβολισμού υδατανθράκων.

Καταλύουν το σχηματισμό γλυκοσιδικών δεσμών μεταφέροντας το τμήμα σακχάρου από έναν ενεργοποιημένο δότη σε συγκεκριμένα μόρια δέκτη. Δρουν κυρίως ως αποικοδομητικά ένζυμα πολυγλυκανών μέσω φωσφορόλυσης και ως επί το πλείστον είναι ενεργά στην ομοδιμερή μορφή τους με την 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) να λειτουργεί ως συμπαράγοντας (Jose A. Cuesta-Seijo,2017).

Οι φωσφορυλάσες από διάφορες πηγές έχουν ταξινομηθεί σε τρεις ομάδες. Τα ένζυμα τύπου I, όπως η φωσφορυλάση του κονδύλου πατάτας, που βρίσκονται σε πλαστίδια, διαθέτουν υπομονάδες περίπου 105 kDa και υδρολύουν την αμυλοπηκτίνη, την αμυλόζη και τη μαλτοδεξτρίνη ενώ έχουν χαμηλή συγγένεια για το γλυκογόνο ως υπόστρωμα. Οι φωσφορυλάσες τύπου II, οι φωσφορυλάσες των μη-πλαστιδικών φυτών, έχουν μικρότερες υπομονάδες, περίπου 90 kDa και παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια τόσο για το γλυκογόνο όσο και για την αμυλοπηκτίνη και την αμυλόζη. Οι φωσφορυλάσες τύπου III, όπως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου από μύες κουνελιού, έχουν υψηλότερη συγγένεια για διακλαδισμένες από ό,τι για γραμμικές γλυκάνες (Anne Camirand,1990).

Οι πολυγλυκάνες με τη μορφή αμύλου και γλυκογόνου είναι τα κύρια αποθέματα άνθρακα και ενέργειας για πολλούς οργανισμούς. Το φυτικό ανάλογο της φωσφορυλάσης της α-γλυκάνης (EC 2.4.1.1) είναι η φωσφορυλάση του αμύλου (Starch Phosphorylase, SP) που καταλύει την αντιστρεπτή μετατροπή της α-1,4-γλυκόζης και του ανόργανου φωσφορικού σε 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P) και παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του αμύλου (R.S. Rathore,2009).



3.2 Ισομορφές της φωσφορυλάσης του αμύλου

Δύο ισομορφές των SP έχουν ταυτοποιηθεί σε φυτά και αυτές διαφέρουν στην υποκυτταρική θέση και τη συγγένεια τους με το άμυλο. Ένας τύπος, είναι η Pho1, η οποία βρίσκεται μέσα στους χλωροπλάστες των φύλλων και στους αμυλοπλάστες. Οι ισομορφές Pho1 έχουν χαμηλή συγγένεια για το άμυλο, αντί να παρουσιάζουν προτίμηση για λιγότερο διακλαδισμένες γλυκάνες όπως η αμυλοπηκτίνη, η αμυλόζη και οι μαλτοδεξτρίνες. Η 2^η ισομορφή των

SP είναι η Pho2, που βρίσκεται στο κυτοσόλιο των φυτικών κυττάρων και παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για το άμυλο (Jody E Higgins,2012).

Πιο αναλυτικά, ο τύπος Pho1 ονομάζεται και L-SP (πλαστιδιακός) και ο τύπος Pho2 H-SP (κυτοσολικός). Η μορφή L έχει μοριακό βάρος περίπου 105 kDa και χαμηλή συγγένεια για διακλαδισμένες γλυκάνες, όπως είναι το γλυκογόνο και το άμυλο. Από την άλλη πλευρά, η μορφή H έχει μοριακό βάρος περίπου 90 kDa και πολύ υψηλή συγγένεια για γραμμικές και διακλαδισμένες γλυκάνες. (R.S. Rathore,2009).

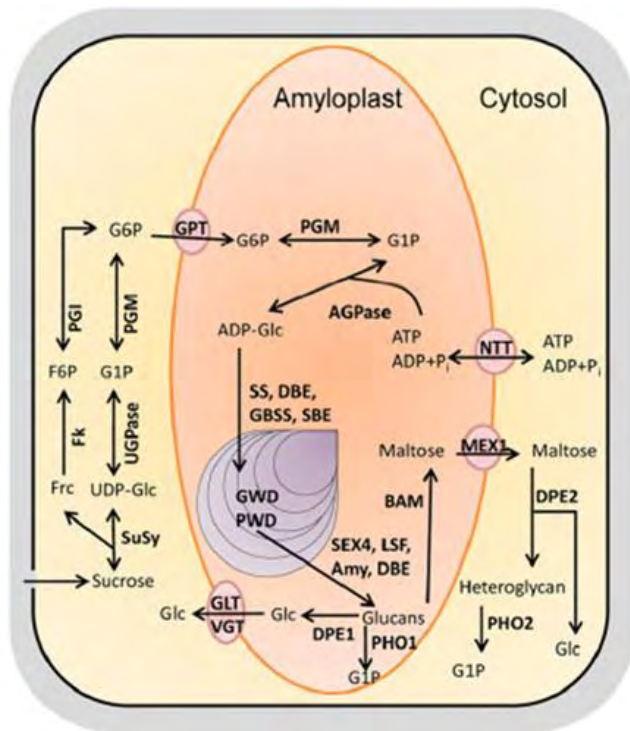
3.3 Φωσφορυλάση του αμύλου από γεώμηλο (Potato Starch Phosphorylase, PSP)

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).

Τα φυτά περιέχουν τουλάχιστον δύο διαφορετικά ισοένζυμα φωσφορυλάσης α-1,4-γλυκάνης, τη Pho1 και τη Pho2 που βρίσκονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Η Pho1 είναι μια φωσφορυλάση που δρα στο άμυλο και στα πλαστίδια του φυτικού κυττάρου. Περιέχει μια συγκεκριμένη ένθεση 78 καταλοίπων (L78). Η L78 σχηματίζει έναν εύκαμπτο βρόχο στη Pho1. Η Pho2 εντοπίζεται στο κυτοσόλιο. Η ένθεση L78 ωστόσο δε βρίσκεται στη Pho2 (Jose A. Cuesta-Seijo,2017).

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).

Στα γεώμηλα υπάρχουν δύο φωσφορυλάσες τύπου Pho1, η Pho1a και η Pho1b, οι οποίες εμφανίζουν υψηλή ομολογία. Στους κονδύλους πατάτας η Pho1a υπάρχει ως ομοδιμερές, ενώ η Pho1b κανονικά δεν ανιχνεύεται. Αντιθέτως, η κυτοσολική φωσφορυλάση αναφέρεται ότι εμπλέκεται στον μεταβολισμό της μαλτόζης που προέρχεται από άμυλο κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης του αμύλου (Tom Orawetz, 2016).



Εικόνα 6: Προτεινόμενη οδός μεταβολισμού αμύλου σε κονδύλους πατάτας (Jessica K. Van Harsseelaar, 2017)

3.4 Πρωτεολυτική αποικοδόμηση της PSP

Η ένθεση των 78 αμινοξέων (L78), παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς διαμορφώνει τόσο τις καταλυτικές όσο και τις ρυθμιστικές ιδιότητες της Pho1. Η L78 είναι πλούσια σε κατάλοιπα σερίνης, τα οποία αποτελούν πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης. Σε πειράματα, η φωσφορυλίωση της L78 της Pho1 από τη ρίζα της γλυκοπατάτας δεν επηρέασε την καταλυτική συμπεριφορά του ενζύμου στη σύνθεση. Ωστόσο, η φωσφορυλίωση προκάλεσε την πρωτεολυτική απομάκρυνση της περιοχής L78. Η απώλεια της L78 αύξησε τη συγγένεια του ενζύμου προς το διαλυτό άμυλο, ενώ ταυτόχρονα μείωσε τη συγγένεια του προς τη Glc1P, πιθανώς λόγω στερικής παρεμπόδισης από το δεσμευμένο άμυλο, προάγοντας έτσι την αποικοδόμηση του αμύλου. Έτσι, προτάθηκε ότι η L78 θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως διακόπτης που ελέγχει την καταλυτική κατεύθυνση του ενζύμου (Seon-Kar Hwang, 2016).

