



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ετερόλογη έκφραση και μελέτη επίδρασης στοχευμένων μεταλλάξεων  
στη διαλυτότητα της *in silico* προβλεπόμενης αμινοτελικής  
επικράτειας γλυκοαμυλάσης της PhKa



Heterologous expression and the study of the effect of mutagenesis on  
the solubility of the *in silico* predicted N-terminal glucoamylase domain  
of PhKa

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Πολίτη Ελένη

Λάρισα, 2018

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

- **Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική (επιβλέπουσα)**

Λέκτορας Βιοχημείας – Μεταβολισμού του **Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**

- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**

Καθηγητής Βιοχημείας του **Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**

- **Δρ. Γιακουντής Αντώνιος**

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής του **Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.**

*Σε αυτούς που με παίδευσαν  
να τολμάω να αγαπάω  
τη γνώση...*

# Ευχαριστίες

---

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη για την εμπιστοσύνη της να μου αναθέσει ένα πρωτότυπο και απαιτητικό θέμα, την καθοδήγηση και την υποστήριξή της κατά τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και τους καθηγητές μου Δρ. Δημήτρη Λεωνίδα και Δρ. Αντώνη Γιακουντή, για την συνεργασία τους στη διεξαγωγή της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, για την επιστημονική υποστήριξη που μου παρείχαν. Ειδικότερα, θα ήθελα να εκφράσω την τεράστια ευγνωμοσύνη μου στην υποψήφια διδάκτορα Θεοδώρα Σολοβού, η οποία ήταν από την αρχή δίπλα μου, ως μια καινούρια, καλή φίλη, που χωρίς την αμέριστη προθυμία της, τις γνώσεις, την παρέα, αλλά κυρίως την υπομονή της, αναγνωρίζω πως η ενέργεια αυτή θα ήταν πολύ δυσκολότερη. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Στραβοδήμο, ο οποίος με την επιστημονική του ετοιμότητα αλλά και τον εξαίρετο χαρακτήρα του απέδειξε ότι η προτροπή του να ενταχθώ στα μέλη του Εργαστηρίου είχε θετική έκβαση. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες Ραφαηλία Μπέτα και Όλγα Παπαϊωάννου, και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Τασούλα Γκούσκου, για την έμπρακτη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τους συναδέλφους και φίλους μου, Ελισάβετ Κατσίδου και Δημήτρη Κατούνη για τις μοναδικές στιγμές, τα διαλλείματα και την ψυχολογική τους στήριξη στις ώρες του εργαστηρίου.

Ευχαριστώ τους, Ιωάννα-Αικατερίνη Γλαπατζή, Θεοδώρα Ευμορφοπούλου, Νικολέτα Ιωσηφίδου, Αναστάση Κοσκινά, Βασιλεία-Ραφηλία Τζιτζικάκη- Ζαρούκα, Βέρα Παπαθανασίου, Ιωάννα Βαφειάδου, Ευαγγελία Χαρισίου και Ιωάννη Βλαχογιάννη, για την αδιαπραγμάτευτη φιλία, την υπομονή τους, το ενδιαφέρον τους, τις συμβουλές τους και για το αστείρευτο χιούμορ τους, τόσο από κοντά όσο και από απόσταση, που ειδικά φέτος το είχα ανάγκη.

Τέλος, θα ήθελα να αποδώσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Γεώργιο Πολίτη και Δήμητρα Ζούμα, και στα αδέρφια μου, Μαρία και Ανέστη, για την αδιάλειπτη οικονομική και ηθική στήριξη, για την πίστη τους στις ακαδημαϊκές μου δυνατότητες και την εμπύχωση που μου παρείχαν σε κάθε βήμα των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1. Φωσφορυλίωση – Πρωτεϊνικές Κινάσες	10
1.1.1. Κατηγορίες πρωτεϊνικών κινασών	12
1.2. Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (ΡhK)	12
1.2.1. Ισομορφές της ΡhK	14
1.2.2. Δομή του ολοενζύμου της ΡhK	14
1.2.3. Υπομονάδες της ΡhK	16
1.2.3.1. γ υπομονάδα	16
1.2.3.2. δ υπομονάδα	18
1.2.3.3. α και β υπομονάδες	19
1.2.4. Ασθένειες αποθήκευσης γλυκογόνου (Γλυκογονιάσες)	25
1.2.4.1. Ανεπάρκεια ΡhK λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο ΡΗΚΑ1 (GSD IX)	26
1.3. Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών και συστήματα έκφρασης	27
1.3.1. Προβλήματα κατά την ετερόλογη έκφραση	28
1.3.1.1. Μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης	29
1.3.1.2. Πρωτεϊνική αδράνεια	29
1.3.1.3. Διαλυτότητα	29
1.3.1.4. Έγκλειστα σωματίδια (Inclusion Bodies)	30
1.3.2. Τρόποι αύξησης της διαλυτότητας	31
1.3.2.1. Στοχευμένες (site directed) μεταλλάξεις για αύξηση της διαλυτότητας	32
2. ΣΚΟΠΟΣ	34
3. ΥΛΙΚΑ - ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	35
3.1. Υλικά	35
3.1.1. Αντιδραστήρια	35
3.1.2. Βακτηριακά στελέχη	36
3.1.2.1. Βακτηριακά στελέχη για υπερέκφραση πρωτεϊνών	36
3.1.2.2. Βακτηριακά στελέχη για κλωνοποίηση και υπερέκφραση πλασμιδιακών φορέων	37
3.1.3. Πλασμιδιακοί Φορείς	37
3.1.4. Ένζυμα	38
3.2. Όργανα	39
4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	40

4.1. <i>In silico</i> μελέτη	40
4.1.1. Πρόβλεψη επικρατειών (Domain Prediction)	40
4.1.2. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής (Secondary Structure Prediction)	40
4.1.3. Μοντελοποίηση ομολογίας (homology modeling) - Threading	40
4.1.4. Πρόβλεψη διαλυτότητας	41
4.1.5. Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (Multiple Sequencing Alignment, MSA)	41
4.1.6. Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων	41
4.2. Κλωνοποίηση με τη μέθοδο In – fusion ®	42
4.2.1. Σχεδιασμός εκκινήτων	44
4.2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	46
4.2.3. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	47
4.2.4. Εξαγωγή DNA από πηκτική αγαρόζης	48
4.2.5. Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού – In-fusion	48
4.2.6. Χημικός μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων <i>E.coli</i> XL1 Blue με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα	49
4.2.7. Απομόνωση πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα (MiniPrep)	50
4.2.8. Αλληλούχηση	50
4.2.9. Σχεδιασμός μεταλλαγμάτων	51
4.3. Μελέτες έκφρασης (Expression test)	52
4.3.1. Χημικός μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων BL-21 Gold και B834-rLySs για έκφραση	52
4.3.2. Ανάπτυξη κυττάρων	53
4.3.3. Επαγωγή υπερέκφρασης στους 37°C	53
4.3.4. Λύση κυττάρων	54
4.3.5. Επαγωγή υπερέκφρασης στους 18°C	54
4.3.6. Λύση κυττάρων	55
4.4. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	55
4.4.1. Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	55
4.4.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	55
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
5.1. <i>In silico</i> μελέτη	57
5.1.1. Πρόβλεψη επικρατειών (Domain Prediction)	57
5.1.2. Πρόβλεψη διαλυτότητας	58
5.1.3. Μοντελοποίηση μέσω threading	59
5.1.4. Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (Multiple Sequencing Alignment, MSA)	65
5.1.5. Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων	66
5.1.6. Σχεδιασμός μεταλλάξεων	66
5.2. Τεχνικές Κλωνοποίησης	70
5.2.1. Ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου της PhKα (PhKα <sub>trnc</sub> )	70
5.2.2. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	70
5.2.3. Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού – In-fusion	72
5.2.4. Αλληλούχηση	73
5.3. Μελέτες έκφρασης	74
5.3.1. Ανάπτυξη κυττάρων	74
5.3.2. Επαγωγή υπερέκφρασης στους 37°C	74

5.3.3. Επαγωγή υπερέκφρασης στους 18°C	77
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	79
Ετερόλογη έκφραση – Σύστημα έκφρασης <i>E.coli</i>	79
<i>In silico</i> μελέτες – Προγράμματα	87
Παρασκευές υλικών	89
Αποτελέσματα αλληλούχησης	91
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) ήταν η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που αναγνωρίστηκε το 1955 από τους Fischer, Graves και Krebs και απομονώθηκε από τον Krebs το 1964 από σκελετικό μυ κουνελιού. Είναι ενζυμικό δεκαεξιμερές (αβγδ)<sub>4</sub> σύμπλοκο μοριακού βάρους 1.3 MDa που συμμετέχει στη ρύθμιση του σηματοδοτικού καταρράκτη της γλυκογονόλυσης. Η γλυκογονόλυση ελέγχεται από ορμονικά και νευρικά ερεθίσματα, ωστόσο οι λεπτομέρειες αναφορικά με τους τρόπους ρύθμισης του ενζύμου είναι άγνωστες κυρίως λόγω της πολυπλοκότητας της δομής του.

Μελέτες κρυο-ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας και κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ έχουν συμβάλει στην επίλυση της δομής του ολοενζύμου σε ευκρίνεια 9.9 Å, της κολοβωμένης ενεργής καταλυτικής υπομονάδας γ (PhKγ<sub>trnc</sub>) από μυϊκό ιστό κουνελιού, και της δ υπομονάδας που είναι δομή καλμοδουλίνης. Αντίθετα, για τις ομόλογες α και β ρυθμιστικές υπομονάδες δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα όσον αφορά τη δομή τους. Πρόσφατες *in silico* μελέτες συγκλίνουν στο ότι η αμινοτελική περιοχή της PhKa είναι επικράτεια γλυκοαμυλάσης, αλλά απαιτείται η πειραματική απόδειξη.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η βιοπληροφορική ανάλυση και η ετερόλογη έκφραση του κολοβωμένου τμήματος του αμινοτελικού άκρου της α υπομονάδας (PhKa<sub>trnc</sub>) που έχει δράση γλυκοαμυλάσης. Επιπρόσθετα, εξετάζεται ο σχεδιασμός μεταλλάξεων προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα του τμήματος αυτού. Πραγματοποιούνται *in silico* μελέτες πρωτεϊνικής ανάλυσης για την αναγνώριση της επικράτειας γλυκοαμυλάσης. Ακολουθεί ο σχεδιασμός εκκινήτων για την ενίσχυση του γονιδίου της PhKa<sub>trnc</sub> και η κλωνοποίηση των κατάλληλων φορέων pGEX-6P-1 και pATHRA. Η τεχνική κλωνοποίησης που εφαρμόζεται βασίζεται στη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού (*In-fusion*). Για τις μελέτες έκφρασης αξιοποιείται ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυτταρικών σειρών BL21-Gold (DE3) και B834(DE3)pLySs. Όσον αφορά, τη δημιουργία μεταλλάγματος με στόχο την αύξηση της διαλυτότητας, αρχικά πραγματοποιείται *in silico* έρευνα για τον εντοπισμό των καταλοίπων που θα αποτελούσαν τον στόχο των μεταλλάξεων, και στη συνέχεια σχεδιάζονται οι κατάλληλοι εκκινήτες.

Η επίλυση της δομής της επικράτειας γλυκοαμυλάσης της PhKa θα προωθήσει την ανάπτυξη νέων ιδεών για την αξιοποίηση της PhK ως φαρμακευτικού στόχου για την αντιμετώπιση διαταραχών του μεταβολισμού του γλυκογόνου.



# Abstract

---

Phosphorylase kinase (PhK) was the first protein kinase to be observed in 1955 by Fisher, Graves and Krebs, and to be purified in 1964 by Krebs from the skeletal muscle tissue of a rabbit. PhK is a hexadecameric enzyme complex of a molecular weight of 1.3 MDa in the glycogenolysis cascade. Glycogenolysis is controlled by hormonal and neural signals, however the details referring to the ways the enzyme is regulated are unknown mainly due to the complexity of its structure.

Cryo-electron microscopy and X-ray crystallography studies have contributed to the solution of the structure of the holoenzyme to a resolution of 9.9 Å, of the truncated active catalytic subunit  $\gamma$  (PhK $\gamma_{trnc}$ ) from the muscle tissue of a rabbit, and the  $\delta$  subunit which is a calmodulin structure. However, there are no sufficient data with regard to the  $\alpha$  and  $\beta$  homologous regulatory subunits. Recently, several *in silico* studies seem to suggest the presence of potentially functional glucoamylase (GH15)-like domains near their amino-termini; experimental proof is required.

The aim of this thesis is the bioinformatics analysis and the heterologous expression of the truncated part of the N-terminal region of the  $\alpha$  subunit (PhK $\alpha_{trnc}$ ) which has glucoamylase activity. In addition, the design of mutations is examined in order to increase the solubility of this segment. *In silico* protein analysis studies are made to recognize the glucoamylase domain. What follows is the design of primers to amplify the PhK $\alpha_{trnc}$  gene and the cloning of the appropriate vectors, pGEX-6P-1 and pATHRA. The applied cloning technique is based on the method of homologous recombination (*In-fusion*). The transformation of bacterial strains BL21-Gold (DE3) and B834(DE3)pLySs is exploited on the expression studies. As for the mutagenesis in order to increase the solubility, at first an *in silico* research is conducted to locate the residues which might form the target of mutations, and then the appropriate primers are designed.

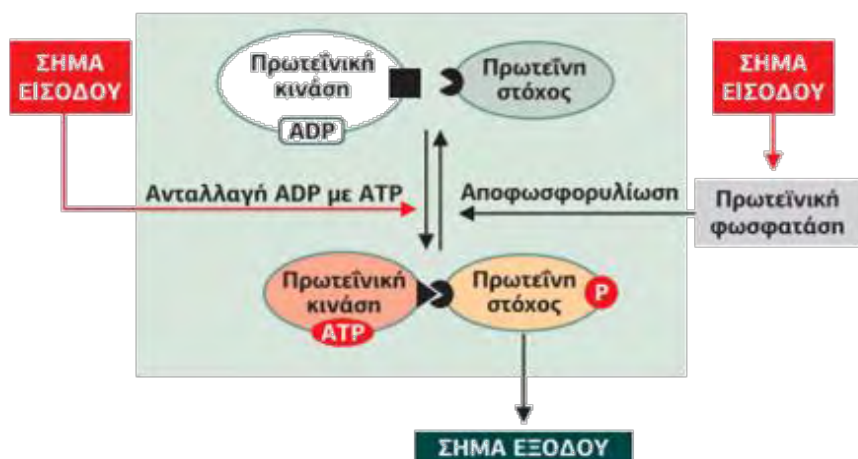
Resolving the structure of the PhK $\alpha$  glucoamylase domain will forward the development of new ideas for the deployment of PhK as a pharmaceutical target to the treatment of glycogen metabolism disorders.

# 1.Εισαγωγή

## 1.1. Φωσφορυλίωση – Πρωτεϊνικές Κινάσες

Η πρωτεΐνη, συχνά, υφίσταται χημικές τροποποιήσεις στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων, ή στο αμινοτελικό ή καρβοξυτελικό του άκρο, οι οποίες μπορεί να συμβούν αμέσως μετά ή και κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Αυτές οι μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις οδηγούν σε αλλαγές των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων της, της αναδίπλωσής της και της σταθερότητάς της. Επιπλέον μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητά της και γενικότερα τη λειτουργία της. Κάποιες από τις πιο γνωστές μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι φωσφορυλίωσεις, ακετυλιώσεις, N-γλυκοσυλιώσεις και άλλες (Khoury, Baliban, & Floudas, 2014).

Έχουν γίνει πολλές έρευνες πάνω στους διάφορους τύπους μετα- μεταφραστικών τροποποιήσεων και στη σχέση που αυτοί έχουν με τη λειτουργία της πρωτεΐνης (Choudhary et al., 2009; Oliveira et al., 2012; Ubersax & Ferrell, 2007). Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση αποτελεί τον πιο εκτενώς μελετημένο τύπο μετα- μεταφραστικών τροποποιήσεων και επηρεάζει τουλάχιστον το 1/3 όλων των κυτταρικών πρωτεϊνών (Marks, Klingmüller, & Müller-Decker, 2009). Είναι η σημαντικότερη αντίδραση της κυτταρικής επεξεργασίας δεδομένων και καταλύεται από πρωτεϊνικές κινάσες, ενώ η αποφωσφορυλίωση καταλύεται από πρωτεϊνικές φωσφατάσες (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1** Η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Σε περίπτωση απουσίας του ATP η πρωτεϊνική κινάση είναι ανενεργή. Η ενεργή κινάση μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα (P) από το ATP στην πρωτεΐνη στόχο, η διαμόρφωση και η λειτουργία της οποίας αλλάζει, αποτελώντας το σήμα εξόδου. Μια φωσφατάση καταλύει την αποφωσφορυλίωση και επαναφέρει την αρχική κατάσταση. (Marks et al., 2009)

Τόσο η φωσφορυλίωση όσο και η αποφωσφορυλίωση αποτελούν έναν βασικό μηχανισμό ρύθμισης για τα βιολογικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεϊνικές κινάσες συμμετέχουν στη ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών και των κυτταρικών διεργασιών στο μεταβολισμό, τη μεταγραφή, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, τη διαφοροποίηση, τη διάταξη του κυτταροσκελετού και την κυτταρική κίνηση, την απόπτωση, τη διακυτταρική επικοινωνία κ.ά. (L. N. Johnson, 2009)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες απαρτίζουν μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες πρωτεϊνών, με περισσότερα από 100 ομόλογα ένζυμα στη ζύμη και περισσότερα από 550 στον άνθρωπο (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2010).