Η ανάλυση της αμινοξικής της L-PSP αλληλουχίας αποκαλύπτει την εμφάνιση μιας περιοχής PEST πλούσια σε προλίνη (P), γλουταμικό οξύ (E), σερίνη (S) και θρεονίνη (T). Οι περιοχές PEST έχουν δείξει 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. Μετά την πρωτεολυτική αποικοδόμηση που ο βρόχος απουσιάζει,

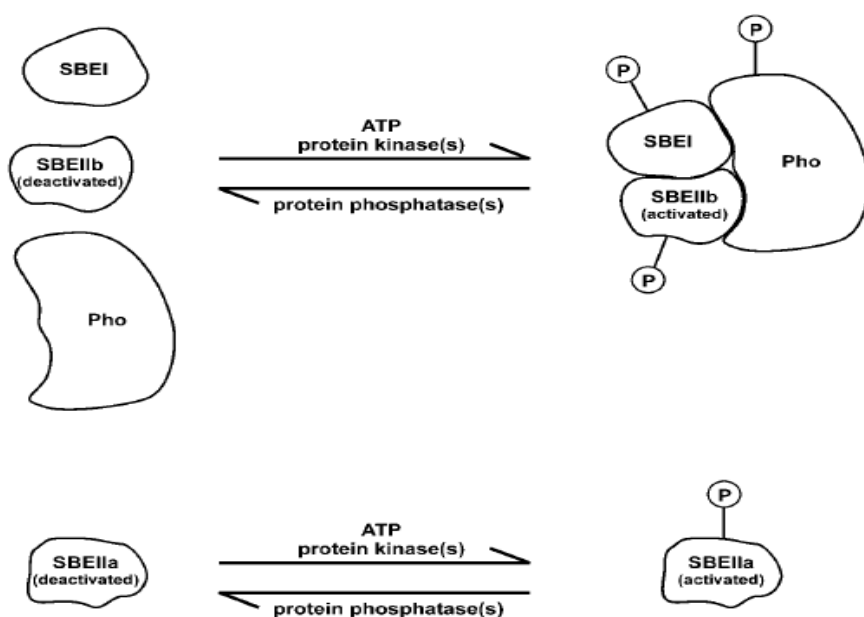
το ενεργό κέντρο είναι πλέον προσβάσιμο στους πολυσακχαρίτες και μπορεί να καταλύει φωσφορολυτικά την αποικοδόμηση του αμύλου (Rathore et al., 2009).

3.5 Διαμερισματοποίηση της PSP

Το ένζυμο της PSP εντοπίζεται υποκυτταρικά αναλόγως με την ηλικία του φυτού. Αυτό συμβαίνει διότι σε νέες ρίζες γεωμήλων όλο το ένζυμο περιέχεται στους αμυλοπλάστες, ενώ η φωσφορυλάση των ώριμων κονδύλων εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Για να εισαχθεί μια πρωτεΐνη στα πλαστίδια θα πρέπει να συντίθεται ως πρόδρομη ένωση με ένα N-τελικό μεταβατικό πεπτίδιο (Brisson et al., 1989). Παρόλα αυτά το μεταβατικό πεπτίδιο απομακρύνεται μέσα στο οργανίδιο με πρωτεολυτική διάσπαση για παραγωγή της ώριμης πρωτεΐνης (Della-Cioppa, Kishore, Beachy, & Fraley, 1987).

3.6 Ρύθμιση της δράσης της Φωσφορυλάσης του αμύλου (SP)

Είναι γνωστό 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. Στο δεύτερο μηχανισμό η SP καταλύει την αντίδραση φωσφορόλυσης 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 ικρίωμα 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 7: Μοντέλο σχηματισμού φωσφορυλίωσης-εξαρτώμενου πρωτεϊνικού συμπλέγματος που εμπλέκεται στη σύνθεση αμύλου.

3.7 Αντίδραση κατάλυσης

Η δρατικότητα της PSP δεν εξαρτάται από νουκλεοτίδια και ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten. Η α-D-γλυκόζη λειτουργεί ως συναγωνιστικός αναστολέας, ωστόσο δεν αναστέλλει ισχυρά την PSP. Είναι γνωστό ότι η PSP 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 (Fukui et al., 1982).

3.8 Σύγκριση της φωσφορυλάσης του αμύλου από γεώμηλα (PSP) με τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου από μύες κουνελιών (rmGP) και την ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (hIGP)

Η φωσφορυλάση του αμύλου από γεώμηλα είναι μια διμερής πρωτεΐνη. Το μοριακό βάρος του κάθε μονομερούς είναι 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).

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου των σκελετικών μυών είναι διμερής. Το μοριακό βάρος του κάθε μονομερούς είναι 97,4 kDa. 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 κατάστασης 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. Επίσης απαιτείται η πρόσδεση ενός μορίου φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) για την πραγματοποίηση της φωσφορολυτικής αντίδρασης (Stryer, 2015).

Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας των rmGPb και L-PSP και έδειξε ότι τα δύο ένζυμα είναι 43 % όμοια. Η PSP είναι κατά δύο αμινοξέα μακρύτερη στο N-τελικό άκρο και κατά εννέα αμινοξέα μικρότερη στο C-τελικό άκρο. Η μεγάλη τους διαφορά είναι 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. Επίσης, μια ακόμη διαφορά παρατηρείται στο βρόχο 280s 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 (Fukui et al., 1982).

Η ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση a παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανταπόκριση σε μετάπτωση από την κατάσταση T στην R. Η δέσμευση της γλυκόζης μετακινεί την αλλοστερική ισορροπία της φωσφορυλάσης a από την κατάσταση R στην T, με αποτέλεσμα να απενεργοποιεί το ένζυμο. Η γλυκόζη λειτουργεί ως ένας αρνητικός ρυθμιστής της φωσφορυλάσης a. Αυτό

συμβαίνει διότι, ο ρόλος της αποικοδόμησης του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι η παράγωγή γλυκόζης όταν το επίπεδο της γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλό (Stryer, 2015).

4. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

4.1 Χαρακτηρισμός των ενζύμων

Τα ένζυμα είναι οι καταλύτες των βιολογικών αντιδράσεων. Είναι σημαντικά μόρια που προσδιορίζουν τον τρόπο των χημικών μετασχηματισμών και μεσολαβούν στο μετασχηματισμό των διαφόρων μορφών ενέργειας. Τα κύρια χαρακτηριστικά των ενζύμων είναι η καταλυτική ισχύς και η εξειδίκευση. Η κατάλυση λαμβάνει χώρα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου δεσμεύουν τα υποστρώματα με συγκεκριμένη μορφή και προσανατολισμό. Είναι γνωστό ότι τα ένζυμα επιταχύνουν τις αντιδράσεις κατά ένα εκατομμύριο φορές περισσότερο. Επιπλέον, έχουν υψηλή εξειδίκευση, τόσο στις αντιδράσεις, όσο και στην επιλογή αντιδρώντων. Αυτά τα αντιδρώντα ονομάζονται υποστρώματα. Τα ένζυμα λοιπόν, φέρουν μαζί τους τα υποστρώματα σε έναν άρτιο προσανατολισμό και με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται η προετοιμασία για το σχηματισμό ή τη διάσπαση των χημικών δεσμών (Strayer, 2015).

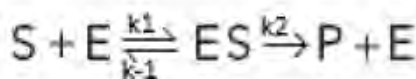
4.2 Κινητική των ενζύμων

Η κινητική των ενζύμων είναι η μελέτη των χημικών αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα, με έμφαση στους ρυθμούς αντίδρασης. Η μελέτη της κινητικής ενός ενζύμου εξετάζει τα διάφορα στάδια της δραστηριότητας, καθώς αποκαλύπτει τον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου. Ο Victor Henri ανέφερε αρχικά ότι οι ενζυμικές αντιδράσεις ξεκίνησαν με έναν δεσμό μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος. Το 1910, οι Michaelis και Menten είχαν μελετήσει την κινητική του ενζύμου σακχαρόζης, το οποίο καταλύει την υδρόλυση της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Δημοσίευσαν την ανάλυσή τους και έκτοτε, η εξίσωση Michaelis και Menten χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για την περιγραφή της κινητικής πολλών ενζύμων. Έτσι προκύπτει ότι, η κινητική του ενζύμου είναι η επιστήμη της χρήσης δεδομένων δραστηριότητας ενζύμου για τη μοντελοποίηση ή την πρόβλεψη της συμπεριφοράς του ενζύμου. Κατά συνέπεια, πριν εξεταστεί η κινητική

του ενζύμου, πρέπει να μετρηθεί η δραστηρότητά του. (Michael J. Cooney, 2010).

4.3 Κινητική Michaelis-Menten

Η ταχύτητα της κατάλυσης των ενζύμων V_0 , η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων (moles) 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. Το 1913 λοιπόν, οι Michaelis και Menten, πρότειναν ένα μοντέλο για να εξηγήσει τα κινητικά χαρακτηριστικά. Το κυριότερο χαρακτηριστικό στη συμπεριφορά των ενζύμων είναι ότι ένα ειδικό σύμπλοκο ES είναι το αναγκαίο ενδιάμεσο στη κατάλυση. Το μοντέλο αυτό είναι το εξής:



Όπου:

E: το ένζυμο

S: το υπόστρωμα

P: το προϊόν

k_1, k_2, k_{-1}, k_{-2} : κινητικές σταθερές

Το σημείο εκκίνησης είναι ότι η ταχύτητα κατάλυσης V_0 είναι ίση με το γινόμενο της συγκέντρωσης του συμπλόκου [ES] επί την k_2

$$V_0 = k_2[ES]$$

Σημαντική σταθερά για την κινητική Michaelis και Menten είναι η K_M , η οποία ονομάζεται σταθερά Michaelis. Είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αλληλεπιδράσεων ενζύμου-υποστρώματος. Η K_M έχει μονάδες συγκέντρωσης και είναι ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος.

$$K_M = k_{-1} + k_2/k_1$$

Η μέγιστη ταχύτητα V_{max} επιτυγχάνεται όταν οι καταλυτικές περιοχές του ενζύμου είναι κορεσμένες με υπόστρωμα, δηλαδή όταν $[ES] = [E]_T$.

$$V_{\max} = k_2[E]_T$$

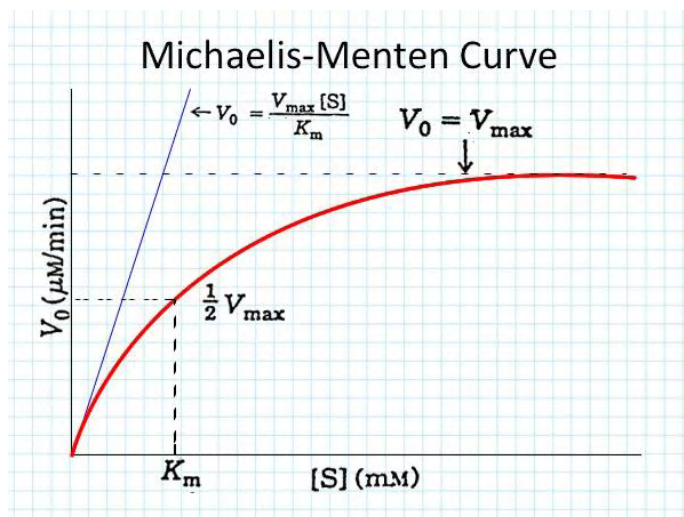
Ύστερα από μια σειρά εξισώσεων προκύπτει η εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Συμπερασματικά η K_M είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό μιας ενζυμικής αντίδρασης και είναι σημαντική για τη βιολογική της λειτουργία.

Όταν $[S] = K_M$, τότε $V_0 = V_{\max}/2$. Δηλαδή, είναι ίση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος όπου η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της. Όσο μικρότερη K_M τόσο λιγότερο υπόστρωμα, ώστε $V_0 = V_{\max}/2$ (Strayer, 2015).

Η καμπύλη της K_M που προκύπτει από την εξίσωση Michaelis-Menten είναι η παρακάτω:



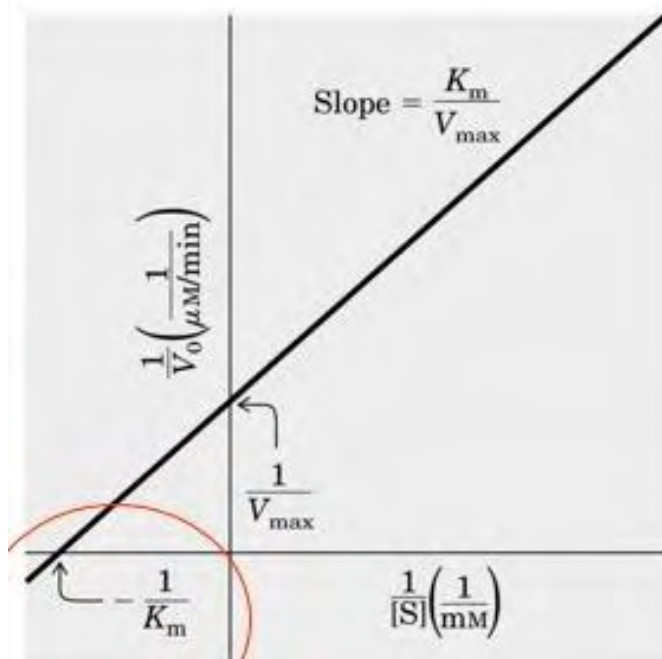
Εικόνα 8: Διάγραμμα K_M
(Tuition Tub, 2016)

4.4 Διάγραμμα διπλού αντιστρόφου ή Lineweaver-Burk

Εάν γίνει αντιστροφή της εξίσωσης Michaelis και Menten και των δύο πλευρών προκύπτει η εξίσωση Lineweaver-Burk:

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

Και το διάγραμμα αυτής της εξίσωσης είναι το εξής:



Εικόνα 9: Διάγραμμα Lineweaver-Burk (Tuition Tub, 2016)

Το διάγραμμα αυτό παράγει μια ευθεία γραμμή που τέμνει τον άξονα y στο $1/V_{max}$ και κλίση K_M/V_{max} . Το σημείο τομής με τον άξονα x είναι το $-1/ K_M$ (Strayer, 2015).

4.5 V_{max} & k_{cat}

Η V_{max} αποκαλύπτει τον αριθμό 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 το υπόστρωμα. Η V_{max} ισούται με την σταθερά k_2 , η οποία

ονομάζεται και k_{cat} . Επίσης, η K_M και V_{max} επιτρέπουν τον προσδιορισμό του κλάσματος των κέντρων που έχουν καλυφθεί, f_{ES} . Προκύπτει λοιπόν, η εξίσωση:

$$f_{ES} = V / V_{max} = [S] / ([S] + K_M)$$

Είναι γνωστό ότι ο λόγος k_{cat}/K_M είναι ένα μέτρο της καταλυτικής αποτελεσματικότητας (Strayer, 2015).

$$V_0 = k_{cat}/K_M [E][S]$$

Είναι σημαντικό να αναφερθεί και η δράση ενός αναστολέα ενζύμων χρησιμοποιώντας κινητική σταθερής κατάστασης. Για να γίνει αυτό, η V_{max} και η K_M της αντίδρασης μετρούνται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα. Εάν η παρουσία του αναστολέα αυξάνει την K_M αλλά δεν επηρεάζει τη k_{cat} , ο αναστολέας αυτός είναι ανταγωνιστικός. Δηλαδή, ο αναστολέας επιβραδύνει την αντίδραση. Παρόλα αυτά, αυτή η κατάσταση μπορεί να αντιστραφεί με την προσθήκη περισσότερων υποστρωμάτων. Η ανταγωνιστική αναστολή δείχνει ότι το υπόστρωμα και ο αναστολέας δεν μπορούν να δεσμευτούν στο ένζυμο ταυτόχρονα, δηλαδή, ανταγωνίζονται για δέσμευση. Από την άλλη πλευρά εάν ο αναστολέας μειώνει τη k_{cat} της αντίδρασης αλλά δεν αλλάζει τη K_M , ο αναστολέας αυτός είναι ένας μη ανταγωνιστικός. Αυτός ο τρόπος αναστολής συμβαίνει όταν ο αναστολέας μπορεί να συνδεθεί τόσο με το ελεύθερο ένζυμο όσο και με το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, αλλά όταν δεσμεύεται, το ένζυμο έχει μειωμένη δραστηριότητα (Jon R. Lorsch, 2014).