Η ATP είναι ο πιο κοινός δότης φωσφορικών. Για να αλληλεπιδράσει η πρωτεϊνική κινάση με την ATP και το υπόστρωμά της πρέπει πρώτα να μεταβεί από την ανενεργή στην ενεργή της μορφή, ώστε να ελευθερωθεί η καταλυτική της περιοχή. Αυτό επιτυγχάνεται με την επίδραση ενός σήματος εισόδου (cAMP, cGMP, αυξητικοί παράγοντες κ.ά.). Αυτό το σήμα επάγει μια αλλαγή στη διαμόρφωση και η καταλυτική περιοχή γίνεται προσβάσιμη. Πολλές πρωτεϊνικές κινάσες, προκειμένου να αποκτήσουν πλήρη δραστικότητα, απαιτούν μια φωσφορυλίωση του βρόγχου ενεργοποίησης από μια άλλη κινάση, ή την αλλαγή της διαμόρφωσης του βρόγχου ενεργοποίησης από μια πρωτεΐνη συνοδό (Marks et al., 2009). Ο βρόγχος ενεργοποίησης είναι μια πολυπεπτιδική περιοχή που εντοπίζεται έξω από την ενεργή θέση του καταλυτικού κέντρου (Adams, 2003).

Οι πρωτεϊνικές κινάσες δεν φωσφορυλιώνουν ελεύθερα αμινοξέα. Η τελική ( $\gamma$ ) φωσφορική ομάδα της ATP μεταφέρεται συνήθως σε μια υδροξυλομάδα που περιέχεται στην πλευρική ομάδα ενός από τα αμινοξέα (Ser), θρεονίνη (Thr) και τυροσίνη (Tyr). Άλλοι στόχοι της φωσφορυλίωσης μπορεί, επίσης, να είναι και η ιστοιδίνη (His), το ασπαραγινικό οξύ (Asp), το γλουταμινικό οξύ (Glu), η λυσίνη (Lys) και η αργινίνη (Arg). Οι κινάσες που φωσφορυλιώνουν His, Asp, Lys, Arg/ Glu συναντώνται κυρίως στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και έχουν μικρή σημασία στη σηματοδότηση των ευκαρυωτικών οργανισμών (Berg, Tymoczko, and Stryer 2002, p.302).

Η μεταφορά και η πρόσδεση της φωσφορικής ομάδας μπορεί να ενεργοποιήσει ή να απενεργοποιήσει μια πρωτεΐνη στόχο (i) μεταβάλλοντας τη διαμόρφωσή της, (ii) επιτρέποντας ή παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο ή (iii) σημαίνοντας την προς απόσυρση ή προς αποικοδόμηση. Τέλος, η φωσφορυλίωση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων (Cohen, 2000; Marks et al., 2009; Serber & Ferrell, 2007).

### 1.1.1. Κατηγορίες πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες κατηγοριοποιούνται με βάση τη φύση του αμινοξέος που φωσφορυλιώνουν. Επομένως, διακρίνονται σε (i) κινάσες σερίνης/ θρεονίνης, (ii) κινάσες τυροσίνης, (iii) κινάσες ιστιδίνης (Τα μέλη αυτής της οικογένειας ενζύμων φωσφορυλιώνουν, επίσης, κατάλοιπα Lys και Arg/Glu) και (iv) κινάσες ασπαραγινικού) (Marks et al., 2009).

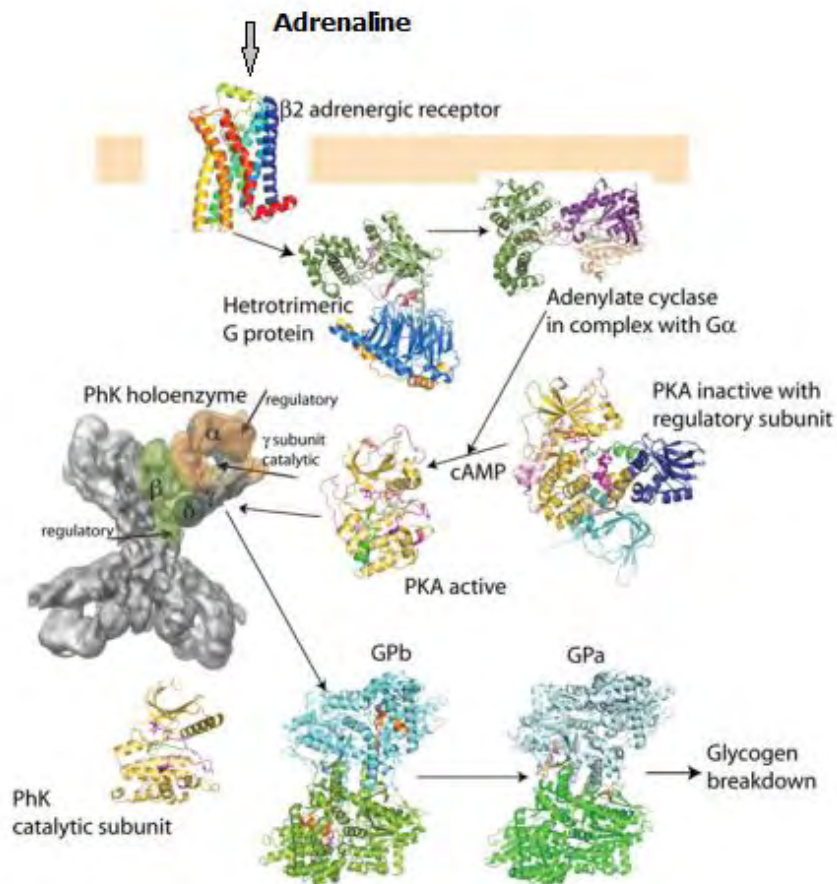
Με βάση την αμινοξική αλληλουχία και τη δομή τους οι πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr και Tyr δημιουργούν μια κλειστή υπεροικογένεια που διαφέρει από τις κινάσες His και τα άλλα ένζυμα φωσφομεταφοράς. Οι κινάσες Ser/ Thr και Tyr διαφοροποιούνται έπειτα από σύγκριση της αλληλουχίας των καταλυτικών τους περιοχών.

## 1.2. Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK)

Η μυϊκή ισομορφή της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK, EC 2.7.11.19) ήταν η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που αναγνωρίστηκε (Fischer & Krebs, 1955), καθορίστηκε (Krebs et al., 1964), και καθορίστηκαν η λειτουργία και οι φυσικοχημικές της ιδιότητες. Ωστόσο λίγα είναι γνωστά για τη δομή της. Αποτελείται από τέσσερις τετραμερείς υπομονάδες, συγκροτώντας ένα δεκαεξαμερές σύμπλοκο  $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$  με μοριακό βάρος  $1,3 \times 10^6$  Da. Οι υπομονάδες  $\alpha$  (138 kDa, 1237 αμινοξέα),  $\beta$  (125 kDa, 1092 αμινοξέα) και  $\delta$  (16.7 kDa, 148 αμινοξέα) είναι ρυθμιστικές, ενώ η  $\gamma$  (44.7 kDa, 386 αμινοξέα) είναι η καταλυτική υπομονάδα. Η καταλυτική δραστηριότητα της  $\gamma$  υπομονάδας αναστέλλεται από τις  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδες, οι οποίες πιθανόν να προέρχονται από γονιδιακό διπλασιασμό (Kilimann et al., 1988). Η αυτοφωσφορυλίωση ή η φωσφορυλίωσή τους από την PKA, έπειτα από κάποιο ορμονικό ή νευρικό σήμα, οδηγεί στην ενεργοποίηση της κινάσης. Επιπλέον, και η δέσμευση του ADP στη  $\beta$  υπομονάδα έχει θετικό αποτέλεσμα στη διέγερση της κινάσης. Η  $\delta$  υπομονάδα έχει ενδογενή δράση καλμοδουλίνης και παρουσία ιόντων ασβεστίου ενεργοποιεί τη  $\gamma$  υπομονάδα (Brushia & Walsh, 1999).

Η PhK καταλύει την ασβεστο-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και επομένως διεγείρει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου προς σχηματισμό 1- φωσφορικής γλυκόζης. Πιο συγκεκριμένα, φωσφορυλιώνει την φωσφορυλάση b του γλυκογόνου (μη φωσφορυλιωμένη – ανενεργή, GPb) σε ένα μοναδικό κατάλοιπο σερίνης (Ser14) και τη μετατρέπει σε φωσφορυλάση a του γλυκογόνου (ενεργή, GPa). Η PhK, προκειμένου να επιτευχθεί ταχεία κινητοποίηση των αποθεμάτων γλυκογόνου, ενσωματώνει σήματα από διαφορετικά μονοπάτια, όπως για παράδειγμα ορμόνες (π.χ. αδρεναλίνη) (**Εικόνα 2**), νευρικά ερεθίσματα (π.χ.  $Ca^{2+}$ ) και μεταβολικά σήματα (π.χ. επίπεδα APD) (Vénien-Bryan et al., 2009). Ως τώρα, η ρύθμιση της γλυκογονόλυσης είναι η μοναδική

φυσιολογική λειτουργία που αποδίδεται στην PhK, αν και πιθανόν να βρεθούν και άλλες που να σχετίζονται με αυτό το ένζυμο (L. N. Johnson, 2009).



**Εικόνα 2** Τρισδιάστατες δομές των μορίων που συμμετέχουν σε κάθε βήμα του σηματοδοτικού μονοπατιού αποικοδόμησης του γλυκογόνου που επάγεται από την πρόσδεση της αδρεναλίνης στους  $\beta_2$ -αδρενεργικούς υποδοχείς

### 1.2.1. Ισομορφές της PhK

Η PhK έχει εκτεταμένη κατανομή στους ιστούς αλλά εντοπίζεται κυρίως στους μυς (mPhK), στο ήπαρ (lPhK) και στα αστρογλοϊικά κύτταρα του εγκεφάλου (bPhK). Αντίστοιχα, οι υπομονάδες α, β και γ έχουν μερικές ιστο-ειδικές ισομορφές. Κάποιες ισομορφές κωδικοποιούνται από διακριτά γονίδια, ενώ άλλες είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του ίδιου γονιδίου (Nadeau, Fontes, & Carlson, 2018).

Έτσι, η υπομονάδα α κωδικοποιείται από δύο γονίδια, τα PHKA1 και PHKA2, που εδράζονται στο Χ χρωμόσωμα. Το γονίδιο A1 κωδικοποιεί την α υπομονάδα της mPhK. Ωστόσο, έπειτα από εναλλακτικό μάτισμα και αφαίρεση τμήματος μήκους 59 αμινοξέων, σχηματίζεται η α υπομονάδα της PhK στα καρδιακά και ερυθρά μυϊκά κύτταρα (Harmann, Zander, & Kilimann, 1991). Το γονίδιο PHKA2 κωδικοποιεί την α υπομονάδα της lPhK (Hirono H, Hayasaka K, Sato W, Takahashi T, 1995). Όμοια, η υπομονάδα γ κωδικοποιείται από δύο γονίδια: PHKG1 (χρωμόσωμα 7) (Jones, da Cruz e Silva, Spurr, Sheer, & Cohen, 1990) και PHKG2 (χρωμόσωμα 16) (Burwinkel, Shiomi, Al Zaben, & Kilimann, 1998). Το γονίδιο G1 κωδικοποιεί την γ υπομονάδα της mPhK, ενώ το G2 κωδικοποιεί την υπομονάδα γ της lPhK. Από την άλλη, υπάρχει ένα μόνο γονίδιο, το PHKB (χρωμόσωμα 16) για τη β υπομονάδα. Ωστόσο, το RNA του γονιδίου PHKB υφίσταται διάφορα εναλλακτικά ματίσματα ώστε τελικά να προκύπτουν τέσσερις διαφορετικές β υπομονάδες (Harmann et al., 1991). Τέλος, τρία γονίδια (CALM1-3) κωδικοποιούν ταυτόσημες πρωτεΐνες καλμοδουλίνης (δ υπομονάδα).

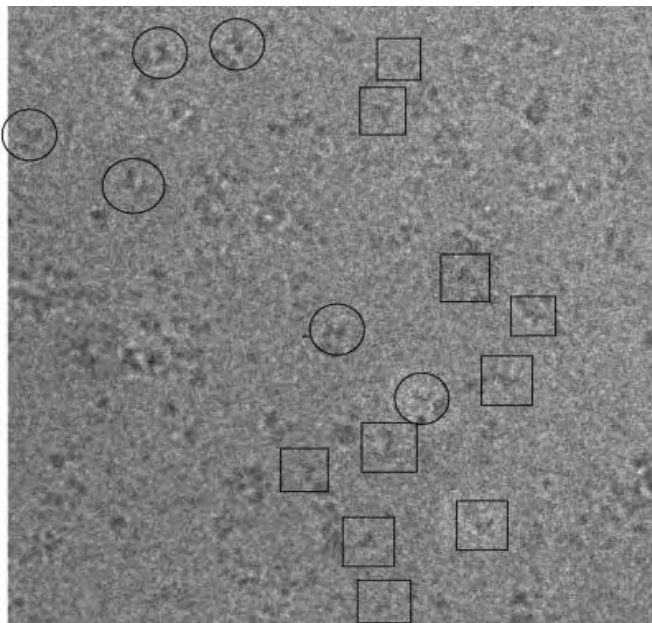
Από όλες τις δυνατές ισομορφές, η mPhK και η lPhK έχουν απομονωθεί και μελετηθεί. Σε μικρότερο βαθμό, και η PhK που εκφράζεται στην καρδιά έχει καθαριστεί και χαρακτηριστεί ως ομοιογενής ισομορφή (Brushia & Walsh, 1999; Chrisman, Jordan, & Exton, 1982). Όσον αφορά, τη bPhK δεν έχει απομονωθεί ακόμα.

### 1.2.2. Δομή του ολοενζύμου της PhK

Η PhK είναι από τις μεγαλύτερες και πιο περίπλοκες πρωτεϊνικές κινάσες. Η δομή της PhK δεν είναι εύκολο να μελετηθεί εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους της κινάσης. Ωστόσο, έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές μέθοδοι που έχουν παραγάγει τρισδιάστατες δομές χαμηλής απόδοσης, όπως η συμβατική ηλεκτρονική μικροσκοπία (TEM) (Nadeau, Carlson, & Gogol, 2002; Norcum, Wilkinson, Carlson, Hainfeld, & Carlson, 1994), η κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (cryo-EM) (Nadeau, Gogol, & Carlson, 2005; Vénien-Bryan et al., 2009) και η σκέδαση ακτινών Χ μικρής γωνίας (SAXS) (Priddy, 2005). Ολόκληρο το μόριο PhK είναι δύσκολο να κρυσταλλωθεί ώστε να ακολουθήσουν μελέτες ακτινών Χ, αλλά έχει δειχθεί επιδεκτικό στην ηλεκτρονική μικροσκοπία μονοσωματιδίων (Vénien-Bryan et al., 2009).

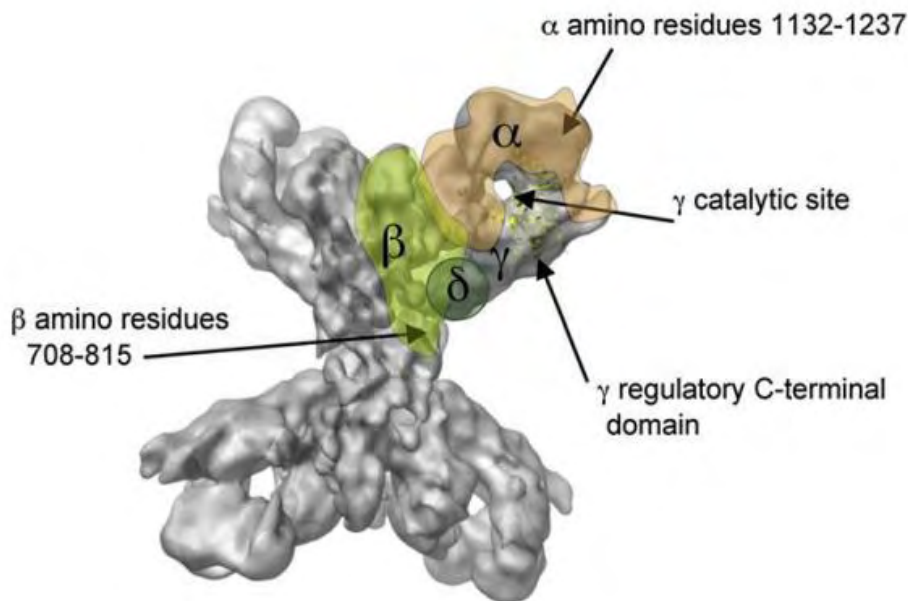
Από μελέτες κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της PhK του κουνελιού έχει διαπιστωθεί πως το ολοένζυμο έχει σχήμα πεταλούδας, με δύο λοβούς που

συνδέονται μεταξύ τους μέσω δύο δομών που θυμίζουν «λοξές γέφυρες». Οι διαστάσεις ολόκληρου του ενζύμου είναι  $270 \times 225 \times 160 \text{ \AA}$ . Οι διαστάσεις των λοβών έχουν υπολογιστεί στα  $225 \text{ \AA} \times 110 \text{ \AA}$  και οι γέφυρες έχουν μήκος  $55 \text{ \AA}$  και πλάτος  $45 \text{ \AA}$  (**Εικόνα 3**) (Vénien-Bryan et al., 2009).



**Εικόνα 3** Κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία της ΡhK. Η χαρακτηριστική μορφή πεταλούδας επισημαίνεται με κύκλο (Venien-Bryan et al., 2009)

Για την αναγνώριση των θέσεων των επιμέρους υπομονάδων έχουν γίνει μελέτες ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας και σταυροσυνδέσεων. Πιθανολογείται πως η α υπομονάδα βρίσκεται στο εξωτερικό άνω τμήμα των λοβών, η β στο κεντρικό τμήμα των λοβών, η γ στο εσωτερικό των λοβών, ενώ η δ εντοπίζεται κοντά στη γέφυρα. Οι υπομονάδες μεταξύ τους αλληλεπιδρούν. Πιο συγκεκριμένα, το N-τελικό άκρο της α υπομονάδας αλληλεπιδρά με τη β υπομονάδα, ενώ το C-τελικό της με τη γ υπομονάδα. Το C-τελικό άκρο της γ υπομονάδας φαίνεται να αλληλεπιδρά με τη δ υπομονάδα (**Εικόνα 4**) (Vénien-Bryan et al., 2009).



**Εικόνα 4** Σχηματική απεικόνιση της δομής της ολοενζύμου της PhK όπου εντοπίζεται κάθε υπομονάδας της (9.9 Å) (Venien-Bryan *et al.*, 2009)

### 1.2.3. Υπομονάδες της PhK

#### 1.2.3.1. γ υπομονάδα

Η καταλυτική γ υπομονάδα της PhK αποτελείται από 386 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 44,7 kDa. Ο εντοπισμός της γ υπομονάδας έγινε με τη βοήθεια αντισωμάτων και παρατηρήθηκε πως βρίσκεται στο εσωτερικό των λοβών. Περιέχει μια περιοχή με δράση κινάσης σερίνης – θρεονίνης, που εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-298) και μια ρυθμιστική περιοχή στο C-τελικό άκρο (301-367) (Owen, Noble, Garman, Parageorigiou, & Johnson, 1995).

Η δομή της κολοβωμένης (truncated, αμινοξέα 1-298, PhK<sub>trnc</sub>) γ υπομονάδας επιλύθηκε σε τριμερές σύμπλοκο που αποτελούταν από ένα μη υδρολυόμενο ανάλογο του ATP (adenyllyl imidodiphosphate, AMPPNP) και από ένα επταπεπτίδιο ως υπόστρωμα που σχετίζεται σε αλληλουχία τόσο με το φυσικό υπόστρωμα όσο και με το ιδανικό για υπόστρωμα πεπτίδιο (**Εικόνα 5**) (Owen *et al.*, 1995).

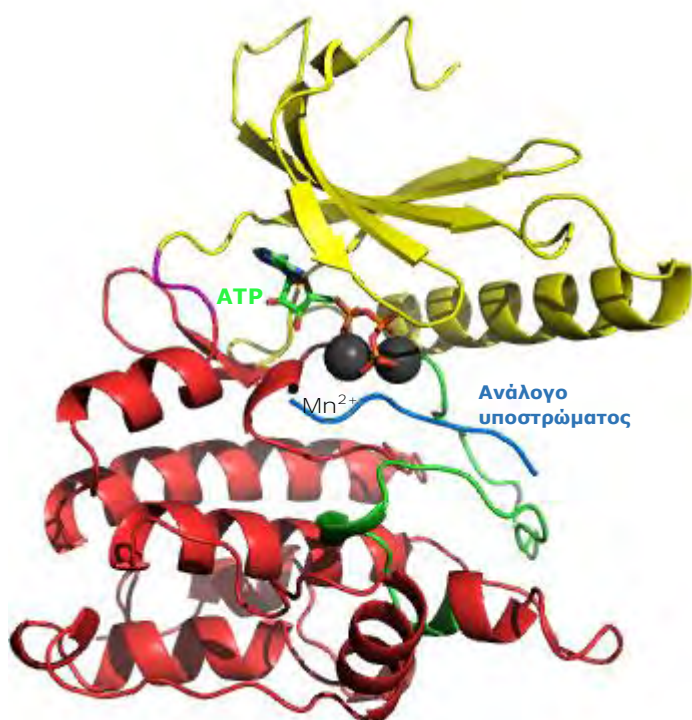
Η περιοχή με δράση κινάσης αποτελείται από ένα τμήμα που σχηματίζεται κυρίως από β-φύλλα (αμινοξέα 14-107) και από ένα μεγαλύτερο αποτελούμενο κυρίως από α έλικες (αμινοξέα 110-292). Οι δυο περιοχές συνδέονται με έναν εύκαμπτο σύνδεσμο (hinge) γύρω από τα αμινοξέα Lys108 και Gly109 (Lowe *et al.*, 1997). Η καρβοξυτελική ρυθμιστική περιοχή διαθέτει δυο περιοχές αλληλεπίδρασης



με την καλμοδουλίνη (αμινοξέα 301-327 και 342-367). Αποτελεί την κύρια περιοχή στην οποία προσδένεται η  $\delta$  υπομονάδα.

Το τμήμα με δράση κινάσης μπορεί είναι λειτουργικά ενεργό ακόμα και αν αποκοπεί από την υπόλοιπη πρωτεΐνη (Brushia & Walsh, 1999). Ωστόσο δεν είναι δυνατόν να ρυθμιστεί μέσω φωσφορυλίωσης ή μέσω ασβεστίου, καθώς απουσιάζουν οι περιοχές οι οποίες μπορούν να φωσφορυλιωθούν και οι δύο περιοχές σύνδεσης με την  $\delta$  υπομονάδα του C- τελικού άκρου (J. D. Johnson, Snyder, Walsh, & Flynn, 1996)

Η  $\gamma$  υπομονάδα φαίνεται να διαθέτει μια ακόμα περιοχή στο εσωτερικό της, το τμήμα ενεργοποίησης (αμινοξέα 167-193). Ως τμήμα ενεργοποίησης ορίζεται το τμήμα που περικλείεται από τις συντηρούμενες αμινοξικές αλληλουχίες DFG και APE. (Hanks & Quinn, 1991). Αυτό το τμήμα εντοπίζεται στο κέντρο σύνδεσης του υποστρώματος και η φωσφορυλίωσή του συνεπάγεται την ενεργοποίηση πολλών πρωτεϊνικών κινασών, αλλά όχι της ΡΗΚ.



**Εικόνα 5**

Σχηματική απεικόνιση της δομής της RhK<sub>trnc</sub> (PDB ID: 2PHK) (τροποποίηση). Με κίτρινο και κόκκινο χρωματίζονται η αμινοτελική και η καρβοξυτελική περιοχή, αντίστοιχα. Με πράσινο χρωματίζεται το τμήμα ενεργοποίησης. Με μπλε χρωματίζεται το ανάλογο υποστρώματος (AMPPNP). Επίσης διακρίνεται ο σύνδεσμος (hinge) (μωβ), το ATP και τα ιόντα μαγγανίου (Mn<sup>2+</sup>).

Η RhK<sub>trnc</sub> είναι συνεχώς ενεργή, χωρίς να έχει προηγηθεί φωσφορυλίωση. Σε αντίθεση με τις άλλες κινάσες, η RhK $\gamma$  στη θέση του φωσφορυλιωμένου αμινοξέος του τμήματος ενεργοποίησης, κατέχει το Glu182. Το γλουταμινικό οξύ μιμείται τη φωσφορυλιωμένη Ser/Thr και έτσι ο βρόγχος ενεργοποίησης είναι μόνιμως στην ενεργή του διαμόρφωση του. Επιπρόσθετα, η RhK $\gamma$  πιθανώς να ρυθμίζεται μέσω ενός μηχανισμού ψευδοϋποστρώματος ή και ανάλογα με την κατάσταση φωσφορύλιωσης

των ρυθμιστικών υπομονάδων  $\alpha$  και  $\beta$  (αλλοστερικός μηχανισμός ρύθμισης) (Owen et al., 1995).

Η επίλυση της δομής του τρυαδικού συμπλόκου σε ευκρίνεια 2.6 Å σε συνδυασμό με μελέτες μεταλλαξιγένεσης (Skamnaki et al., 1999) οδήγησαν στη διατύπωση ενός προτεινόμενου καταλυτικού μηχανισμού. Ο μηχανισμός μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας θεωρείται περίπτωση οξεοβασικής κατάλυσης. Επιπλέον, το χημικό βήμα της μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας είναι γρήγορο ενώ η απελευθέρωση των προϊόντων είναι το αργό βήμα (Skamnaki et al., 1999).

#### 1.2.3.2. $\delta$ υπομονάδα

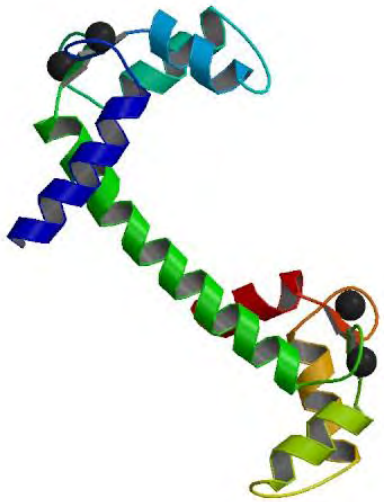
Η  $\delta$  υπομονάδα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, είναι καλμοδουλίνη. Αποτελείται από 148 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 16,7 kDa. Στο αμινοτελικό άκρο του μορίου υπάρχει μια ακετυλομάδα, ενώ στη θέση 115 υπάρχει μια τριμεθυλολυσίνη (Grand, Nairn, & Perry, 1980). Η καλμοδουλίνη έχει κωνοειδές σχήμα με μία κεντρική  $\alpha$ -έλικα που ενώνει δύο σφαιρικές περιοχές δέσμησης ιόντων ασβεστίου  $\text{Ca}^{2+}$  (

**Εικόνα 6)** (Brushia & Walsh, 1999).

Αρκετές πρωτεϊνικές κινάσες, συμπεριλαμβανομένης της PhK, κατέχουν την καλμοδουλίνη ως ρυθμιστική υπομονάδα (Hanson & Schulman, 1992). Η εξάρτηση της δραστηριότητας της PhK από τα ιόντα ασβεστίου  $\text{Ca}^{2+}$  δείχθηκε το 1964 (Meyer, Fischer, & Krebs, 1964), αλλά το 1979 αποδείχθηκε πως η καλμοδουλίνη είναι η υπομονάδα που συνδέει  $\text{Ca}^{2+}$  (Shenolikar, Cohen, Cohen, Nairn, & Perry, 1979)

Γενικά, η καλμοδουλίνη συνδέεται σε πρωτεΐνες έπειτα από σύνδεση με ιόντα ασβεστίου. Πιο συγκεκριμένα, ένα μόριο  $\text{Ca}^{2+}$  δεσμεύεται σε κάθε ένα από τα κέντρα σύνδεσης  $\text{Ca}^{2+}$  που ορίζονται ως “EF hands”. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η μεταγωγή σημάτων  $\text{Ca}^{2+}$ , που καθορίζουν την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινάσων. Όταν η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου μειωθεί, η καλμοδουλίνη αποσυνδέεται από τις πρωτεϊνικές κινάσες και η μεταγωγή σήματος σταματά.

Αντίθετα με τον παραπάνω γενικό κανόνα, στην PhK, η καλμοδουλίνη παραμένει συνδεδεμένη με την  $\gamma$  υπομονάδα, και κατεπέκταση με το ολοένζυμο, και απουσία  $\text{Ca}^{2+}$  (Brushia & Walsh, 1999; Yuan & Graves, 1989).



**Εικόνα 6** Σχηματική απεικόνιση της δομής της καλμοδουλίνης με συνδεδεμένα 4 ιόντα ασβεστίου (μαύρες σφαίρες). Ευκρίνεια 2.2 Å. PDB ID: 3CLN. (Babu *et al*, 1997)

#### 1.2.3.3. α και β υπομονάδες

Οι ρυθμιστικές υπομονάδες α (1237 αμινοξέα) και β (1092 αμινοξέα) έχουν μοριακά βάρη 138 kDa και 125 kDa, αντίστοιχα και μαζί, αποτελούν περίπου το 80% του ολοενζύμου. Μέχρι σήμερα, παραμένουν άγνωστες οι επιμέρους ρυθμιστικές ιδιότητές τους.

Τόσο η α όσο και η β υπομονάδα, που απομονώθηκαν από σκελετικό μυϊκό ιστό κουνελιού, διαθέτουν μια περιοχή πολύ-ισοπρενυλίωσης στο καρβοξυτελικό άκρο τους. Επιπρόσθετα, έχει δειχτεί πως και οι δύο υπομονάδες είναι φαρνεσυλιωμένες (Kilimann *et al.*, 1988). Η φαρνεσυλίωση γενικά συμβάλλει στην πρόσδεση πρωτεϊνών σε μεμβράνες, οπότε είναι πιθανόν η PhK να ελέγχει με αυτόν τον τρόπο την διαμερισματοποίησή της μέσα στο κύτταρο. Είναι επίσης πιθανό, η φαρνεσυλίωση να βελτιώνει τον τρόπο σύνδεσης της α και β υπομονάδας ή να διευκολύνει την πρόσδεση της PhK σε άλλες πρωτεΐνες. Επιπλέον, και για τις δύο υπομονάδες όταν απομονώθηκαν, διαπιστώθηκε πως φέρουν ομοιοπολικά συνδεδεμένο φωσφόρο, σε διαφορετικές μεταξύ τους θέσεις φωσφορυλίωσης (Brushia & Walsh, 1999).

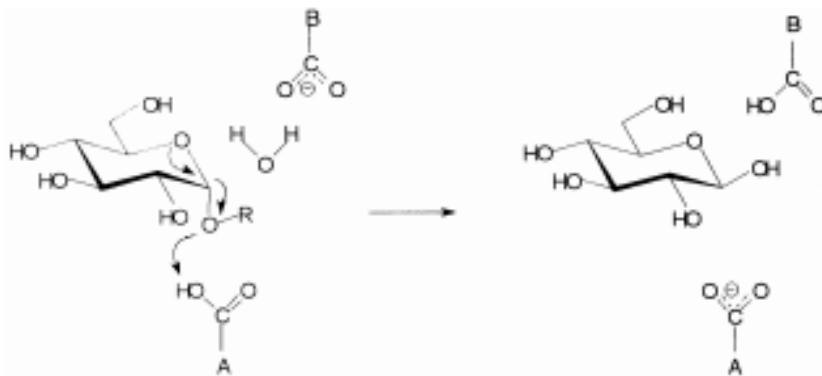
Η φωσφορυλίωση ή η *in vitro* αυτοφωσφορυλίωση των περιοχών αυτών στις α και β υπομονάδες οδηγεί σε ενεργοποίηση της PhK (Brushia & Walsh, 1999). Ωστόσο έχει δειχτεί πως η β υπομονάδα φωσφορυλιώνεται πρώτη σε σειρά και πως η φωσφορυλίωση της συμβαίνει παράλληλα με την ενεργοποίηση της γ υπομονάδας (Ramachandran, Goris, Waelkens, Merlevede, & Walsh, 1987).

Η μικρότερη παροχή δεδομένων αφορά τη δομή και λειτουργία της  $\alpha$  υπομονάδας, της μεγαλύτερης υπομονάδας της PhK. Εκτός από τον δευτερεύοντα ρόλο της στην ενεργοποίηση της PhK μέσω φωσφορυλίωσης, η  $\alpha$  υπομονάδα έχει δειχθεί πως είναι μέρος ενός ασβεστιο-εξαρτώμενου δικτύου επικοινωνίας μεταξύ των υπομονάδων της PhK που περιλαμβάνει επίσης τις  $\gamma$  και  $\delta$  υπομονάδες. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται πως τα ιόντα ασβεστίου διαταράσσουν την αλληλεπίδραση της  $\alpha$  υπομονάδας με την καταλυτική υπομονάδα υποδηλώνοντας πως η ροή της πληροφορίας από την  $\delta$  στην  $\alpha$  υπομονάδα γίνεται μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της  $\gamma$  υπομονάδας (Rice, Nadeau, Yang, & Carlson, 2002).

Παραπάνω αναφέρθηκε πως υπάρχει διαθέσιμη δομική πληροφορία για την καταλυτική υπομονάδα και για την  $\delta$  υπομονάδα με δράση καλμοδουλίνης, ωστόσο για τις ομόλογες  $\alpha$  και  $\beta$  ρυθμιστικές υπομονάδες δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα όσον αφορά τη δομή τους. Πρόσφατες *in silico* μελέτες όπου έγινε σύγκριση/στοίχιση αλληλουχιών, έδειξαν πως το αμινοτελικό άκρο της  $\alpha$  υπομονάδας (αμινοξέα 1- 436) και της  $\beta$  υπομονάδας (αμινοξέα 40- 477) της ανθρώπινης PhK (hPhK), παρουσιάζει ομοιότητες στην αλληλουχία με την οικογένεια 15 των γλυκοσυδρολασών (GH-15) (Pallen, 2003). Επιπλέον, περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο των υπομονάδων, και πιο συγκεκριμένα τα αμινοξέα 1066- 1237 ( $\alpha$  υπομονάδα) και 918- 1093 ( $\beta$  υπομονάδα) μοιράζεται ομοιότητες ως προς την αλληλουχία με τις πρωτεΐνες τύπου καλσινευρίνης-B (calcineurin B-like, CBL) (Carrière, Jonic, Mornon, & Callebaut, 2008), οι οποίες αποτελούνται από δύο ζεύγη EF- hands και είναι πιθανό να συμβάλλουν στην ρύθμιση μέσω ιόντων ασβεστίου. Η περιοχή με δράση CBL πιθανώς να αποτελεί υποπεριοχή μιας ευρύτερης με δράση τύπου  $\alpha/\beta$  ιμφορτίνης (importin  $\alpha/\beta$ -like, IBL) (Rimmer et al., 2018).