4.6 K_i

Για να προσδιοριστεί αν ένας αναστολέας δρα με συναγωνιστική, ασυναγώνιστη ή με συναγωνιστική αναστολή, οι μετρήσεις των ταχυτήτων της κατάλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα έχουν σκοπό τη διάκριση μεταξύ των τριών τύπων αναστολής (Strayer, 2015).

Η εξίσωση Michaelis-Menten μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να ενσωματώνει την επίδραση των αναστολέων ως εξής:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{k_i'} \right) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{k_i} \right)}$$

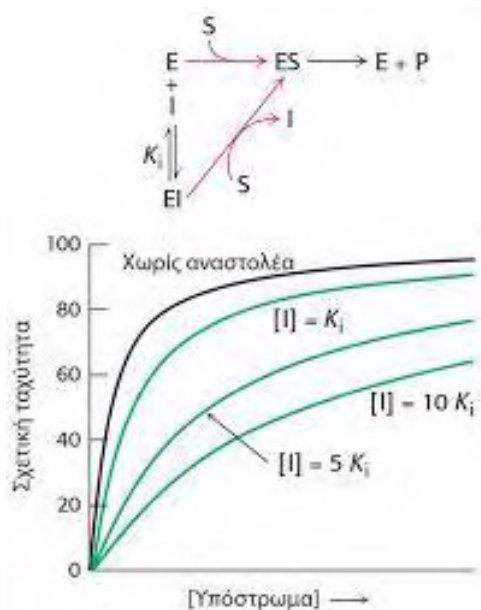
Όπου:

$[I]$: η συγκέντρωση του αναστολέα

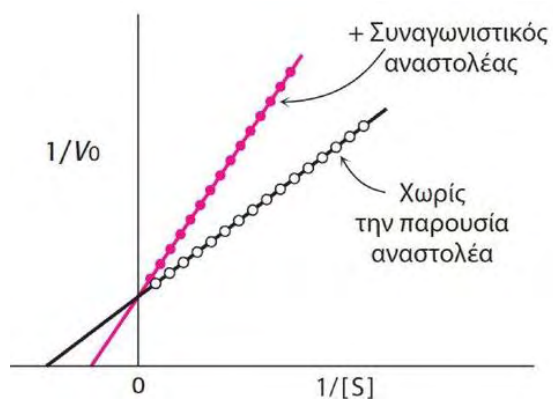
K_i : η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ένζυμου-αναστολέα

K_i' : σταθερά διάστασης αναστολέα ενζύμου-υποστρώματος

Οι παράμετροι K_i και K_i' χαρακτηρίζουν τον τρόπο αναστολής και τη συνάφεια του ενζύμου για τον αναστολέα (Staffan L. Sjostrom, 2013).



Εικόνα 10: Κινητική ενός συναγωνιστικού αναστολέα (Strayer, 2015)

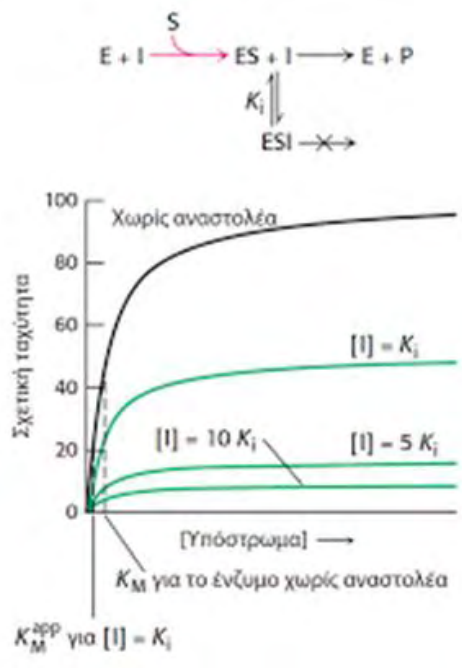


Εικόνα 11: Συναγωνιστική αναστολή που απεικονίζεται σε διάγραμμα διπλού αντιστρόφου

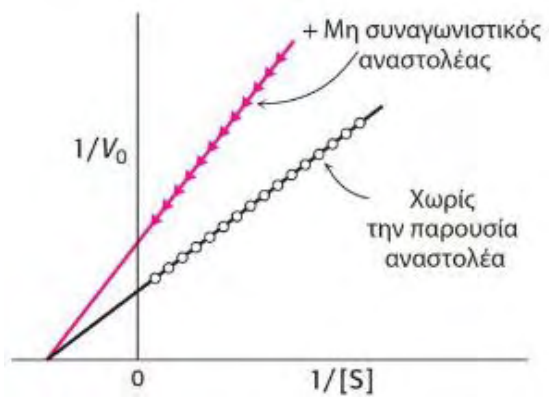
V_{max} : δεν επηρεάζεται

K_M : αυξάνεται

(Strayer, 2015)



Εικόνα 12: Κινητική ενός ασυναγωνιστικού αναστολέα (Strayer, 2015)



Εικόνα 13: Μη συναγωνιστική αναστολή που απεικονίζεται σε διάγραμμα διπλού αντιστρόφου
 V_{max} : ελαττώνεται
 K_M : παραμένει σταθερή
 (Strayer, 2015)

4.7 Τα αλλοστερικά ένζυμα δεν υπακούουν στην κινητική Michaelis-Menten

Τα αλλοστερικά ένζυμα, τα οποία δεν υπακούουν στην κινητική Michaelis-Menten, αποτελούνται από πολλαπλές υπομονάδες και πολλαπλά ενεργά κέντρα. Τα αλλοστερικά ένζυμα παρουσιάζουν σιγμοειδείς γραφικές παραστάσεις της ταχύτητας της αντίδρασης V_0 σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Στα αλλοστερικά ένζυμα, η πρόσδεση του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο μπορεί να μεταβάλλει τις ιδιότητες των άλλων ενεργών κέντρων στο ίδιο μόριο. Με αυτό τον τρόπο η πρόσδεση του υποστρώματος γίνεται συνεργειακά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η πρόσδεση

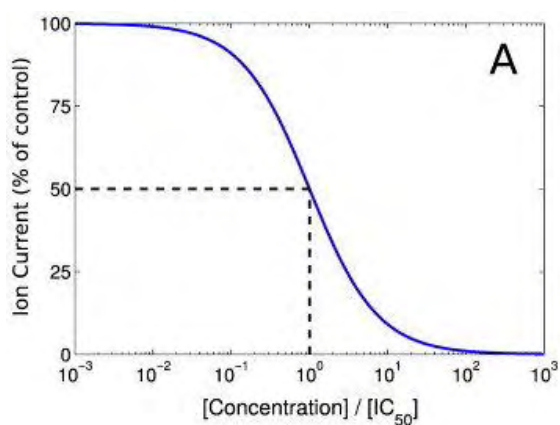
του υποστρώματος σε ένα ενεργό κέντρο να διευκολύνει τη πρόσδεση στα άλλα ενεργά κέντρα. Ένα άλλο χαρακτηριστικό των αλλοστερικών ενζύμων είναι ότι η δραστηριότητα μπορεί να μεταβληθεί από ρυθμιστικά μόρια που προσδένονται αντιστρεπτά σε ειδικές περιοχές, που είναι ανεξάρτητες από τα καταλυτικά κέντρα. Προκύπτει λοιπόν το συμπέρασμα ότι, τα αλλοστερικά ένζυμα είναι οι καθοριστικοί ρυθμιστές στις μεταβολικές πορείες των κυττάρων (Strayer, 2015).



Εικόνα 14: Κινητική ενός αλλοστερικού ενζύμου (Strayer, 2015)

4.8 IC_{50}

Η IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) είναι ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής διαδικασίας. Για έναν αναστολέα η IC_{50} αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του αναστολέα που απαιτείται για 50% μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας του ενζύμου. Πειραματικά αυτό μπορεί να προσδιοριστεί κατασκευάζοντας μια καμπύλη και εξετάζοντας την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του αναστολέα (Bag Arijit, 2016).