#### 1.2.3.3.1. Γλυκοαμυλάσες

Οι γλυκοαμυλάσες (GA, EC 3.2.1.3) καταλύουν την υδρόλυση των 1,4 και 1,6 γλυκοσιδικών δεσμών προς απελευθέρωση  $\beta$ -D- γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του αμύλου και άλλων σχετικών πολύ- ή ολιγοσακχαριτών, μέσω μηχανισμού γενικής οξεοβασικής κατάλυσης (**Εικόνα 7**) (Henrissat & Davies, 1997; Sauer et al., 2000). Από τις πιο καλά μελετημένες γλυκοαμυλάσες είναι οι γλυκοαμυλάσες των μυκήτων *Aspergillus niger* (*A. niger*) και *Aspergillus awamori* (*A. awamori*).



**Εικόνα 7** Ο καταλυτικός μηχανισμός των GA που απεικονίζει την δράση της καταλυτικής βάσης E400 (άνω) και του καταλυτικού οξέος E179 (κάτω) στην υποβοηθούμενη από νερό υδρόλυση του υποστρώματος που περιλαμβάνει αναστροφή της διαμόρφωσης του ανωμερικού άνθρακα (Sauer *et al.*, 2000)

Οι γλυκοαμυλάσες υδρολύουν αυτούς τους δεσμούς με αναστροφή της ανωμερικής τους διαμόρφωσης. Μετά από κινητικές μελέτες, έχουν βρεθεί επτά (7) αμινοξικές θέσεις οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση του υποστρώματος (Hiromi, Ohnishi, & Tanaka, 1983). Για την εύρεση του όξινου και του βασικού καταλυτικού αμινοξέος στον *A. niger* και *A. awamori*, έγινε ανάλυση μεταλλάξεων και βρέθηκε πως δύο γλουταμινικά (Glu179 και Glu400) συμμετέχουν στην οξεοβασική υδρόλυση (Frandsen *et al.*, 1994). Η ανάλυση μεταλλάξεων σε συνδυασμό με μεθόδους βιοφυσικής, παρείχε πληροφορίες για τις επιμέρους αμινοξικές θέσεις και βοήθησε στην περιγραφή της επίδρασης της πρωτεΐνης κατά τη σταθεροποίηση του μεταβατικού σταδίου και διαφόρων άλλων σταδίων του μηχανισμού της δράσης της (Christensen, Stoffer, Svensson, & Christensen, 1997)

Όσον αφορά δομικά χαρακτηριστικά, οι γλυκοαμυλάσες αποκτούν μια χαρακτηριστική δομή βαρελιού τύπου ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub> (six- hairpin). Η δομή αυτή σχηματίζεται από 13  $\alpha$ - έλικες που είναι κοντά στις ενεργές θέσεις αυτών των ενζύμων, οι οποίες διατάσσονται σε δύο ομάδες, εσωτερικά και εξωτερικά, πακεταρισμένων 6  $\alpha$ -ελίκων (Aleshin, Feng, Honzatko, & Reilly, 2003). Οι εξωτερικές  $\alpha$ - έλικες συνδέονται με τις εσωτερικές μέσω μακριών θηλιών (loops), οι οποίες σχηματίζουν στο ένα άκρο του δακτυλίου (toroid) μια στενή εσοχή στην οποία δεσμεύεται το υπόστρωμα. Αντίθετα, οι συνδετικοί βρόχοι που συνδέουν τις εσωτερικές με τις εξωτερικές  $\alpha$ - έλικες, είναι σχετικά βραχείς και δεν προεξέχουν από τον πυρήνα του δακτυλίου (Carrière *et al.*, 2008).

### 1.2.3.3.2. Μελέτες για την αμινοτελική περιοχή με πιθανή δράση γλυκοαμυλάσης (glycoside hydrolase-like, GH)

Σε μία πρώτη μελέτη, μετά από στοίχιση αλληλουχιών των ισομορφών της hPhKα, hPhKβ με αλληλουχίες δύο γλυκοαμυλάσων (GA) με γνωστή δομή (PDB ID: 1GAI και 1AYX) και της PkgA, παρατηρήθηκαν πολυάριθμες συντηρημένες αμινοξικές περιοχές που αντιστοιχούν στα δομικά και λειτουργικά αμινοξέα των γλυκοαμυλάσων (**Εικόνα 8**) (Pallen, 2003).

KPBI_HUMAN	91	CMTRQVNDKVES--FKYSQSTKDS	SHAKENTKVCATVVGDDQ----	WGHLQLDATSVLLFLAQMT----	149	
KPB2_HUMAN	91	CMTRQVAKVEK--FKHTQSTKDS	SHAKNTATCGTVVGDQ----	WGHLQVDATSELLFLAQMT----	149	
KPBH_HUMAN	128	CYTRQADKVVQ--FKQDPRPTTC	SHSVENVHTGDELLSYBE----	WGHLQINAVSLMLLYLVEMI----	186	
1GAI	88	IQGVSNPSGDL-----	SSGGLGEPKFNVDETAYTGS	WGNFQRDGPALRATAMIGFG----	138	
1AYX	103	YNTQRTSNPSG-----	SFDDENHKGLGEPKFN	TGSAYTGAWGNPQNDGPALRAYA	SRYLNDVN 162	
PKGA/ECOLI	176	IKRMQDVISNPKRLDGIPQGMNA	HHIRSDNSPVMADVQ	EKGKPOLWNEKONDALGLMLDL	LIIQAIDTG- 244	
KPBI_HUMAN	150	-----ASGLHIIHSLDEN	N--FTQNLVFFYEAA	YKTADEFGIWERGDKTNQGI	SELNASSVGMAKA 207	
KPB2_HUMAN	150	-----ASGLRIIFTLDEN	A--FTQNLVFFYEAA	YKVADFGMWERGDKTNQGI	PELNASSVGMAKA 207	
KPBH_HUMAN	187	-----SSGLQIIYNTDEN	S--FTQNLVFCVERVY	RVEDFGVWERGSKYNNNG	TELHSSVGLAKA 244	
1GAI	139	-----QWLLDNG--Y	TSAAETVWPLRNDLS	YAQYNNQGTDLWE	EVNGSSFFIIVQHRALVES	SA 200
1AYX	163	SLNEGKLVLTDSGD	INFSSTEDYKNI	KPDLLEYIGYNDSTG	DLWEENQGRHFFSLV	QKALAYAVD 232
PKGA/ECOLI	245	-----TINAEDWEKGR	IKSIAHLVAYLDKSN	FYIMEDSGAWE	EDARLNTSSVALVTSG	ERLSN 304

**Εικόνα 8** Τμήμα της πολλαπλής στοίχισης των δύο ισομορφών της hPhKα (KPBI\_HUMAN, KPB2\_HUMAN), της hPhKβ (KPBH\_HUMAN), των γλυκοαμυλάσων 1GAI, 1AYX και της PkgA. Με αστερίσκο σημειώνεται το καταλυτικό όξινο αμινοξύ των γλυκοαμυλάσων (Pallen *et al.*, 2003).

Στη συνέχεια διατυπώθηκαν τρεις υποθέσεις προκειμένου να εξηγηθεί η παρουσία των περιοχών GH στις α και β υπομονάδες της PhK:

- Οι αμινοτελικές περιοχές των υπομονάδων μοιράζονται κοινό πρόγονο και επομένως παρόμοια αναδίπλωση με τις γλυκοαμυλάσες.
- Οι αμινοτελικές περιοχές μπορεί να προσδέουν γλυκογόνο αλλά να μην έχουν ενζυμική δραστηριότητα γλυκογονόλυσης
- Οι αμινοτελικές περιοχές μπορεί να έχουν μια παραβλεπόμενη δραστηριότητα αμυλάσης, δεσμεύοντας και κατόπιν απελευθερώνοντας -D-γλυκόζη από τα μη αναγωγικά άκρα του γλυκογόνου μέσα στα μυϊκά ή ηπατικά κύτταρα.

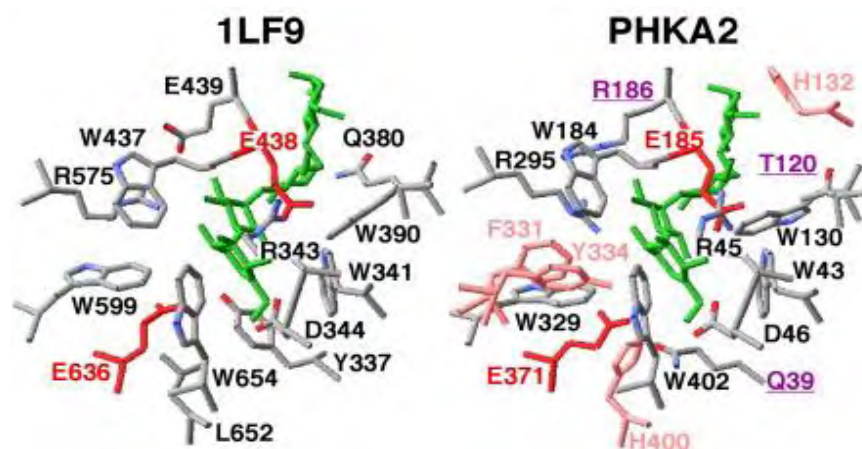
Αν η 2<sup>η</sup> ή και η 3<sup>η</sup> υπόθεση είναι αληθείς, τότε αφενός αυτό καταρρίπτει πως η PhK είναι ρυθμιστικό ένζυμο και το καθιερώνει ως ένα πολυλειτουργικό ένζυμο με καταβολικές και ρυθμιστικές ιδιότητες, αφετέρου έχει σημαντικές πρακτικές επιπτώσεις στην κατανόηση, τη διάγνωση και τη διαχείριση των ασθενειών αποθήκευσης γλυκογόνου (GSD) (Pallen, 2003).

Σε επόμενη μελέτη, οι Carriere *et al.* (2008), έδειξαν πως παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις και μεταλλάξεις προσθήκης ή απαλοιφής που επηρεάζουν τη λειτουργία του γονιδίου PHKA2, συγκεντρώνονται είτε στην περιοχή GH, ή στην περιοχή τύπου CBL. Έπειτα, προχώρησαν στην κατασκευή τρισδιάστατων (3D)

μοντέλων αυτών των περιοχών, με σκοπό να προβλέψουν τις πιθανές επιπτώσεις που έχουν οι μεταλλάξεις στη δομή ή και στη λειτουργία τους. Το μοντέλο που κατασκεύασαν για την περιοχή γλυκοαμυλάσης της  $\alpha$  υπομονάδας βασίστηκε στην στοίχιση της αλληλουχίας της ΡhΚα με την αλληλουχία γλυκοαμυλάσης του βακτηρίου *Clostridium thermosaccharolyticum* (PDB ID: 1LF9) (Carrière et al., 2008).

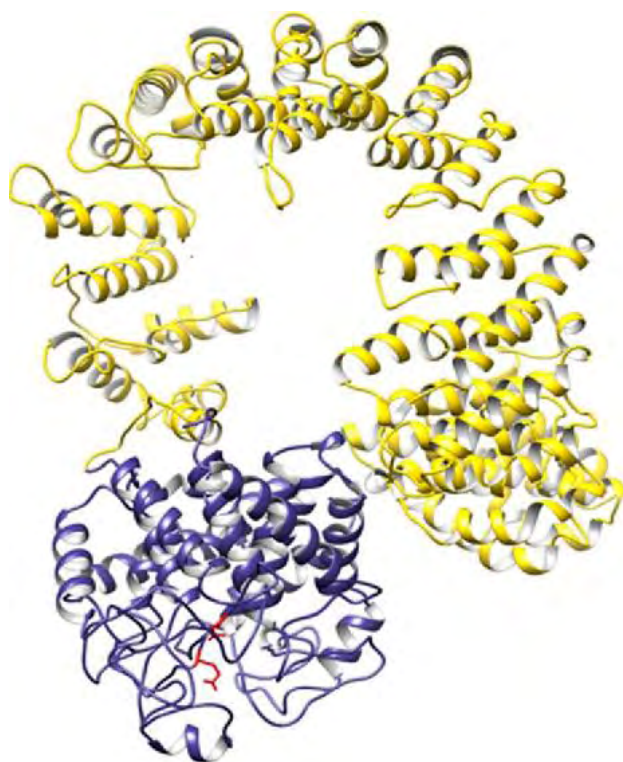
Οι ερευνητές παρατήρησαν πως οι περιοχές GH1 των  $\alpha$  και  $\beta$  υπομονάδων της ΡhΚ φέρουν τα χαρακτηριστικά των γλυκοαμυλάσεων (βλέπε παράγραφο 1.2.3.3.1. *Γλυκοαμυλάσες*), με μια ιδιαίτερα καλά συντηρημένη αλληλουχία στους βρόχους που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο. Επιπρόσθετα, η περιοχή τύπου γλυκοαμυλάσης της ΡhΚα φαίνεται πως διατηρεί τόσο τα δύο καταλυτικά αμινοξέα, αλλά και τα περισσότερα από τα υπόλοιπα αμινοξέα τα οποία έρχονται σε επαφή με το υπόστρωμα στο ενεργό κέντρο. Από αυτά, μερικά είναι αρωματικά αμινοξέα (Carrière et al., 2008) (**Εικόνα 9**).

Έτσι, οι παρατηρήσεις των Carrière *et al.* (2008), φαίνεται να συμφωνούν με τη μελέτη του Pallen (2003), πως η αμινοτελική περιοχή της ΡhΚα είναι επικράτεια γλυκοαμυλάσης, αλλά απαιτείται η πειραματική απόδειξη.



**Εικόνα 9** Σύγκριση του ενεργού κέντρου της δομής γλυκοαμυλάσης (GH-15) με PDB ID: 1LF9 με το ενεργό κέντρο της προβλεπόμενης 3D δομής της περιοχής γλυκοαμυλάσης της ΡhΚα (ηπατική ισομορφή, ΡΗΚΑ2). **Καταλυτικά αμινοξέα.** Ακαρβόζη. Μη ισχυρά συντηρούμενα αμινοξέα. Αρωματικά αμινοξέα. (Carrière *et al.*, 2008)

Στην πιο πρόσφατη μελέτη σχετικά με περιοχές της PhKα, οι Rimmer *et al.* (2017), χρησιμοποίησαν το πρόγραμμα I-TASSER (βλέπε παράγραφο *In silico* μελέτες – Προγράμματα) και πραγματοποίησαν μοντελοποίηση της υπομονάδας με βάση τη δευτεροταγή δομή της η οποία συγκρίθηκε με γνωστά, καταχωρημένα στην PDB, δομικά μοτίβα (threading). Παρατήρησαν πως η περιοχή GH1 (αμινοξέα 1-436), επιδεικνύει αναδίπλωση (α/α)<sub>6</sub> βαρελιού και πως υπάρχουν τα δύο καταλυτικά γλουταμινικά που απέχουν μεταξύ τους περίπου διακόσια (200) κατάλοιπα. Κατέληξαν πως η πρωτεΐνη που είναι δομικά εγγύτερη προς το καλύτερο μοντέλο για την περιοχή με πιθανή δράση γλυκοαμυλάσης της PhKα, με ένα καλό τοπογραφικό score (βλέπε παράγραφο *In silico* μελέτες – Προγράμματα) είναι η γλυκοδεξτράνη του *Anthrobacter globiformis* (PDB ID: 1UG9) (Εικόνα 10). Επιπλέον, έδειξαν πως η PhK δεσμεύει ακαρβόζη<sup>1</sup>, οδηγώντας στη σταθεροποίηση μιας διαμόρφωσης του συμπλόκου, η οποία διεγείρει της δράση της κινάσης (Rimmer *et al.*, 2018). Αυτό υποδηλώνει την επικοινωνία μεταξύ των θέσεων σύνδεσης ακαρβόζης και της καταλυτικής θέσης της κινάσης (Nadeau *et al.*, 2010).



**Εικόνα 10** Προβλεπόμενη 3D δομή της α υπομονάδας της PhK, που βασίζεται στη δομή συμπλόκου γλυκοδεξτράνης του *Anthrobacter globiformis* με ακαρβόζη (PDB ID: 1ULV). Με μπλε/γκρι χρωματίζονται τα αμινοξέα 1-436 (πιθανή περιοχή γλυκοαμυλάσης). Με κόκκινο χρωματίζονται τα καταλυτικά αμινοξέα (Glu185, Glu371) (Rimmer *et al.*, 2017).

<sup>1</sup> Ψευδοτετρασακχαρίτης. Αναστέλλει τη δράση των α – γλυκοσιδασών (Nadeau *et al.*, 2010)



#### 1.2.4. Ασθένειες αποθήκευσης γλυκογόνου (Γλυκογονιάσεις)

Η επίλυση της δομής της προβλεπόμενης περιοχής γλυκοαμυλάσης της υπομονάδας α της ΡhΚ, θα μπορούσε να συμβάλλει στη βαθύτερη κατανόηση της λειτουργίας της και να προσφέρει στη διάγνωση και στη διαχείριση των ασθενειών αποθήκευσης του γλυκογόνου (Pallen, 2003).

Οι ασθένειες αποθήκευσης του γλυκογόνου (GSD), γνωστές και ως γλυκογονιάσεις, προκαλούνται από μεταλλάξεις οι οποίες συμβαίνουν στα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου, διαταράσσοντας είτε τη σύνθεση ή την αποικοδόμησή του. Επιπλέον, και κάποιες μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα του γλυκολιτικού κύκλου έχουν συσχετιστεί με τις γλυκογονιάσεις (Adeva-Andany, González-Lucán, Donapetry-García, Fernández-Fernández, & Ameneiros-Rodríguez, 2016).

Στον πίνακα παρατίθενται οι διαταραχές του μεταβολισμού του γλυκογόνου που σχετίζονται με τις υπομονάδες της ΡhΚ, καθώς επίσης το υπεύθυνο γονίδιο και η εμπλεκόμενη πρωτεΐνη, ο τρόπος κληρονόμησης και το κύριο σύμπτωμα (**Πίνακας 1**). Οι μοριακές αλλαγές που συμβαίνουν στις περισσότερες υπομονάδες της ΡhΚ προκαλούν ανεπαρκή δραστηριότητα της κινάσης στους συγκεκριμένους ιστούς όπου εκφράζεται η υπομονάδα, εμποδίζοντας την απελευθέρωση της γλυκόζης από το γλυκογόνο σε αυτούς τους ιστούς (Adeva-Andany et al., 2016).

**Πίνακας 1** Γλυκογονιάσεις που προκαλούνται από μεταλλάξεις στις υπομονάδες της PhK (Adeva-Andany *et al.*, 2016)

Ασθένεια GSD	Πρωτεΐνη	Γονίδιο	Τρόπος Κληρονομής	Σύμπτωμα
<b>IX (ανεπάρκεια της σκελετικής μυϊκής PhK)</b>	α υπομονάδα της σκελετικής μυϊκής ισομορφής της PhK	PHKA1	Συνδεδεμένο με το X Υπολειπόμενο	Ανεπαρκής γλυκογενόλυση στους σκελετικούς μυς
<b>IXa (ανεπάρκεια της ηπατικής PhK)</b>	α υπομονάδα της ηπατικής ισομορφής της PhK	PHKA2	Συνδεδεμένο με το X Υπολειπόμενο	Ανεπαρκής γλυκογενόλυση στο ήπαρ
<b>IXb (ανεπάρκεια της β υπομονάδας της PhK)</b>	β υπομονάδα της PhK	PHKB	Αυτοσωμικό υπολειπόμενο	Ανεπαρκής γλυκογενόλυση στους σκελετικούς μυς και στο ήπαρ
<b>IXc (ανεπάρκεια της γ υπομονάδας της ηπατικής ισομορφής της PhK)</b>	γ υπομονάδα της ηπατικής ισομορφής της PhK	PHKG2	Αυτοσωμικό υπολειπόμενο	Ανεπαρκής γλυκογενόλυση στο ήπαρ

#### 1.2.4.1. *Ανεπάρκεια PhK λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο PHKA1 (GSD IX)*

Η συγγενής ανεπάρκεια της σκελετικής μυϊκής α υπομονάδας της PhK (PHKA1) είναι μια διαταραχή συνδεδεμένη με το X χρωμόσωμα που οδηγεί σε ελάττωση της διάσπασης του γλυκογόνου στους σκελετικούς μυς εξαιτίας της μείωσης ενεργοποίησης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Ο φαινότυπος της ασθένειας GSD IX χαρακτηρίζεται από ήπια μυοπάθεια με μια ελαφριά αύξηση της συγκέντρωσης της κινάσης της κρεατίνης στο πλάσμα, αλλά και της περιεκτικότητας του γλυκογόνου στους μυς (Ørngreen *et al.*, 2008). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PHKA1 μπορεί επίσης να επιφέρουν νοητική εξασθένηση χωρίς εμφανή συμπτώματα μυοπάθειας (Echaniz-Laguna *et al.*, 2010).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι μεταλλάξεις του γονιδίου PHKA1 που σχετίζονται με την ασθένεια GSD τύπου IX παρατίθενται παρακάτω (**Πίνακας 2**).

**Πίνακας 2** Μεταλλάξεις του γονιδίου PHKA1 της μυϊκής ισομορφής της PhK που σχετίζονται με την ασθένεια GSD IX (Bruno et al., 1998; Burwinkel et al., 2003; Wehner, Clemens, Engel, & Kilimann, 1994; Wuyts et al., 2005)

Τύπος Μετάλλαξης	Θέση	Αλλαγή βάσης	Αλλαγή κωδικονίου
Παρανοηματική	Κωδικόνιο 223	GGG/AGG	Gly/Arg
Παρανοηματική	Κωδικόνιο 299	GAT/GTT	Asp/Val
Μη νοηματική	Κωδικόνιο 1112	GAT/TAG	Glu/Term
Αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης (frameshift)	Κωδικόνιο 695	delC	-
Θέσης συρραφής (+1)	5' άκρο ιντρονίου	G/C	-

### 1.3. Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών και συστήματα έκφρασης

Η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε μια εξαιρετικά καθαρή και καλά χαρακτηρισμένη μορφή αποτελεί το πρώτο και βασικότερο στάδιο ώστε να ακολουθήσουν μελέτες των βιολογικών ή φυσικοχημικών ιδιοτήτων που θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας αυτών των πρωτεϊνών στόχων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ετερόλογης έκφρασης. Ως ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών, καλείται η διαδικασία κατά την οποία γονίδια ή τμήματα γονιδίων ενός οργανισμού, εισάγονται και εκφράζονται σε κάποιον άλλον οργανισμό, που φυσιολογικά δεν τα εκφράζει. Η εισαγωγή του γονιδίου στον ξενιστή επιτυγχάνεται με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA. Αφού το γονίδιο εισαχθεί στον ξενιστή, μπορεί είτε να ενσωματωθεί στο γονιδιώμα του και να προκληθεί σταθερή έκφρασή του, ή μπορεί και να μην ενσωματωθεί στο γονιδιώμα του και η έκφραση να διαρκέσει 24- 72 ώρες (Kaur, Kumar, & Kaur, 2018).

Για την παραγωγή μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες είναι απαραίτητη η επιλογή του κατάλληλου συστήματος έκφρασης. Υπάρχει μεγάλο εύρος οργανισμών που μπορούν να αξιοποιηθούν ως συστήματα ετερόλογης έκφρασης και η επιλογή του καταλληλότερου συστήματος εξαρτάται από τον σκοπό της μελέτης. Για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν βακτήρια, ζύμες. Τα πιο γνωστά και καλύτερα μελετημένα συστήματα έκφρασης είναι της *Escherichia coli* για τα βακτηριακά συστήματα, και για τις ζύμες το *Saccharomyces cerevisiae* (Kaur et al., 2018). Κατά την ενίσχυση με PCR χρησιμοποιούνται ως μήτρα είτε γονιδιώματα προκαρυωτών, είτε DNA από cDNA

βιβλιοθήκες ευκαρυωτών. Ακολουθεί ένθεση του DNA σε έναν πλασμιδιακό φορέα ο οποίος συχνά του προσδίδει μια αλληλουχία αγκιστείας στο N-τελικό ή C-τελικό άκρο (πχ HisTag ή GST tag). Αυτό διευκολύνει τον μετέπειτα καθαρισμό της πρωτεΐνης. Συχνά γίνεται χρήση ακόμα πιο πολύπλοκων ευκαρυωτικών ξενιστών όπως κύτταρα θηλαστικών (ανθρώπου, ποντικού), φυτών, ακόμα και ιικά κύτταρα. Τέλος, υπάρχουν συστήματα *in vitro* έκφρασης πρωτεϊνών τα οποία δεν κάνουν χρήση κυττάρων, αλλά αντιγράφουν τους μηχανισμούς έκφρασης προκαρυωτών ή ευκαρυωτών. (Yokoyama, 2003).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται το βακτήριο *Escherichia coli* ως σύστημα ετερόλογης έκφρασης (βλέπε παράγραφο Ετερόλογη έκφραση – Σύστημα έκφρασης *E.coli*).

### 1.3.1. Προβλήματα κατά την ετερόλογη έκφραση

Δεν υπάρχει αμφιβολία πως η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτηριακά συστήματα έχει αποτελέσει ένα είδος επανάστασης στον τομέα της βιοτεχνολογίας. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την έκφραση και τον καθαρισμό του επιθυμητού προϊόντος σε μεγάλη ποσότητα σε μικρό χρονικό διάστημα, ώστε να ακολουθήσει ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του, η χρήση σε βιομηχανικές διεργασίες και η ανάπτυξη του ως εμπορικό αγαθό (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Θεωρητικά, φαίνεται μια απλή διαδικασία, καθώς αποτελείται από συγκεκριμένα, άμεσα στάδια. Συνοπτικά, το γονίδιο ενδιαφέροντος επιλέγεται και κλωνοποιείται σε όποιο διαθέσιμο φορέα, μετασχηματίζονται τα κύτταρα- ξενιστές, γίνεται η επαγωγή και η πρωτεΐνη είναι έτοιμη για καθαρισμό και χαρακτηρισμό. Στην πράξη, ωστόσο, τα πράγματα είναι τελείως διαφορετικά. Κατά τη διάρκεια του πειράματος μπορεί να προκύψουν διάφορα προβλήματα, όπως μικρή ανάπτυξη του ξενιστή, σχηματισμός έγκλειστων σωματίων, ή και να μη ληφθεί καθόλου πρωτεϊνικό προϊόν. Ένας λόγος της απουσίας προϊόντος είναι η αποικοδόμησή του από πρωτεάσες πριν τις πρώτες πειραματικές μετρήσεις της έκφρασης. Η παρουσίαση και αντιμετώπιση προβλημάτων κατά την ετερόλογη έκφραση είναι μια σύνθετη πρόκληση, καθώς είναι αδύνατο να προβλεφθούν οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης μόνο με βάση την πρωτοταγή ακολουθία της πρωτεΐνης (Duong-Ly & Gabelli, 2014b). Ακόμα και η πολύ προσεκτική επιλογή φορέα και συστήματος έκφρασης δεν μπορεί να εγγυηθεί πως η πρωτεΐνη πρόκειται να ληφθεί σε μεγάλα ποσά και στη διαλυτή ενεργή μορφή της, καθώς υπάρχουν διάφορες καταστάσεις που εμποδίζουν αυτόν τον στόχο και συμβαίνουν πολύ συχνά (Rosano & Ceccarelli, 2014).

### 1.3.1.1. Μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης

Πιο συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις όπου παρατηρείται μειωμένη ή και καθόλου έκφραση του πρωτεϊνικού προϊόντος, αυτό υποδηλώνει πως το μόριο μπορεί να είναι τοξικό για τα κύτταρα ή να εκδήλωσε τοξικότητα μετά την επαγωγή με IPTG. Γενικά, το πρόβλημα της πρωτεϊνικής τοξικότητας μπορεί να προκύψει όταν η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκτελεί μια μη αναγκαία και επιβλαβή λειτουργία στο κύτταρο-ξενιστή, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται ο φυσιολογικός πολλαπλασιασμός του, να μειώνονται τα επίπεδα αύξησής του και τελικά, να επέρχεται κυτταρικός θάνατος (Doherty, Connolly, & Worrall, 1993; Dong, Nilsson, & Kurland, 1995). Επιπρόσθετα, η μειωμένη – στην καλύτερη περίπτωση – έκφραση της πρωτεΐνης μπορεί να είναι αποτέλεσμα του προβλήματος “codon biasing”. Η ανεπάρκεια των κατάλληλων tRNA μπορεί να οδηγήσει λανθασμένη ενσωμάτωση αμινοξέων, ή σε περικοπή του πολυπεπτιδίου, επηρεάζοντας τα επίπεδα έκφρασης και τη δραστικότητα της πρωτεΐνης (Gustafsson, Govindarajan, & Minshull, 2004).

### 1.3.1.2. Πρωτεϊνική αδράνεια

Η απουσία δραστικότητας μιας πρωτεΐνης μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι η λάθος αναδίπλωση στην περιοχή του ενεργού κέντρου. Αυτό δεν αναιρεί το γεγονός της ορθής αναδίπλωσης και της υιοθέτησης σταθερής, διαλυτής μορφής, αλλά καθιστά την πρωτεΐνη μη δραστική. Επιπλέον, ο σχηματισμός εσφαλμένων δισουλφιδικών δεσμών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την πρωτεϊνική αδράνεια (Kurokawa, Yanagi, & Yura, 2000). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση στην οποία το κύτταρο-ξενιστής «αναγνωρίζει» πως η ετερόλογη πρωτεΐνη είναι τοξική και προβαίνει σε αναδιοργάνωση του πλασμιδίου με επακόλουθη την πιθανή απώλεια λειτουργίας του, ώστε το ίδιο να επιβιώσει. Οποιαδήποτε σημειακή μετάλλαξη μπορεί να εξηγήσει τη χαμηλή δραστικότητα ενός καθαρού ανασυνδυασμένου πρωτεϊνικού προϊόντος (Corchero & Villaverde, 1998; Palomares, Estrada-Mondaca, & Ramírez, 2004).

### 1.3.1.3. Διαλυτότητα

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών παραμένει ένας σοβαρός περιορισμός για τους δομικούς βιολόγους, τις φαρμακευτικές βιομηχανίες και όλους τους σχετικούς επιστήμονες που μελετάνε πρωτεΐνες μέσα σε διάλυμα. Τόσο οι δομικές μελέτες, όσο και οι φαρμακευτικές εφαρμογές απαιτούν πολύ υψηλής συγκέντρωσης πρωτεϊνικά δείγματα. Ωστόσο, τις περισσότερες φορές, η διαλυτότητα των πρωτεϊνών

κυμαίνεται από μηδενική έως κάποια εκατοντάδες χιλιοστογραμμάρια ανά χιλιοστόλιτρο (Kramer, Shende, Motl, Pace, & Scholtz, 2012).

Η διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης είναι μια θερμοδυναμική παράμετρος που ορίζεται ως η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε ένα κορεσμένο διάλυμα η οποία βρίσκεται σε ισορροπία με τη στερεή της φάση, π.χ. κρυσταλλική ή άμορφη, υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Arakawa & Timasheff, 1985). Μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες.

Οι εξωγενείς παράγοντες, των οποίων η μεταβολή μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη διαλυτότητα ενός πρωτεϊνικού μορίου, είναι το pH του διαλύματος, η ιοντική ισχύς, η θερμοκρασία και η παρουσία διάφορων διαλυτών προσθέτων (Bagby, Tong, & Ikura, 2001; Fowler et al., 2005). Ωστόσο, οι αλλαγές στις συνθήκες διάλυσης δεν είναι πάντοτε κατάλληλες ή επαρκείς για την αύξηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης στο βαθμό που απαιτείται (Bagby et al., 2001; Middaugh & Volkin, 1992).

Από την άλλη, οι ενδογενείς παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα της πρωτεΐνης αφορούν κατά κύριο λόγο τα αμινοξέα που βρίσκονται στην επιφάνεια του μορίου. Όμως, δεν έχει κατανοηθεί ακόμα λεπτομερώς ο τρόπος με τον οποίο μπορούν να τροποποιηθούν οι εγγενείς ιδιότητες μιας πρωτεΐνης με σκοπό να αυξηθεί η διαλυτότητά της (Bagby et al., 2001; Middaugh & Volkin, 1992).

Εάν κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης διαπιστωθεί πως δεν υπάρχει καθόλου πρωτεΐνη σε διαλυτή μορφή, τότε συστήνεται να ελεγχθεί η ύπαρξη έγκλειστων σωματίων (Duong-Ly & Gabelli, 2014b).

#### 1.3.1.4. Έγκλειστα σωματίια (*Inclusion Bodies*)

Ένα από τα πιο σημαντικά και δισεπίλυτα προβλήματα που μπορεί να παρατηρηθούν σε μελέτες ετερόλογης έκφρασης είναι ο σχηματισμός έγκλειστων σωματίων (*inclusion bodies*, IBs) που αποτελούν μη κρυσταλλικές, άμορφες δομές.

Το νεοσυντιθέμενο πολυπεπτίδιο εκφράζεται στο μικροπεριβάλλον της *E.coli*, το οποίο μπορεί να διαφέρει από το φυσικό του μικροπεριβάλλον όσον αφορά το pH, την ωσμωτικότητα, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, τους συμπαράγοντες και τους μηχανισμούς αναδίπλωσης. Επιπλέον, κατά την έκφραση σε υψηλά επίπεδα, οι υδρόφοβες εκτάσεις του πολυπεπτιδίου βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση και αυξάνονται οι πιθανότητες να αλληλεπιδράσουν με παρόμοιές τους. Όλοι αυτοί οι παράγοντες οδηγούν σε αστάθεια και συσσωμάτωση των πρωτεϊνών (Carrío & Villaverde, 2002; Hartley & Kane, 1988). Τα πρωτεϊνικά συσσωμάτωματα είναι γνωστά ως έγκλειστα σωματίια (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Επιπρόσθετα, έγκλειστα σωματίια μπορεί να σχηματιστούν εξαιτίας λανθασμένου σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών. Για πολλές ανασυνδυασμένες

πρωτεΐνες, ο σχηματισμός σωστών δισουλφιδικών δεσμών είναι ζωτικής σημασίας ώστε να διατηρήσουν την βιολογικά ενεργή τρισδιάστατη δομή τους. Ο σχηματισμός λανθασμένων δισουλφιδικών δεσμών μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη αναδίπλωση πρωτεΐνης που συνεπάγεται συσσωμάτωση σε IBs (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Τέλος, ο σχηματισμός έγκλειστων σωματίων είναι αποτέλεσμα της λανθασμένης αναδίπλωσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ως συνέπεια του γεγονότος ότι στους προκαρυωτικούς οργανισμούς η αναδίπλωση ολοκληρώνεται μετά το πέρας της μετάφρασης ενώ στους ευκαρυωτικούς η αλυσίδα αναδιπλώνεται παράλληλα επιτρέποντας έτσι τη διαδοχική αναδίπλωση των ξεχωριστών δομικών περιοχών και την παραγωγή ενός ορθά αναδιπλωμένου μακρομορίου (Price & Stevens, 1999)

### 1.3.2. Τρόποι αύξησης της διαλυτότητας

Η επιτυχία των μελετών πρωτεϊνικής υπερέκφρασης πολλές φορές παρεμποδίζεται από την αδιαλυτότητα της εκφρασμένης πρωτεΐνης και τον επακόλουθο σχηματισμό έγκλειστων σωματίων. Για να επιτευχθεί καλύτερο ποσοστό διαλυτότητας πρώτα ελέγχονται οι διάφορες εναλλακτικές τόσο στο φορέα όσο και στην αξιοποίηση των διάφορων κυτταρικών σειρών. Επίσης, είναι δυνατό να εφαρμοστούν συνθήκες που μειώνουν τον ρυθμό σύνθεσης πρωτεϊνών και επομένως και τον σχηματισμό έγκλειστων σωματίων και οι οποίες θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη μεγιστοποίηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης (Duong-Ly & Gabelli, 2014b). Παρακάτω παρατίθενται κάποιες επιπλέον προσεγγίσεις μέσω των οποίων θα μπορούσε να αυξηθεί η πιθανότητα μια πρωτεΐνη να είναι διαλυτή.