Εικόνα 15: Καμπύλη IC50 (Williams Geoff, 2015)

5. Υλικά, οργανολογία & μέθοδοι

5.1 Αντιδραστήρια

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Adenosine Monophosphate (AMP)	Sigma
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Starch	Merck
SzK158	
Potassium Chloride (KCL)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	Panreac
Sodium Citrate	Applichem

5.2 Οργανολογία

ΟΡΓΑΝΟ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ
Υδατόλουτρο, Wisebath	Wisd
Φωτόμετρο	VWR
Πεχάμετρο	Metrohm
Ζυγός	
Vortex	

5.3 Κινητικές μελέτες έναντι της L-PSP

Η αντίδραση που καταλύει η φωσφορυλάση PSP είναι αντιστρεπτή. Στο συγκεκριμένο πείραμα, στις κινητικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μελετήθηκε η αντίστροφη πορεία της αντίδρασης, προς τη σύνθεση του αμύλου, δηλαδή την ενσωμάτωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης στο άμυλο. Προκύπτει λοιπόν, άμυλο με ένα περισσότερο κατάλοιπο γλυκόζης με απελευθέρωση ορθοφωσφορικών από την G1P. Τα ορθοφωσφορικά ιόντα μπορούν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά ώστε να ποσοτικοποιηθούν.

5.4 Αρχή της μεθόδου της πειραματικής διαδικασίας

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των φωσφορικών ιόντων, με τη δημιουργία χρωμοφόρου συμπλόκου ένωσης. Τα ορθοφωσφορικά ιόντα σχηματίζουν 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 χρωμοφόρο σύμπλοκο φωσφομολυβδενικού το οποίο απορροφά σε μήκος κύματος 850 nm. Απουσία ορθοφωσφορικών ιόντων το χρωμοφόρο σύμπλοκο δεν παράγεται.

Το διάλυμα φωτομέτρησης είναι μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου και 100 mM οξικού ψευδαργύρου. Το pH του μίγματος ρυθμίζεται στο 5.0 και το διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% (w/v), που χρησιμοποιείται έχει επίσης, pH 5.0.

Τα δύο διαλύματα αναμιγνύονται σε αναλογία 4:1 σε ένα σκούρο δοχείο. Επειδή τα διαλύματα είναι φωτοευαίσθητα όταν ζυγίζονται οι ποσότητες

τοποθετούνται σε δοχείο με απιονισμένο H₂O (dH₂O) για να διαλυθούν και το δοχείο κλείνεται με καπάκι. Στη συνέχεια το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί μία έγχρωμη ένωση. Μετά το πέρας των 15 min προσθέσαμε σε όλα τα δείγματα 500 μL του διαλύματος και αφήσαμε να γίνει επώαση σε θερμοκρασία 30°C για άλλα 15 min σε υδατόλουτρο αφού πρώτα έγινε ανάδευση των δειγμάτων με τη χρήση vortex.

Αφήνουμε το ενζυμικό διάλυμα για επώαση στο υδατόλουτρο για 15 min στους 30°C ώστε να επιτευχθεί η σύνδεση του ενζύμου με το άμυλο. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στις κινητικές μελέτες ήταν η α-D-1-φωσφορική γλυκόζη (G1P). Μετά το πέρας των 12 min της επώασης του ενζυμικού διαλύματος, τα υποστρώματα τοποθετούνται για επώαση για 3 min, στους 30°C.

Αφού περάσουν τα 15 min μηδενίζουμε το χρονόμετρο και ανά 20s λαμβάνονται 36 μL από το ενζυμικό διάλυμα και προστίθενται στα 144 μL διαλύματος υποστρώματος για την κάθε συγκέντρωση υποστρώματος. Εκείνη τη χρονική στιγμή, όπου t=0, ξεκινά η ενζυμική αντίδραση σε όγκο αντίδρασης 180 μL. Στη συνέχεια λαμβάνονται 40 μL από το μίγμα της αντίδρασης ανά 5, 10, 15, 20 min, και τοποθετούνται σε tubes που περιέχουν 10 μL SDS 1 % και γίνεται έντονη ανάδευση, ώστε να τερματιστεί η αντίδραση.

Για κάθε κινητική μελέτη, παρασκευάστηκαν διαλύματα τα οποία είχαν ρόλο "τυφλού μάρτυρα" και περιείχαν μόνο την ένωση ή το μίγμα. Τα παρακάτω διαλύματα παρασκευάστηκαν δυο φορές τα οποία περιείχαν όλα 10 μL SDS 1 % (w/v).

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

Μετά το πέρας της διαδικασίας παρασκευάστηκε το διάλυμα φωτομέτρησης. Ύστερα από 15 min επώασης του μίγματος του διαλύματος φωτομέτρησης, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα, αλλά και στα τυφλά, 500 μL διαλύματος

φωτομέτρησης και πραγματοποιήθηκε η διαδικασία που αναλύθηκε παραπάνω.

* Τα πειράματα έγιναν με το γλυκογόνο ως υπόστρωμα γιατί είναι περισσότερο διαλυτό σε σχέση με το άμυλο.

5.5 Προσδιορισμός της K_M

Τα ρυθμιστικά διαλύματα αντίδρασης είναι:

Assay Buffer 1: 400 mM KCl, 4 mM DTT, 4 mM EDTA, 133 mM sodium citrate pH 6.0

Assay Buffer 2: 270 mM KCl, 2.7 mM DTT, 2.7 mM EDTA, 100 mM sodium citrate pH 6.0

Για να παρασκευαστεί το stock των 90 mM G1P σε Vτελικό=2000 μ L πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια ποσότητα από τα 400 mM G1P.

Επομένως, σύμφωνα με τον νόμο της αραιώσης $C_1V_1=C_2V_2$ (σχέση 1) προκύπτει:

G1P: από την (σχέση 1) $\rightarrow V_1=450\mu\text{L}$

AB1: από την (σχέση 1) $\rightarrow V_1=1350\mu\text{L}$

dH₂O: 2000 μ L-1350 μ L-450 μ L=200 μ L

Οι υπόλοιπες αραιώσεις G1P που παρασκευάστηκαν με αραιώση από την G1P 90mM χρησιμοποιώντας το Assay Buffer 2 σε Vτελικό=200 μ L

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	G1P mM σε 180 μ L της αντίδρασης
G1P 90 mM 20 μ L Assay buffer 180 μ L	G1P 9mM Vτελ= 200 μ L	2
G1P 90 mM 30 μ L Assay buffer 170 μ L	G1P 13,5mM Vτελ= 200 μ L	3
G1P 90 mM 40 μ L Assay buffer 160 μ L	G1P 18mM Vτελ= 200 μ L	4
G1P 90 mM 60 μ L	G1P 27mM	6

Assay buffer 140μL	V _{τελ} = 200 μL	
G1P 90 mM 100μL	G1P 45mM	10
Assay buffer 100μL	V _{τελ} = 200 μL	
G1P 90 mM 150μL	G1P 67.5 mM	15
Assay buffer 50 μL	V _{τελ} = 200 μL	

Σύμφωνα με τη σχέση 1 προκύπτουν τα εξής:

Ενζυμικό διάλυμα: 250μL	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
L-PSP 10mg/mL: 3,75μL	L-PSP : 0.15mg/mL
Γλυκογόνο 10% (w/v) : 25 μL	Γλυκογόνο 1% (w/v)
dH ₂ O : 33,75μL	
AB1 400 mM: 187,5 μL	AB1: 300 mM

Υποστρώματα: 144 μL	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
G1P (9, 13.5, 18, 27, 45, 67.5) mM: 40 μL	G1P (2, 3, 4, 6, 10, 15) mM
dH ₂ O : 104 μL	

Για τον προσδιορισμό της K_M ελήφθησαν 36 μL από το ενζυμικό διάλυμα και προστέθηκαν σε 144 μL του πρώτου διαλύματος υποστρώματος. Εκείνη τη χρονική στιγμή, όπου $t=0$, ξεκίνησε η ενζυμική αντίδραση η οποία διεξήχθη σε όγκο αντίδρασης $V_{τελικό}=180$ μL. Οι συγκεντρώσεις της G1P ήταν 2, 3, 4, 6, 10 και 15 mM. Στη συνέχεια του πειράματος ελήφθησαν 40 μL από το μίγμα της αντίδρασης ανά 5, 10, 15, 20 min, και τοποθετήθηκαν σε 10 μL SDS 1 % (w/v) με έντονη ανάδευση ώστε να σταματήσει πλήρως η αντίδραση.

5.6 Έλεγχος για την επίδραση της AMP

Ενζυμικό διάλυμα: 150μL	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
L-PSP 1,7mg/mL: 13,23μL	L-PSP : 0.15mg/mL
Γλυκογόνο 10% (w/v) : 15μL	Γλυκογόνο 1% (w/v)
dH ₂ O : 9,27μL	
AB1 400 mM: 112,5μL	AB1: 300 mM

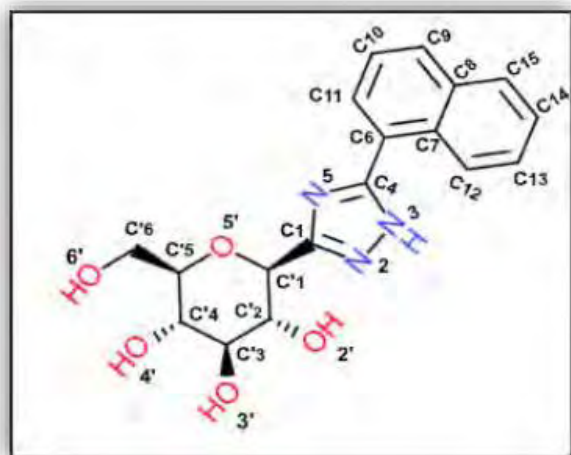
3 υποστρώματα AMP:

- Χωρίς AMP, δηλαδή G1P και H₂O
- 1mM AMP, δηλαδή G1P , H₂O και 1mM AMP (από το stock 25mM AMP)
- 2mM AMP, δηλαδή G1P , H₂O και 2mM AMP (από το stock 25mM AMP)

	AMP 0 mM	AMP 1 mM	AMP 2 mM
G1P 67.5mM	40 μL	40 μL	40 μL
AMP 25 mM	-	7.2 μL	14,4 μL
dH ₂ O	104 μL	96.8 μL	89.6 μL

5.7 Προσδιορισμός της IC₅₀ του αναστολέα SzK158 έναντι της PSP

SzK158: αναστολέας, ανάλογο της γλυκόζης, ο οποίος προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Το μόριο αυτό είναι ένα ανάλογο C-β-D-γλυκόζης με ένα τριαζολικό δακτύλιο που συνδέει τη γλυκοκυρανόζη με ένα δακτύλιο ναφθαλενίου.



Εικόνα 16: Συντακτικός τύπος της δομής του αναστολέα SzK158

Οι συγκεντρώσεις αναστολέα που μελετήθηκαν ήταν:

0 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M, 750 μ M, 1 mM, 1.5 mM

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	Συγκεντρώσεις στα 180 μ l της αντίδρασης
SzK158 10 mM 4 μ l DMSO 4 μ l	SzK158 5 mM Vτελ= 8 μ l	100 μ M
SzK158 50 mM 2.4 μ l DMSO 9,6 μ l	SzK158 10 mM Vτελ= 12 μ l	200 μ M
SzK158 50 mM 5 μ l DMSO 5 μ l	SzK158 25 mM Vτελ= 10 μ l	500 μ M
SzK158 50 mM 7.5 μ l DMSO 2.5 μ l	SzK158 37.5 mM Vτελ= 10 μ l	750 μ M
SzK158 100 mM 10 μ l DMSO 10 μ l	SzK158 50 mM Vτελ= 20 μ l	1 mM
SzK158 100 mM 15 μ l DMSO 5 μ l	SzK158 75 mM Vτελ= 20 μ l	1.5 mM

Υποστρώματα:

	0 μ M	100 μ M	200 μ M	500 μ M	750 μ M	1 mM	1.5 mM
SzK158	-	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L
G1P (6 mM)	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L	40 μ L
dH ₂ O μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L

*Στη συγκέντρωση 0 μ M όπου δε έχουμε αναστολέα προσθέτουμε 3.6 μ L DMSO.

Ενζυμικό διάλυμα: 350μL	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
L-PSP 2mg/mL: 26.25 μ L	L-PSP : 0.15mg/mL
Γλυκογόνο 10% (w/v) : 35 μ L	Γλυκογόνο 1% (w/v)
dH ₂ O : 26.25 μ L	
AB1 400 mM: 262.5 μ L	AB1: 300 mM

5.8 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα SzK158 έναντι της PSP

Ο προσδιορισμός της K_i έγινε με συγκεντρώσεις του αναστολέα SzK158, 75 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M και 250 μ M.

Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις	Συγκεντρώσεις στα 180 μL της αντίδρασης
SzK158 10 mM 7.5 μ L DMSO 100% 12.5 μ L	SzK158 3.75 mM Vτελ= 20 μ L	75 μ M

SzK158 10 mM 10 μ L DMSO 100% 10 μ L	SzK158 5 mM Vτελ= 20 μ L	100 μ M
SzK158 10 mM 15 μ L DMSO 100% 5 μ L	SzK158 7.5 mM Vτελ= 20 μ L	150 μ M
SzK158 10 mM 8 μ L DMSO 100% 32 μ L	SzK158 10 mM Vτελ= 40 μ L	200 μ M
SzK158 10 mM 5 μ L DMSO 100% 15 μ L	SzK158 12.5 mM Vτελ= 20 μ L	250 μ M

Υποστρώματα:

	75 μ M	100 μ M	150 μ M	200 μ M	200 μ M
SzK158	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L	3.6 μ L
G1P	40 μ L (3 mM)	40 μ L (4 mM)	40 μ L (6 mM)	40 μ L (10 mM)	40 μ L (15 mM)
dH ₂ O μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L	100.4 μ L

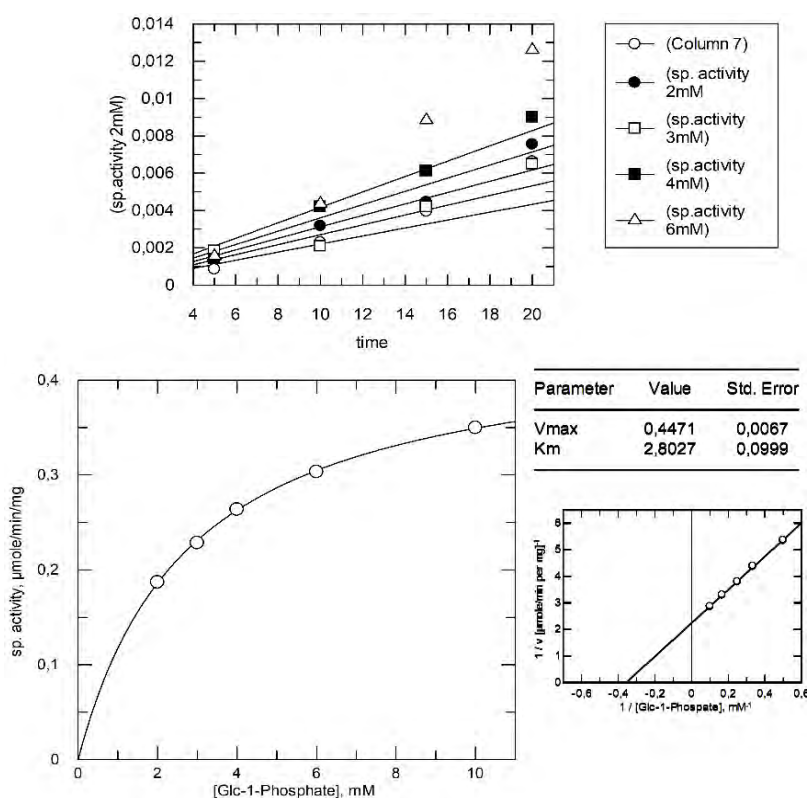
Ενζυμικό διάλυμα: 400μL	
Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
L-PSP 2mg/mL: 30 μ L	L-PSP : 0.15mg/mL
Γλυκογόνο 10% (w/v) : 40 μ L	Γλυκογόνο 1% (w/v)
dH ₂ O : 30 μ L	
AB1 400 mM: 300 μ L	AB1: 300 mM

6. Αποτελέσματα

Η ανάλυση των κινητικών δεδομένων και τα απαραίτητα διαγράμματα έγιναν με το υπολογιστικό πρόγραμμα GraFit.