#### A. Αλλαγή της θερμοκρασίας κάτω από την οποία γίνεται η επαγωγή.

Τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, έχουν χαμηλότερους μεταβολικούς ρυθμούς και επομένως πιο αργό ρυθμό της πρωτεϊνικής σύνθεσης από τον προβλεπόμενο, «προστατεύοντας» έτσι από τον κορεσμό εξαιτίας της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Φαίνεται πως η μείωση της θερμοκρασίας έκφρασης αποτελεί μάλλον τον πιο εύκολο και πετυχημένο τρόπο λήψης ενός πρωτεϊνικού προϊόντος στη διαλυτή του μορφή (Duong-Ly & Gabelli, 2014a).

#### B. Βελτιστοποίηση του ποσού του IPTG που χρησιμοποιείται στην επαγωγή.

Γενικά, για την επαγωγή μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες συγκεντρώσεις IPTG (0.05- 2 mM). Ωστόσο, χαμηλότερες συγκεντρώσεις του επαγωγέα φαίνεται πως συνεπάγονται μείωση του ρυθμού της πρωτεϊνικής σύνθεσης, κάτι που ευνοεί την καλύτερη αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Picaud *et al.*, 2007; Terpe, 2006). Ο έλεγχος λοιπόν, της βέλτιστης συγκέντρωσης του IPTG, αλλά και του χρονικού διαστήματος

που θα γίνεται η επαγωγή είναι απαραίτητος για τη βελτίωση της διαλυτότητας των πρωτεϊνών (Duong-Ly & Gabelli, 2014a).

#### Γ. Προσθήκη υποστρώματος, προσδετών ή συμπαραγόντων κατά τη διάρκεια της επαγωγής.

Η παρουσία υποστρώματος, προσδετών ή συμπαραγόντων κατά τη χρονική περίοδο της επαγωγής φαίνεται να προωθεί την παραγωγή διαλυτού προϊόντος. Η σύνδεση της πρωτεΐνης-στόχου με τους προσδέτες της οδηγεί στο σχηματισμό ενός πιο σταθερού συμπλόκου. Καθώς, η υψηλότερη σταθερότητα σχετίζεται αναλογικά με υψηλότερες θερμοκρασίες τήξης ( $T_m$ ), η αξιοποίηση κάθε μέσου που αυξάνει το  $T_m$  είναι χρήσιμη (Duong-Ly & Gabelli, 2014a).

#### Δ. Συνέκφραση με μοριακούς συνοδούς (chaperones)

Είναι γνωστό πως η *in vivo* αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι μια ενεργοεξαρτώμενη διαδικασία και απαιτεί τη μεσολάβηση των μοριακών chaperones και των καταλυτών αναδίπλωσης. Η αύξηση της συγκέντρωσης όλων ή κάποιων από τους ειδικούς ρυθμιστές της αναδίπλωσης θα μπορούσε να διευκολύνει την παραγωγή και την απομόνωση ετερόλογων πρωτεϊνών (Thomas, Ayling, & Baneyx, 1997). Υπάρχουν ωστόσο μελέτες που ισχυρίζονται πως αυτή η μέθοδος δεν είναι τόσο αποτελεσματική (De Marco & De Marco, 2004; Gräslund et al., 2008).

#### Ε. Έκφραση τμήματος της πρωτεΐνης –στόχου

Το μήκος της μοριακής κατασκευής (construct) είναι η μοναδική μεταβλητή που μπορεί να επηρεάσει αποτελεσματικά τη διαλυτότητα. Η έκφραση επιμέρους τομέων μπορεί να είναι μια εναλλακτική λύση στην έκφραση ολόκληρης της πρωτεΐνης (Duong-Ly & Gabelli, 2014a).

#### ΣΤ. Μεταλλαξιγένεση της πρωτεΐνης.

Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει πως μερικές φορές μια μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης μπορεί να είναι πιο διαλυτή (Chen et al., 2000; Dyda et al., 1994; Jenkins et al., 1995). Η μεταλλαξιγένεση μπορεί να είναι τυχαία ή κατευθυνόμενη (Duong-Ly & Gabelli, 2014a).

#### *1.3.2.1. Στοχευμένες (site directed) μεταλλάξεις για αύξηση της διαλυτότητας*

Η στοχευμένη μεταλλαξιγένεση είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην αντίδραση PCR και στοχεύει στη μετάλλαξη συγκεκριμένων νουκλεοτιδίων μιας αλληλουχίας που έχει εντεθεί σε ένα πλασμιδιακό φορέα. Η τεχνική επιτρέπει την μελέτη της σχετικής σημασίας που έχει ένα συγκεκριμένο αμινοξύ στη δομή και της λειτουργίας του πρωτεϊνικού μορίου (Bachman, 2013). Επιπλέον, τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, έχει χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό γονιδίων, σχέσεων δομής και



λειτουργίας μιας πρωτεΐνης, αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, διάφορων περιοχών δέσμησης πάνω σε μια πρωτεΐνη, καθώς και των ενεργών κέντρων των ενζύμων (Carrigan, Ballar, & Tuzmen, 2011).

Έχουν γίνει διάφορες έρευνες όπου εξετάζονται οι εσωτερικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης και μελετάται πώς ένα αμινοξύ που βρίσκεται στην επιφάνεια μιας αναδιπλωμένης πρωτεΐνης επηρεάζει τη διαλυτότητά της (Fowler et al., 2005; Trevino, Scholtz, & Pace, 2007). Έχει δειχθεί πως τα αποτελέσματα των στοχευμένων μεταλλάξεων στο ρυθμό συσσωμάτωσης των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών μπορούν να συσχετιστούν με αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες όπως η υδροφοβικότητα και το φορτίο (Chiti, Stefani, Taddei, Ramponi, & Dobson, 2003). Επίσης, σε αρκετές μελέτες επιτεύχθηκε η αύξηση της διαλυτότητας έπειτα από στοχευμένη μεταλλαξιγένεση επιφανειακών καταλοίπων (Avramopoulou, Mamalaki, and Tzartos 2004; Dale et al. 1994; Mosavi and Peng 2003). Ωστόσο, δεν υπάρχουν γενικοί κανόνες, πειραματικά αποδεδειγμένοι, για την στοχευμένη μεταλλαξιγένεση με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας (Bagby et al., 2001; Mosavi & Peng, 2003).

Η εισαγωγή μεταλλάξεων που αντικαθιστούν ένα υδρόφοβο από ένα υδρόφιλο αποτελεί τη γενικότερη προσέγγιση για την επίλυση των προβλημάτων διαλυτότητας (Avramopoulou, Mamalaki, and Tzartos 2004; Dale et al. 1994; Fowler et al. 2005). Βέβαια, αυτή η προσέγγιση παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Πρώτον, είναι δύσκολο να ακολουθηθεί αν είναι άγνωστη η δομή της πρωτεΐνης. Επιπλέον, σπάνια τα υδρόφοβα κατάλοιπα βρίσκονται στην επιφάνεια μιας πρωτεΐνης. Αν από την άλλη, επιχειρηθεί η αντικατάσταση εσωτερικού υδρόφοβου αμινοξέος με ένα υδρόφιλο, αυτό θα μπορούσε να μειώσει την σταθερότητα της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, χωρίς απαραίτητα να δώσει και τα επιθυμητά αποτελέσματα σε ό,τι αφορά τη διαλυτότητα (Trevino, Scholtz, & Pace, 2008a).

Εξαιτίας των παραπάνω, μια άλλη τακτική είναι η πρόκληση μεταλλάξεων που μετατρέπουν ένα υδρόφιλο επιφανειακό κατάλοιπο σε περισσότερο υδρόφιλο. Η προσέγγιση αυτή προτάθηκε έπειτα από μελέτη όπου εξετάστηκε η αντικατάσταση ενός εκτεθειμένου καταλοίπου και από τα είκοσι αμινοξέα. Το συμπέρασμα ήταν πως κάποια από τα υδρόφιλα αμινοξέα όπως το ασπαρτικό οξύ (Asp), το γλουταμινικό οξύ (Glu) και η σερίνη (Ser) συμβάλλουν πολύ περισσότερο στη διαλυτότητα της πρωτεΐνης σε σχέση με άλλα υδρόφιλα όπως η ασπαραγίνη (Asn), η γλουταμίνη (Gln) και η θρεονίνη (Thr). Στην ίδια μελέτη, προτείνεται πως η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί και σε περιπτώσεις όπου η δομή είναι άγνωστη, αρκεί να στοχευθούν τα αμινοξέα Asn, Gln και Thr και να αντικατασταθούν από Asp, Glu και Ser (Trevino et al., 2008a).

## 2. Σκοπός

---

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) καταλύει την ασβεστο-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και επομένως διεγείρει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου προς σχηματισμό 1- φωσφορικής γλυκόζης. Η μυϊκή ισομορφή της PhK ήταν η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που αναγνωρίστηκε, απομονώθηκε και καθορίστηκαν η δραστηριότητα και οι φυσικοχημικές της ιδιότητες.

Η PhK είναι από τις μεγαλύτερες και πιο περίπλοκες πρωτεϊνικές κινάσες, αποτελώντας ένα δεκαεξιμερές σύμπλοκο (αβγδ)<sub>4</sub>. Οι υπομονάδες α, β και δ είναι ρυθμιστικές, ενώ η γ είναι η καταλυτική υπομονάδα. Μέχρι σήμερα, έχουν προσδιοριστεί οι δομές του ολοενζύμου σε ευκρίνεια 9.9Å, καθώς και του κολοβωμένου τμήματος της γ καταλυτικής υπομονάδας, και της δ υπομονάδας. Αντίθετα, για τις ομόλογες α και β ρυθμιστικές υπομονάδες δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα όσον αφορά τη δομή τους.

Διάφορες μελέτες βιοπληροφορικής έχουν υποστηρίξει πως η αμινοτελική περιοχή της PhKα είναι επικράτεια γλυκοαμυλάσης. Αυτή η πρόταση καταρρίπτει πως η PhK είναι ρυθμιστικό ένζυμο και το καθιερώνει ως ένα πολυλειτουργικό ένζυμο με καταβολικές και ρυθμιστικές ιδιότητες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι αρχικά, η αναγνώριση, μέσω *in silico* μελέτης, και η ετερόλογη έκφραση της προβλεπόμενης αμινοτελικής επικράτειας γλυκοαμυλάσης της α υπομονάδας μυϊκής ισομορφής της PhK. Σε δεύτερη φάση, σχεδιάζονται εκκινητές για την πραγματοποίηση στοχευμένων μεταλλάξεων ώστε το μετάλλαγμα να έχει πιο αυξημένες πιθανότητες διαλυτότητας.

Η επίτευξη έκφρασης της επικράτειας γλυκοαμυλάσης της PhKα σε διαλυτή μορφή θα συμβάλλει στην επίλυση της δομής του ολοενζύμου της μυϊκής ισομορφής της PhK. Επακόλουθα, αυτό θα έχει αντίκτυπο στη διερεύνηση της ανθρώπινης μυϊκής PhK ως μοριακού στόχου, πιθανού φαρμακολογικού ενδιαφέροντος, για την αντιμετώπιση ασθενειών σχετιζόμενων με διαταραχές του μεταβολισμού των υδατανθράκων.

## 3. Υλικά - Οργανολογία

---

### 3.1. Υλικά

#### 3.1.1. Αντιδραστήρια

Acetic Acid	Scharlau
Acrylamide	SERVA
Agarose	SIGMA
Ammonium Persulfate (APS)	SERVA
Ampicillin	SERVA
N'N' methylene- bis Acrylamide	SERVA
Chloramphenicol	SIGMA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Merck
Ethanol Absolute	SIGMA
Glycerol	Appllichem
Glycine	SERVA
Hydrochloric Acid (HCl)	Merck
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	SERVA
LB Broth	Appllichem
LB Agar	SIGMA
Mark 12 Unstained Standard	Invitrogen

Methanol	Applichem
PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)	Applichem
RTU DNA Ladder	Nippon Genetics
Sodium dodecyl Sulfate (SDS)	SERVA
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	Invitrogen
Tris Base	Applichem

### 3.1.2. Βακτηριακά στελέχη

#### 3.1.2.1. Βακτηριακά στελέχη για υπερέκφραση πρωτεϊνών

BL21 – Gold (DE3)	Agilent Technologies
B834 (DE3) pLySs	Novagen

Τα βακτηριακά κύτταρα BL21 – Gold (DE3) είναι ειδική για την άμεση έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα, καθώς χρησιμοποιούν τον εκκινητή της T7 πολυμεράσης. Επίσης, είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να απουσιάζουν οι πρωτεάσες *Lon* και *OmpT*, οι οποίες θα μπορούσαν να υποβιβάσουν την έκφραση (Phillips et al., 1984). Τέλος, περιέχουν επιπλέον κωδικόνια, που σπάνια χρησιμοποιούνται από την *E.coli*, επιτρέποντας την έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών με μεγάλο ποσοστό rare codon (Agilent Technologies).

Το στέλεχος B834 είναι συγγενικό του BL21 – Gold. Το B834pLySs είναι όμοιο με το B834 αλλά διαθέτει το επιπλέον πλασμίδιο pLySs. Έτσι επιτυγχάνεται καλύτερος έλεγχος της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Περιέχει ακόμη γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη (Cam) (Novagen).

### 3.1.2.2. Βακτηριακά στελέχη για κλωνοποίηση και υπερέκφραση πλασμιδιακών φορέων

XL1 – Blue

Agilent Technologies

Το στέλεχος έχει τροποποιηθεί ειδικά, ώστε να είναι ελεύθερο ενδονουκλεασών (endA). Έτσι, βελτιώνεται η απόδοση του μετασχηματισμού και η αναπαραγωγή των πλασμιδιακών φορέων (Agilent Technologies).

### 3.1.3. Πλασμιδιακοί Φορείς

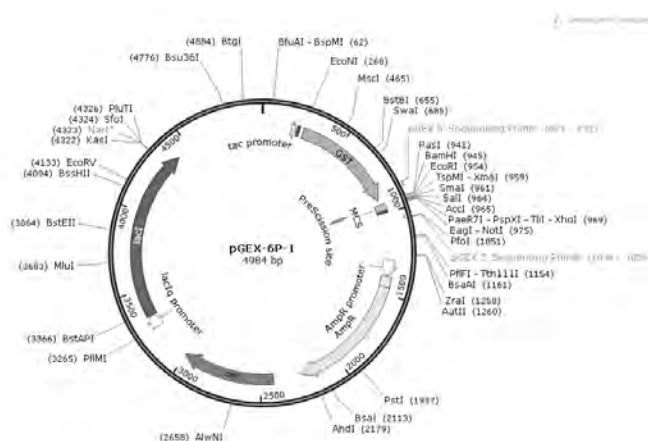
pGEX – 6p – 1

GE healthcare

pATHRA

Εργαστήριο ΔΛΒ

Ο φορέας pGEX-6P-1 έχει μήκος 4984bp και διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Αμπικιλίνη (Amp<sup>r</sup>). Ο φορέας περιέχει προαγωγέα tac, ώστε να είναι δυνατή η χημική επαγωγή με μεγάλη απόδοση της έκφρασης και παραγωγή της πρωτεΐνης προς μελέτη. Επίσης, είναι εφοδιασμένος με τον κατάλληλο επίτοπο ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να εκφράζεται συγχωνευμένη με την τρανσφεράση της S-γλουταθειόνης (GST) μέσω του πρωτεολυτικού κέντρου (LEVLFQGP) που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση Rhinovirus 3C (PreScission Protease). Οι πρωτεΐνες που είναι συζευγμένες με GST απομονώνονται εύκολα με τη χρήση συμπλέγματος σεφαρόζης 4B με γλουταθειόνη. Η GST αποκόπτεται από την πρωτεΐνη μέσω της πρωτεάσης PreScission Protease που κόβει μεταξύ της GST και του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου (GE Healthcare).



Εικόνα 11 Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pGEX-6P-1

Ο φορέας pATHRA είναι αποτέλεσμα μικρών αλλαγών του φορέα pET-15b. Έχει μήκος 5708bp και διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Αμπικιλίνη (Amp). Ο φορέας περιέχει προαγωγέα lac, ώστε να είναι δυνατή η χημική επαγωγή με μεγάλη απόδοση της έκφρασης και παραγωγή της πρωτεΐνης προς μελέτη. Επίσης, είναι εφοδιασμένος με ετικέτα αγκιστείας 6X-His στο αμινοτελικό άκρο, η οποία ακολουθείται από θέση που αναγνωρίζει η PreScission Protease και από δύο θέσεις κλωνοποίησης (**Εικόνα 12**).