6.1 Προσδιορισμός της K_M

Η K_M για την G1P έναντι της L-PSP υπολογίστηκε σε $2,80 \pm 0,09$ mM και η V_{max} ίση με $0,447 \pm 0,006$ $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$.



Εικόνα 17: Διάγραμμα από τον προσδιορισμό της K_M για την G1P έναντι της L-PSP

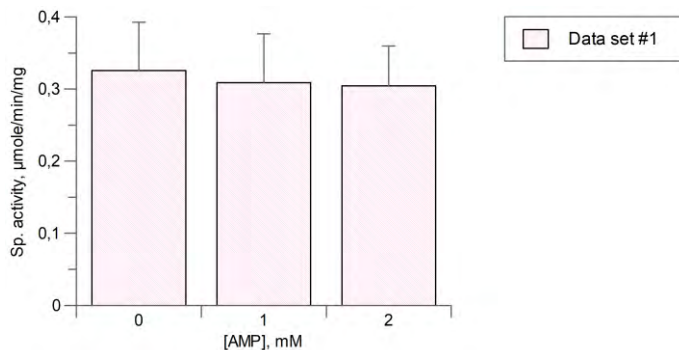
6.2 Έλεγχος για την επίδραση της AMP

Παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων AMP παρατηρήθηκαν οι εξής ταχύτητες της αντίδρασης :

0 mM: $0.3265 \pm 0,06$ $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$

1 mM: 0.3088 ± 0.06 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$

2 mM: $0,3044 \pm 0.05$ $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$

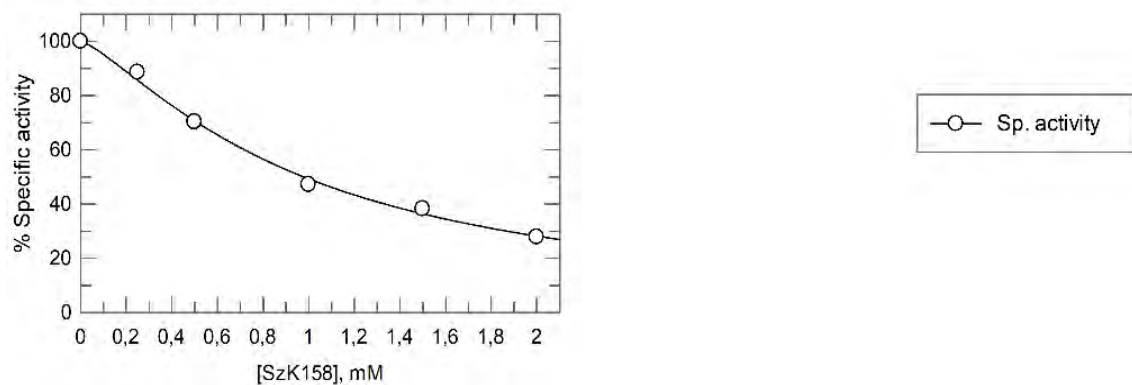


Εικόνα 18: Διάγραμμα όπου απεικονίζεται η επίδραση της AMP στη PSP παρουσία και απουσία AMP.

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

6.3 Προσδιορισμός της IC_{50} του αναστολέα SzK158 έναντι της PSP

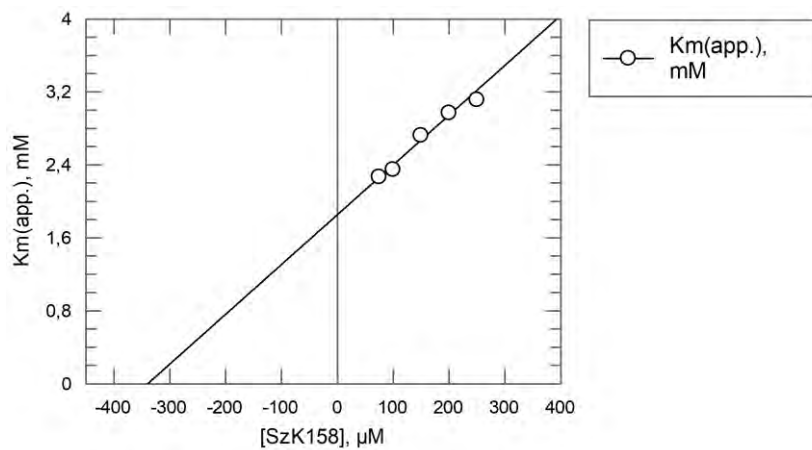
Η IC_{50} για τον αναστολέα SzK158 έναντι της L-PSP υπολογίστηκε σε 0.98 ± 0.03 mM



Εικόνα 19: Διάγραμμα από τον προσδιορισμό της IC_{50} για τον αναστολέα SzK158

6.4 Προσδιορισμός της K_i του αναστολέα SzK158 έναντι της PSP

Η K_i για τον αναστολέα Szk158 έναντι της L-PSP υπολογίστηκε σε $337.07 \pm 35,48 \mu\text{M}$.



Εικόνα 20: Παρουσιάζεται το διάγραμμα από τον υπολογισμό της K_i για τον αναστολέα SzK158

7. Συζήτηση

Σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες έναντι της L-PSP. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η K_M για την G1P έναντι της L-PSP, η οποία βρέθηκε σε $2,80 \pm 0,09$ mM (εικόνα 17). Όσον αφορά τον έλεγχο της επίδραση της AMP παρατηρήθηκε ότι η L-PSP δεν επηρεάζεται από την AMP (εικόνα 18). Αντίθετα έχει παρατηρηθεί ότι η δραστηριότητα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από μύες κουνελιών rmGPb εξαρτάται πλήρως από την παρουσία της AMP και η κινητική εμφανίζει σιγμοειδής καμπύλη. Η rmGPα έχει διακριτές αλλοστερικές ιδιότητες απουσία της AMP (Fukui et al., 1982), ενώ παρατηρήθηκε ότι η AMP προκαλεί μικρή ενεργοποίηση της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης hIGP σε σχέση με την ανθρώπινη μυϊκή φωσφορυλάση (Berg JM, 2012). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες για την ανασταλτική επίδραση ενός ανάλογου γλυκόζης SzK158, που προσδένεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, στη φωσφορυλάση του αμύλου L-PSP. Η IC_{50} για τον αναστολέα SZk158 έναντι της L-PSP υπολογίστηκε σε 0.98 ± 0.03 mM (εικόνα 19). Τέλος, προσδιορίστηκε η τιμή της K_i του αναστολέα SzK158 έναντι της L-PSP. Η K_i υπολογίστηκε σε $337.07 \pm 35,48$ μ M (εικόνα 20). Με βάση τις τιμές τις τιμές $K_{M(app)}$ έναντι της PSP προέκυψε το διάγραμμα της εικόνας 20, όπου στον άξονα γ'γ είναι η $K_{M(app)}$ και στον άξονα χ'χ οι διάφορες συγκεντρώσεις του αναστολέα SzK158. Σε προηγούμενες μελέτες έχει υπολογιστεί η K_i του αναστολέα SzK158 για την ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση σε 8.91 ± 0.44 μ M, ενώ για την rmGPb σε 11.50 ± 0.23 μ M. Η δέσμευση του αναστολέα SzK158 στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου προκαλεί μια σημαντική μετατόπιση του βρόχου 280s. Τα κατάλοιπα που έχουν τη μεγαλύτερη διαφορά είναι τα Asn282, Asn284, Phe285. Επιπλέον, ύστερα από πειραματικές μελέτες παρατηρήθηκε ότι ο δακτύλιος ναφθαλενίου εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις van der Waals με τους Glu88, Leu136, Asn283 και Ala383 (Kun Sandor, 2018). Συγκρίνοντας τις παραπάνω τιμές K_i με τη τιμή K_i στη PSP παρατηρείται ότι είναι περίπου 30 φορές μεγαλύτερη στη PSP. Η τιμή αυτή για τη σταθερά αναστολής K_i υποδηλώνει ότι ο αναστολέας εμφανίζει μικρότερη συγγένεια για την PSP. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα αμινοξέα με τα οποία αλληλοεπιδρά ο αναστολέας SzK158 στην rmGPb δεν είναι συντηρημένα στην L-PSP (κατάλοιπα 282-286).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abt Melanie R and Zeeman Samuel C, (2020). Evolutionary innovations in starch metabolism, ScienceDirect, 109–117