**Εικόνα 12** Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pATHRA

### 3.1.4. Ένζυμα

EcoRI

Takara

XhoI

New England Biolabs (NEB)

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα kit :

PCR

Kapa Biosystems

In- fusion

Takara

Plasmid isolation

Macherey – Nagel

DNA gel extraction

Macherey – Nagel

### 3.2. Όργανα

Αυτόματες πιπέτες	Gilson
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini PROTEAN® Tetra Cell	BioRad
Μετρητής pH	Metrohm
Φυγόκεντροι	Eppendorf
Φασματοφωτόμετρο ορατού- υπεριώδους UV 1600-PC	VWR
Heat Block	Thermoleader

Τα όργανα ήταν κατά κύριο λόγο διαθέσιμα στο Εργαστήριο Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς επίσης και στους κοινόχρηστους χώρους του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## 4. Μεθοδολογία

---

### 4.1. *In silico* μελέτη

#### 4.1.1. Πρόβλεψη επικρατειών (Domain Prediction)

Για την αναγνώριση της επικράτειας γλυκοαμυλάσης της PhKa έγινε πρόβλεψη επικρατειών με τα προγράμματα

- NCBI's Conserved Domain Database (CDD) (Marchler-Bauer et al., 2017)
- InterPro (Finn et al., 2017).

χρησιμοποιώντας την αλληλουχία της hPhKa.

#### 4.1.2. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής (Secondary Structure Prediction)

Για την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα

- I – TASSER (Roy, Kucukural, & Zhang, 2010; Yang et al., 2015; Y. Zhang, 2008)

εισάγοντας την αμινοξική αλληλουχία που αντιστοιχεί στην προβλεπόμενη περιοχή GH1 της PhKa.

Το αποτέλεσμα της πρόβλεψης κατευθύνει την στόχευση των αμινοξέων προς μετάλλαξη, καθώς γίνεται γνωστό αν το αμινοξύ- στόχος βρίσκεται σε  $\alpha$ -έλικα,  $\beta$ -φύλλο ή σε βρόχο.

#### 4.1.3. Μοντελοποίηση ομολογίας (homology modeling) - Threading

Για την κατασκευή τρισδιάστατου μοντέλου που βασίζεται στην ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης- στόχου με ήδη γνωστές, καταχωρημένες πρωτεΐνες, καθώς και στη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης και στη σύγκριση αυτής με ήδη γνωστά, καταχωρημένα δομικά μοντέλα (threading), χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα

- I – TASSER



Η αναγνώριση αναδίπλωσης, ή αλλιώς threading, είναι μια μέθοδος μοντελοποίησης για πρωτεΐνες που να μην παρουσιάζουν την ίδια αναδίπλωση με πρωτεΐνες που είναι γνωστή η δομή τους, ωστόσο όμως, δεν είναι ομόλογες σε πρωτεΐνες γνωστής δομής. Η πρόβλεψη του μοντέλου γίνεται μέσω threading κάθε αμινοξέος της αλληλουχίας-στόχου προς την αλληλουχία πρότυπης πρωτεΐνης (template), και στη συνέχεια αξιολογείται πόσο καλά ταιριάζουν η πρωτεΐνη-στόχος με την πρωτεΐνη-πρότυπο. Αφού επιλεγθεί το καλύτερο template, το δομικό μοντέλο της ακολουθίας κατασκευάζεται με βάση την στοίχιση με αυτό το template.

#### 4.1.4. Πρόβλεψη διαλυτότητας

Για τον υπολογισμό της διαλυτότητας με βάση την αλληλουχία του τμήματος της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί στην στην προβλεπόμενη περιοχή GH1 της PhKa, χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα

- ProteinSol (Hebditch, Carballo-Amador, Charonis, Curtis, & Warwicker, 2017)
- CamSol Intrinsic (Sormanni, Amery, Ekizoglou, Vendruscolo, & Popovic, 2017; Sormanni, Aprile, & Vendruscolo, 2015)

#### 4.1.5. Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (Multiple Sequencing Alignment, MSA)

Η αμινοξική αλληλουχία της PhKa<sub>trnc</sub> στοιχήθηκε με τις αλληλουχίες των πρωτεϊνών που προτάθηκαν από το threading, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα

- CLUSTAL OMEGA (McWilliam et al., 2013; Sievers et al., 2011)

Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατός ο εντοπισμός των συντηρημένων αμινοξέων, των καταλυτικών αμινοξέων, καθώς και των αμινοξέων που συμμετέχουν στη δέσμευση του προσδέτη. Επιπλέον, εντοπίζονται τα αμινοξέα που πιθανώς εμπλέκονται στις ασθένειες GSD.

#### 4.1.6. Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων

Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των αμινοξέων της PhKa<sub>trnc</sub> παρατηρήθηκαν κατά την εφαρμογή του προγράμματος Coot. Με χρήση του Coot εξετάστηκε και το ενδεχόμενο οι στοχευμένες μεταλλάξεις να άλλαζαν δραματικά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων που συμμετέχουν στην κατάλυση ή τη δέσμευση του προσδέτη (Emsley, Lohkamp, Scott, & Cowtan, 2010).

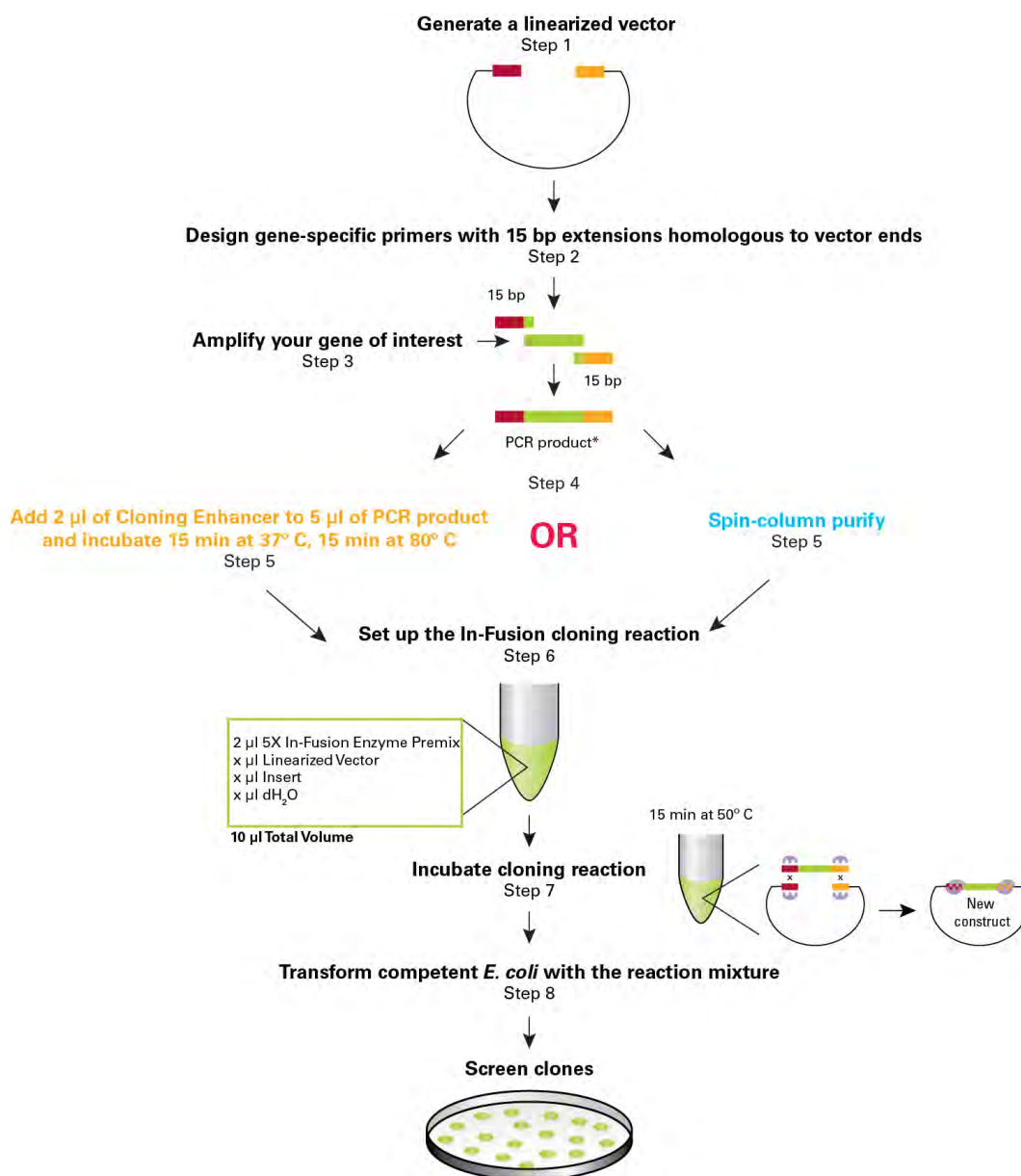
## 4.2. Κλωνοποίηση με τη μέθοδο In – fusion ®

Για την κλωνοποίηση του τμήματος που αντιστοιχεί στην περιοχή GH1 της ΡhΚα (ΡhΚα<sub>trnc</sub>) στους φορείς pGEX-6P-1 και pATHRA, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του In-fusion HD cloning kit της εταιρείας Clontech. Ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το βελτιστοποιημένο για έκφραση γονίδιο ΡΗΚΑ1 (GenScript). Το πρωτόκολλο αυτό είναι σχεδιασμένο για γρήγορη και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση ενός ή περισσότερων τμημάτων DNA σε έναν φορέα. Χρησιμοποιεί το ένζυμο In-Fusion, το οποίο συνδέει τμήματα DNA μεταξύ τους (όπως είναι ένα προϊόν PCR και ένας ευθυγραμμισμένος πλασμιδιακός φορέας) τα οποία έχουν μια αλληλοεπικάλυψη 15bp στα άκρα τους, με ακρίβεια και με το σωστό προσανατολισμό. Αυτή η αλληλοεπικάλυψη μπορεί να δημιουργηθεί κατά το σχεδιασμό των εκκινητών για την αντίδραση της PCR.

Τα βήματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την κλωνοποίηση ήταν τα εξής:

1. Αντίδραση PCR για την ενίσχυση του τμήματος που θα κλωνοποιηθεί χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA το cDNA του βελτιστοποιημένου γονιδίου ΡΗΚΑ1 με τους ειδικούς In-Fusion εκκινητές
2. Πέψη των φορέων pGEX-6P-1 και pATHRA με τις ειδικές ενδονουκλεάσες περιορισμού, EcoRI και XhoI, αντίστοιχα. Έχει εξασφαλιστεί πως ο φορέας μόνο μια θέση αναγνώρισης στην περιοχή πολυσυνδέτη για τη συγκεκριμένη ενδονουκλεάση έτσι ώστε να γίνει γραμμικός και όχι να κατακερματιστεί σε περισσότερα τμήματα.
3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των τμημάτων DNA των φορέων και του ενθέματος για την ταυτοποίηση της παρουσίας τους και την ποσοτικοποίησή τους.
4. Έκπλυση και ανάκτηση των τμημάτων DNA από την πηκτή αгарόζης (Gel & PCR clean up kit, Macherey-Nagel)
5. Αντίδραση επίδεσης του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα (Ligation) με τη χρήση του In-Fusion ενζύμου
6. Μετασχηματισμός σε επιλεκτικά βακτηριακά κύτταρα
7. Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων και ταυτοποίηση με αλληλούχηση.

Τα βασικά βήματα της παραπάνω μεθόδου φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 13**).



\* If you obtain PCR product with non-specific background, isolate the target fragment by gel extraction first, then spin-column purify.

**Εικόνα 13** Πρωτόκολλο μεθόδου In- fusion (Clontech, Takara)

#### 4.2.1. Σχεδιασμός εκκινητών

Έγινε σχεδιασμός εκκινητών με σκοπό την ενίσχυση του γονιδίου. Ο σχεδιασμός εκκινητών αποσκοπεί στην ορθή ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου ή τμήματός του με τη χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Το προϊόν που προκύπτει είναι εξειδικευμένο και με γνωστά άκρα.

Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της εταιρείας Clontech, από την οποία προέρχεται το kit. Είναι απαραίτητο να διαθέτουν μια αλληλουχία 15 νουκλεοτιδίων που αλληλεπικαλύπτεται με την αντίστοιχη του φορέα.

Κατά το σχεδιασμό εκκινητών δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στα εξής:

1. Αλληλουχία εκκινητών: Ο εκκινητής πρέπει να έχει εξειδίκευση και ευαισθησία και ειδικά στο 3' άκρο του, ώστε να αυξάνεται η ευαισθησία και η εξειδίκευση της PCR. Έτσι ο εκκινητής δεν πρέπει να έχει:
  - 3 ή περισσότερες βάσεις G ή C στη σειρά στο άκρο αυτό. Κάτι τέτοιο θα σταθεροποιούσε τυχόν μη-εξειδικευμένη σύνδεση.
  - Μια 3'-θυμιδίνη, η οποία είναι επιρρεπής σε λάθος συνδέσεις σε σύγκριση με άλλα νουκλεοτίδια.
2. Τα ζεύγη των εκκινητών πρέπει να μην είναι συμπληρωματικά στο 3' άκρο, κάτι που θα είχε σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό διμερών. Όμως για τα πειράματα οι εκκινητές ελέγχθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος OligoCalc ([www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc](http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc)) για τυχόν δημιουργία διμερών ή διαμορφώσεων φουρκέτας.
3. Το μήκος του εκκινητή: 18-30 βάσεις. Μικρότερο μήκος θα οδηγήσει στην ενίσχυση μη επιθυμητών περιοχών κατά την PCR.
4. Θερμοκρασία τήξης (Tm): Η ιδανική θερμοκρασία τήξης ξεπερνά τους 60°C και πρέπει να είναι παρόμοια και στους δύο εκκινητές (διαφορά περίπου 5°C). Υπολογισμός Tm:  $Tm = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ . Όμως για τα πειράματα οι θερμοκρασίες τήξης υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του Tm Calculator από το site της NEB ([neb.com](http://neb.com)).
5. Η περιεκτικότητα σε G και C πρέπει να είναι μεταξύ 40-60%

Σχεδιασμός εκκινητή 5' άκρου: (συνδέεται με το 5' άκρο του γονιδίου- στόχου). Πρέπει να διαθέτει:

- Περιοχή αναγνώρισης από περιοριστική ενδονουκλεάση. Η περιοχή αυτή θα ταυτίζεται με την περιοχή αναγνώρισης που διαθέτει ο φορέας στον οποίο εισάγεται το γονίδιο ενδιαφέροντος.

- Μια προέκταση προς την 5' περιοχή που αυξάνει την αποτελεσματικότητα της περιοριστικής ενδονουκλεάσης (2-10 βάσεις).
- Περιοχή επικάλυψης με το γονίδιο ενδιαφέροντος. Η περιοχή αυτή πρέπει να δίνει Tm από 60 °C και άνω.

Σχεδιασμός εκκινητή 3' άκρου: Πρέπει να διαθέτει:

- Περιοχή αναγνώρισης από περιοριστική ενδονουκλεάση (ομοίως με 5' άκρο)
- Συμπληρωματική αλληλουχία κωδικονίου λήξης (συνήθως TAA) σε περίπτωση που δεν διατίθεται από το γονίδιο ενδιαφέροντος (2-3 αλληλουχίες)
- Περιοχή επικάλυψης με την αλληλουχία που είναι συμπληρωματική του 3' άκρου του γονιδίου- στόχου. (Tm ≥ 60 °C)
- Μια προέκταση προς την 5' περιοχή (ομοίως με 5' άκρο)

Εκκινητές για PhKα<sub>tnc</sub> (προς ένθεση στο φορέα pGEX-6P-1):

Forward Primer

5'- GGGATCCCCGGAATTCAAAGATGCATGGGTTCGTGATAAC -3'

Reverse Primer

5'- GTCGACCCGGGAATTCCTACTAGTGCGGCAGTTTG -3'

Εκκινητές για PhKα<sub>tnc</sub> (προς ένθεση στο φορέα pATHRA):

Forward Primer

5'- GGGGCCCATGCTCGAGAAAGATGCATGGGTTCGTGATAAC -3'

Reverse Primer

5'- CAGCCGGATCCTCGAGCTACTAGTGCGGCAGTTTG -3'

## 4.2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Το γονίδιο RHKA1<sub>trnc</sub> ενισχύθηκε με τα παραπάνω ζεύγη εκκινητών. Τα προϊόντα που προέκυψαν διέθεταν κατάλληλα άκρα ώστε να πραγματοποιηθεί ομόλογος ανασυνδυασμός με το κατοχυρωμένο ένζυμο της Clontech®.

### Πρωτόκολλο PCR (Τελικός όγκος 50μL)

**Πίνακας 3** Όγκοι και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

	Όγκος (μL)	Συγκέντρωση
Water for Injection	21	
Ready Mix KAPA HiFi	25	1x
10μM Forward Primer	1.5	0,3μM
10μM Reverse Primer	1.5	0.3μM
DNA Template	1	2.42ng/μL

**Πίνακας 4** Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Συνθήκες	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Initial Denaturation	95 °C	3min	1
Denaturation	98 °C	20sec	
Annealing	65 °C	15sec	25
Extension	72 °C	40sec	
Final Extension	72 °C	10min	1
Hold	4 °C	-	-

### 4.2.3. Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Η πέψη του φορέα κλωνοποίησης pGEX-6P-1 έγινε με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου EcoRI, το οποίο αναγνωρίζει μία μοναδική αλληλουχία στην περιοχή πολυσυνδέτη του πλασμιδίου (GAATTC). Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης πέψης ορίστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, έγινε επώαση της αντίδρασης στους 37°C για 2 ώρες.