Bahaji Abdellatif, Li Jun, Sańchez-Lopez Ańgela María, Baroja- Fernández Edurne, Josée Muñoz Francisco, Ovecka Miroslav, Almagro Goizeder, Montero Manuel, Ezquer Ignacio, Etxeberria Ed, Pozueta-Romero Javier, (2013). Starch biosynthesis, its regulation and biotechnological approaches to improve crop yields, Biotechnology Advances, S0734-9750(13)00112-2

Beckles Diane M. and Thitisaksakul Maysaya, (2014). Use of Biotechnology to Engineer Starch in Cereals. Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food, DOI: 10.1081/E-EBAF-120051354

Bag Arijit and Ghorai Kr. Pradip, (2016). Development of Quantum Chemical Method to Calculate Half Maximal Inhibitory Concentration (IC50), Molecular informatics 35, 199 – 206

Berg JM, T. J., Stryer L. (2015). Βιοχημεία δεύτερη έκδοση

Bernfeld Peter, (1951). Enzymes of Starch Degradation and Synthesis, Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Volume 12

Brisson Normand, Giroux Helene, Zollinger Max, Camirand Anne, and Simard Claire, (1989). Maturation and Subcellular Compartmentation of Potato Starch Phosphorylase. The Plant Cell, Vol. 1, 559-566

Camirand Anne, St-Pierre Benoit, Marineau Claude, and Brisson Normand, (1990). Occurrence of a copia-like transposable element in one of the introns of the potato starch phosphorylase gene. Mol Gen Genet 224:33-39

Cooney Michael J., (2010). Kinetic Measurements for Enzyme Immobilization Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 6

Cuesta-Seijo Jose A., Ruzanski Christian, Krucewicz Katarzyna, Meier Sebastian, Haeggglund Per, Svensson Birte, Palcic M. Monica, (2017). Functional and structural characterization of plastidic starch phosphorylase during barley endosperm development. PLoSONE 12(4): e0175488.

Della-Cioppa Guy, Kishore M. Ganesh, Beachy N.Roger, And Fraley T. Robert, (1987). Protein Trafficking in Plant Cells. Plant Physiol. 84, 965-968

Goren Asena & Ashlock Daniel & Tetlow J Ian., (2018). Starch formation inside plastids of higher plants, Nature, doi.org/10.1007/s00709-018-1259-4

Higgins, Jody E, Kosar-Hashemi Behjat, Li Zhongyi, Howitt A Crispin, Larroque Oscar, Flanagan Bernadine, KMorell Matthew and Rahmana Sadequr, (2013). Characterization of starch phosphorylases in barley grains. wileyonlinelibrary.com, DOI 10.1002/jsfa.6019

Hwang Seon-Kap, Salvinder Singh Bilal Cakir Hikaru Satoh Thomas W. Okita, (2015). The plastidial starch phosphorylase from rice endosperm: catalytic properties at low temperature. *Planta*, DOI 10.1007/s00425-015-2461-7

Iglesias Albert A. S, Barry Gerard F., MeyerS Christopher, BloksbergS Leonard, Nakatan Paul A., Greenen Thomas, Laughlinf Mary J., Okitan Thomas W., Kishorcg Ganesh M., and PreissS Jack, (1993). Expression of the Potato Tuber ADP-glucose Phosphorylase in *Escherichia coli*. *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 268, No. 2, issu. pp. 1081-1086,1993

Jin Xiangshu, Ballicora Miguel A, Preiss Jack, and Geiger James H, (2005). Crystal structure of potato tuber ADP-glucosepyrophosphorylase. *The EMBO Journal* 24, 694–704

Kowsik Prarthana V. Mazumder Nirmal, (2018). Structural and chemical characterization of rice and potato starch granules using microscopy and spectroscopy. Wiley Periodicals, Inc., DOI: 10.1002/jemt.23160

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

Li Cheng, Gilbert Robert G., (2015). Progress in controlling starch structure by modifying starch-branching enzymes, *Planta*, DOI 10.1007/s00425-015-2421-2

Li Dongxing, Zhu Fan, (2018). Starch structure in developing kiwifruit, *International Journal of Biological Macromolecules*, S0141-8130(18)32409-7

Lin Yi-Chen, Chen Han-Min, Chou I-Min, Chen An-Na, Chen Chia-Pei, Young Guang-Huar, Lin Chi-Tsai, Cheng Chiung-Hsiang, Chang Shih-Chung, Juang Rong-Huay, (2012). Plastidial Starch Phosphorylase in Sweet Potato Roots Is Proteolytically modified by Protein-Protein Interaction with the 20S Proteasome. *PLoS ONE* 7(4): e35336. doi: 10.1371/journal.pone.0035336

Lorsch Jon R., (2014). Practical Steady-State Enzyme Kinetics. Methods in Enzymology, Volume 536

Møller Marie Sofie and Birte Svensson, (2016). Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation, ScienceDirect, 33–42

Mori, H., Tanizawa, K., & Fukui, T. (1993). A chimeric alpha-glucan phosphorylase of plant type L and H isozymes. Functional role of 78-residue insertion in type L isozyme. J Biol Chem, 268(8), 5574-5581

Nakano Kenichi and Fukui Toshio, (1986). The Complete Amino Acid Sequence of Potato α -Glucan Phosphorylase. The Journal of Biological Chemistry Vol. 261, No. 18, Issue of June 25, pp. 8230-8236, 1986

Pergolizzia Giulia, Kuhadomlarp Sakonwan, Kalita Eeshan, and Fielda Robert A., (2017). Glycan Phosphorylases in Multi-Enzyme Synthetic Processes. Protein & Peptide Letters, 2017, 24, 696-709

Rathore R.S., Garg Neha, Garg Sarika, and Kumar Anil, (2009). Starch phosphorylase: Role in starch metabolism and biotechnological applications Critical Reviews in Biotechnology, 29(3): 214–224

Rydberg Ulrika, Andersson Lena, Andersson Roger, Aman Per and Larsson Hakan, (2001). Comparison of starch branching enzyme I and II from potato Eur. J. Biochem. 268, 6140–6145 q FEBS 2001

Sjostrom Staffan L., Joensson Haakan N. and Svahn Helene Andersson, (2013). Multiplex analysis of enzyme kinetics and inhibition by droplet microfluidics using picoinjectors. Lab Chip, 13, 1754–1761

Tetlow Ian J., Morell Matthew K., and Emes Michael J., (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. Journal of Experimental Botany, Vol. 55, No. 406, pp. 2131–2145,

Tetlow Ian J, Wait Robin, Lu Zhenxiao, Akkasaeng Rut, Bowsher Caroline G., Esposito Sergio, Kosar-Hashemi Behjat, Morell Matthew K., and Emesa Michael J., (2004). Protein Phosphorylation in Amyloplasts Regulates Starch Branching Enzyme Activity and Protein–Protein Interactions. The Plant Cell, Vol. 16, 694–708

Ubiparip Zorica & Beerens Koen & Franceus Jorick & Vercauteren Ronny & Desmet Tom, (2018). Thermostable alpha-glucan phosphorylases: characteristics and industrial applications. Microbiology and Biotechnology, doi.org/10.1007/s00253-018-9233-9

Van Harselaar Jessica K., Lorenz Julia, Senning Melanie, Sonnewald Uwe and Sonnewald Sophia, (2017). Genome-wide analysis of starch metabolism genes

in potato (*Solanum tuberosum* L.) BMC Genomics, DOI 10.1186/s12864-016-3381-z

Williams Geoff, Mirams Gary R., (2015). A web portal for in-silico action potential predictions, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, DOI: 10.1016/j.vascn.2015.05.002

Zeeman Samuel C., Kossmann Jens, and Smith Alison M., (2010). Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants, The Annual Review of Plant Biology 61:209–34

Zhang Wei, Liu Xinwei, Wang Qiaolan, Zhang Haiqing, Li Mingfeng, Song Botao, Zhao Zhuqing, (2018). Effects of potassium fertilization on potato starch physicochemical properties. International Journal of Biological Macromolecules 117 (2018) 467–472