#### Πρωτόκολλο για πέψη του φορέα pGEX-6P-1 (Τελικός όγκος 20μL)

**Πίνακας 5** Όγκοι και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την πραγματοποίηση πέψης με EcoRI

	Όγκοι	Τελικές συγκεντρώσεις
Water for Injection	13.7μL	
10x Buffer H	2μL	1x
pGEX-6P-1	3.3μL	≈50ng/μL
EcoRI	1μL	1.5units/μL

Η πέψη του φορέα κλωνοποίησης pATHRA έγινε με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου XhoI, το οποίο αναγνωρίζει μία μοναδική αλληλουχία στην περιοχή πολυσυνδέτη του πλασμιδίου (CTCGAG). Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης πέψης ορίστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, έγινε επώαση της αντίδρασης στους 37°C για 1 ώρα.

#### Πρωτόκολλο για πέψη του φορέα pATHRA (Τελικός όγκος 50μL)

**Πίνακας 6** Όγκοι και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την πραγματοποίηση πέψης με XhoI

	Όγκοι	Τελικές συγκεντρώσεις
Water for Injection	38.2μL	
10x Buffer CutSmart	5μL	1.25x
pATHRA	5.8μL	≈30ng/μL
XhoI	1μL	0.5units/μL

Τα δείγματα συλλέχθηκαν και φορτώθηκαν σε πηκτή αραρόζης 1% ώστε να ποσοτικοποιηθούν οι ευθυγραμμισμένοι φορείς.

#### 4.2.4. Εξαγωγή DNA από πηκτή αραρόζης

Σύμφωνα με το εμπορικό πρωτόκολλο “DNA extraction from agarose gels” του NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, της εταιρίας Machenery- Nagel. Τα τελικά δείγματα συλλέχθηκαν και μετρήθηκε η συγκέντρωσή τους στο NanoDrop.

#### 4.2.5. Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού – In-fusion

Η διαδικασία σύνδεσης του τμήματος του ενθέματος με τον ευθυγραμμισμένο φορέα βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Η αντίδραση καταλύεται από τη DNA πολυμεράση του ιού της δαμαλίτιδας (Vvpol) η οποία εξαιτίας της ιδιότητάς της ως ρεκομπινάση, αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση τα κοινά άκρα των 15bp που έχουν οι φορείς και το ένθεμα. Η αναλογία της ποσότητας του ενθέματος προς αυτή του φορέα κλωνοποίησης ορίστηκε ως 3 προς 1 αντίστοιχα σύμφωνα με το In-fusion HD cloning kit. Επιτυγχάνεται έτσι, η απόδοση του ομόλογου ανασυνδυασμού να είναι υψηλή, και οι πιθανότητες ο φορέας να επανακυκλοποιηθεί χωρίς να λάβει ένθεμα να είναι ελάχιστες.

#### Πρωτόκολλο αντίδρασης In-fusion για το φορέα pGEX-6P-1 (Τελικός όγκος 10μL)

**Πίνακας 7** Όγκοι και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για In-fusion με pGEX-6P-1

	Όγκοι	Τελικές συγκεντρώσεις
Water for Injection	1.6μL	
Infusion Enzyme	2μL	1x
PhKα <sub>trnc</sub>	1.5μL	97.8 ng
pGEX-6P-1	4.9μL	150ng



## Πρωτόκολλο αντίδρασης In-fusion για το φορέα pATHRA (Τελικός όγκος 20μL)

**Πίνακας 8** Όγκοι και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την αντίδραση In-fusion με pATHRA

	Όγκοι	Τελικές συγκεντρώσεις
Water for Injection	3.58μL	
Infusion Enzyme	4μL	1x
PhKα <sub>trnc</sub>	0.62μL	85.4ng
pATHRA	11.8μL	150ng

*Σημείωση: Σύμφωνα με το In-fusion HD cloning kit αν το άθροισμα των όγκων του ενδέματος και του φορέα είναι μεγαλύτερο των 7μL, τότε ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20μL.*

Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 50°C για 30min και στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στον πάγο.

Στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* XL1 Blue, απομόνωση πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα και έλεγχος.

### 4.2.6. Χημικός μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηρίων *E.coli* XL1 Blue με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα

Η διαδικασία βασίζεται στη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock) κατά την οποία τα επιδεικτικά σε ξένο DNA κύτταρα υποβάλλονται σε υψηλή θερμοκρασία για σύντομο χρονικό διάστημα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ανοίγουν οι πόροι της μεμβράνης και το επιθυμητό πλασμίδιο να εισέρχεται πιο εύκολα στο κύτταρο. Τα επιδεικτικά βακτηριακά κύτταρα είναι αποθηκευμένα σε σωληνάρια τύπου erpendorf και διατηρούνται σε πάγο. Τα βασικά βήματα της μεθόδου έχουν ως εξής

- Προσθήκη 50ng πλασμιδίου,
- Ήπια ανάδευση
- Επώαση στο heat block στους 42°C αυστηρά για 45sec
- Μεταφορά στον πάγο (4°C) για 2 min
- Προσθήκη αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου χωρίς αντιβιοτικό μέχρι τελικό όγκο 1mL

- Επώαση στους 37°C για 1 ώρα και υπό συνεχή ανάδευση (180-210rpm)
- Προσθήκη αντιβιοτικού Ampicilline (25μg/ml)
- Επίστρωση τρυβλίων petri με θρεπτικό μέσο LB Agar

Η διαδικασία γίνεται μία φορά για να προστεθεί ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P-1 και μία για να προστεθεί ο πλασμιδιακός φορέας pATHRA.

Τα τρυβλία επωάζονται για 14-16 ώρες σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο θερμοκρασίας 37°C χωρίς ανάδευση. Όλοι οι χειρισμοί και όλες οι διαδικασίες γίνονται υπό στείρες συνθήκες.

#### Διαμόλυνση Υγρών Καλλιιεργειών

Μετά το πέρας των 16 ωρών έγινε επιλογή 4 αποικιών pGEX-6P-1 και 4 αποικιών pATHRA. Η κάθε μία τοποθετήθηκε σε 10ml θρεπτικού υλικού LB Broth παρουσία αμπικιλίνης σε συγκέντρωση 100 mg/ml. Οι υγρές καλλιέργειες επωάστηκαν για άλλες 18 ώρες (overnight) στους 37°C.

#### 4.2.7. Απομόνωση πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα (MiniPrep)

Έγινε σύμφωνα με το εμπορικό πρωτόκολλο "Isolation of high-copy plasmid DNA from *E.coli*" του NucleoSpin®plasmid / Plasmid (NoLid) Protocols, Plasmid DNA purification, της εταιρίας Machenery- Nagel.

Για να διαπιστωθεί και να επαληθευτεί η ένθεση πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Φορτώθηκαν 20μL δειγμάτων αραιωμένων 1:10. Επίσης φορτώθηκαν 5μL του δείκτη μοριακών βαρών Ladder Quick-Load (BioLabs) με αρχική συγκέντρωση 50μg/ml.

#### 4.2.8. Αλληλούχηση

Σχεδιάστηκαν οι εσωτερικοί εκκινητές όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Forward Primer

5'- GTTGGCATGGCGAAAGCAGC -3'

Reverse Primer

5'- CCACGCTCAGCAGACTTGCA -3'

Τα δείγματα στάλθηκαν στη *Lab Supplies* για αλληλούχηση ώστε να διαπιστωθεί η επιτυχία της κλωνοποίησης του ενθέματος στους πλασμιδιακούς

φορείς. Μαζί με τα δείγματα στάλθηκαν οι διαλυτοποιημένοι εκκινητές και το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης.

#### 4.2.9. Σχεδιασμός μεταλλαγμάτων

Για τον εντοπισμό των καταλοίπων που θα αποτελούσαν τον στόχο των μεταλλάξεων, έπρεπε να δοθεί προσοχή ώστε να πληρούν τα παρακάτω:

- Να εντοπίζονται επιφανειακά
- Να εντοπίζονται σε βρόχους
- Να μην είναι κυστεΐνες καθώς έτσι θα επηρεάζονταν οι δισουλφιδικοί δεσμοί
- Να μην έχει δειχθεί μετά το MSA πως είναι καλά συντηρημένα μεταξύ των γλυκοαμυλασών
- Να μην έχει δειχθεί μετά το MSA πως είναι πιθανώς καταλυτικά κατάλοιπα
- Να μην δίνεται από τη βιβλιογραφία πως πιθανώς η μετάλλαξη θα οδηγούσε σε ασθένεια GSD IX (**Πίνακας 2**)
- Επίσης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία προτιμήθηκε η επιχείρηση μεταλλάξεων των υδρόφιλων καταλοίπων Asn, Gln και Thr προς τα πιο υδρόφιλα Asp, Glu και Ser, καθώς φαίνεται να συμβάλλουν πιο πολύ στη διαλυτότητα των πρωτεϊνών (Trevino, Scholtz, & Pace, 2008b).

Έπειτα από έλεγχο βελτιστοποίησης της διαλυτότητας με τα αντίστοιχα προγράμματα, και έλεγχο αλληλεπίδρασης με τα περιβάλλοντα αμινοξέα, αποφασίστηκε η δημιουργία του παρακάτω τριπλού μεταλλάγματος:

- L178D, F179D, K182D

Επειδή οι μεταλλάξεις επιλέχθηκαν να γίνουν σε αμινοξέα που βρίσκονται σχετικά κοντά μεταξύ τους, η πιθανότητα λαθών κατά τη μεταλλαξιγένεση είναι πολύ υψηλή. Για αυτό το λόγο θεωρείται καλύτερο η μεταλλαξιγένεση να γίνει σε δύο στάδια (two-step). Κατά το πρώτο βήμα στοχεύονται τα κατάλοιπα L178 και F179, και στο δεύτερο βήμα στοχεύεται το κατάλοιπο K182.

Επομένως, σχεδιάστηκαν τα παρακάτω δύο ζεύγη εκκινητών σύμφωνα με τα κριτήρια σχεδιασμού εκκινητών (4.2.1. Σχεδιασμός εκκινητών), και το πρόγραμμα QuickChange Primer Design ([www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp](http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp)) :

Εκκινητές για τα μεταλλάγματα L178D και F179D

Forward primer

5'-CTGGATGAACTGGACGACGACGGCGTTAAAGG-3'

Reverse primer

5'-CCTTTAACGCCGTCGTCGTCCAGTTCATCCAG-3'

Εκκινητές για το μετάλλαγμα K182D

Forward primer

5'-GACGGCGTTGACGGCGGTCC-3'

Reverse primer

5'-GGACCGCCGTCAACGCCGTC-3'

Για την εισαγωγή των στοχευμένων μεταλλάξεων θα χρησιμοποιηθεί το QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit της Agilent Technologies. Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιείται για την εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων, την αντικατάσταση αμινοξέων και την απαλοιφή ή προσθήκη ενός ή πολλαπλών αμινοξέων.

### 4.3. Μελέτες έκφρασης (Expression test)

#### 4.3.1. Χημικός μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων BL-21 Gold και B834-pLySs για έκφραση

Έγινε μετασχηματισμός των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Η διαδικασία διαφέρει σε ένα σημείο για τις καλλιέργειες των B834-pLySs. Τα στελέχη αυτά φέρουν από μόνα τους ένα πλασμίδιο που τους προσφέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό χλωραμφαινικόλη. Συνεπώς, για τις στερεές καλλιέργειες LB agar των B834-pLySs χρησιμοποιούνται δύο αντιβιοτικά, αμπικιλίνη με τελική συγκέντρωση 100μg/ml και χλωραμφαινικόλη με τελική συγκέντρωση 34μg/ml.

#### 4.3.2. Ανάπτυξη κυττάρων

Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε υγρές καλλιέργειες εφόσον είχε προηγηθεί ο αντίστοιχος μετασχηματισμός των βακτηριακών στελεχών με το επιθυμητό πλασμίδιο. Για κάθε υγρή καλλιέργεια επιλεγόταν μια μοναδιαία σθηκτή αποικία από το ανάλογο τρυβλίο Petri και μεταφερόταν σε σωληνάριο τύπου falcon που περιείχε θρεπτικό μέσο LB Broth 10ml και τα κατάλληλα αντιβιοτικά, και επωαζόταν για 16 ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm). Το αντιβιοτικό εξαρτάται από το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται κάθε φορά καθώς αναφέρθηκε παραπάνω πως διαφορετικά πλασμίδια φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε διαφορετικά αντιβιοτικά. Εφόσον υπήρχε ανάπτυξη των κυττάρων ακολουθούσε ανακαλλιέργεια σε μεγαλύτερη κλίμακα (θρεπτικό μέσο LB Broth 40ml). Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών στις υγρές καλλιέργειες 10ml και 40ml ήταν 50μg/ml για την αμπικιλίνη και 34μg/ml για τη χλωραμφαινικόλη. Μετέπειτα, πραγματοποιούνταν οι δοκιμές της επαγωγής. Όλοι οι χειρισμοί γίνονται σε στείρες συνθήκες.

#### 4.3.3. Επαγωγή υπερέκφρασης στους 37°C

Σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη προστίθεται αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB Broth (100mL) στο οποίο είχε προστεθεί αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Μετά την προσθήκη αντιβιοτικού λαμβάνεται 1ml από την καλλιέργεια που θα χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για την φασματοφωτομετρική παρακολούθηση της πορείας ανάπτυξης της καλλιέργειας. Έπειτα, το θρεπτικό εμβολιάστηκε με 1/100 από την καλλιέργεια των κυττάρων BL-21 Gold (40mL), που είχε αναπτυχθεί για 16 ώρες, και επωάστηκε στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) ώσπου η οπτική απορρόφηση της οπτικής πυκνότητας ήταν OD<sub>600nm</sub>=0.6-0.7 όπου και θεωρείται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Η διαδικασία έγινε ταυτόχρονα για τις διαφορετικές κυτταρικές σειρές που μετασχηματίστηκαν με τους διαφορετικούς πλασμιδιακούς φορείς.

Ακολούθησε επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με προσθήκη IPTG. Η κάθε μία από τις τέσσερις καλλιέργειες διαιρέθηκε σε σωλήνες τύπου falcon χωρητικότητας 50mL (x10mL καλλιέργειας) οι οποίοι ονομάστηκαν ανάλογα με τη συγκέντρωση του επαγωγέα: "control", "0.1", "0.5" ή και "1". Στο

σωλήνα “control” δεν προστέθηκε επαγωγέας, στο σωλήνα “0.1” προστέθηκε επαγωγέας (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.1mM, στο σωλήνα “0.5” προστέθηκε επαγωγέας (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.5mM και στο σωλήνα “1” προστέθηκε επαγωγέας (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 1mM. Οι καλλιέργειες μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης επώάζονται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) για 4 ώρες. Έπειτα, τοποθετούνται σε πάγο και φυγοκεντρούνται στα 11000xg, στους 4°C για 5 min. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κυτταρικά ιζήματα αποθηκεύτηκαν στον πάγο.

Να σημειωθεί πως όλοι οι χειρισμοί βακτηρίων και αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων, έγιναν υπό στείρες συνθήκες μέχρι και το στάδιο της φυγοκέντρησης.

#### 4.3.4. Λύση κυττάρων

Τα ιζήματα που συλλέχθηκαν μετά την επαγωγή, επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και χωρίστηκαν σε σωληνάκια τύπου erpendorf. Στη συνέχεια, τα διαλύματα υποβλήθηκαν σε μηχανική λύση με υπερήχους. Η πλήρης λύση των κυττάρων έγινε σε 1 κύκλο των 5sec, όπου η συσκευή υπερήχων παράγει υπερήχους εύρους 70%, σε συνεχόμενους κύκλους, οι οποίοι διαπερνούν το κυτταρόλυμμα. Στο στάδιο αυτό, φυλάχθηκαν δείγματα (~50μL) του ολικού εκχυλίσματος, καθώς στα διαλύματα των λυμμένων κυττάρων περιέχονται και διαλυτά και αδιάλυτα στοιχεία, και τα οποία θα ελεγχθούν με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDSPAGE). Στη συνέχεια, το υπόλοιπο των διαλυμάτων των λυμμένων κυττάρων υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση στις 13000rpm/4°C για 30min. Μετά τη φυγοκέντρηση, διαχωρίστηκε το υπερκείμενο από το ίζημα, καθώς το δεύτερο αποτελείται από τα κυτταρικά υπολείμματα, και το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -20 °C, έως ότου έγινε ανάλυση με SDS-PAGE.

#### 4.3.5. Επαγωγή υπερέκφρασης στους 18°C

Ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία όπως και με τους 37°C, ελαφρώς διαφοροποιημένη εξαιτίας παρατηρήσεων που προέκυψαν από την επαγωγή στους 37°C.. Αρχικά, η επαγωγή έγινε μόνο στην κυτταρική σειρά BL-21 Gold που μετασχηματίστηκε με pGEX-6P-1 και στην κυτταρική σειρά B834-pLySs που μετασχηματίστηκε με το φορέα pATHRA. Οι καλλιέργειες είχαν τελικό 1L, η κάθε μία. Επίσης, μετά την επαγωγή ο χρόνος επώασης στους 18°C ανέρχεται στις 16 ώρες, καθώς η θερμοκρασία δεν είναι ιδανική για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Τέλος, στη συγκεκριμένη θερμοκρασία η επαγωγή έγινε μόνο με συγκέντρωση του επαγωγέα (IPTG) 0.1 mM.

#### 4.3.6. Λύση κυττάρων

Ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία όπως περιγράφηκε παραπάνω (4.3.4. Λύση κυττάρων). Η διαφορά είναι πως η πλήρης λύση των κυττάρων έγινε σε 1 κύκλο των 15sec, ώστε να είναι σίγουρα επιτυχής η διάσπαση των κυττάρων.

### 4.4. Αναλυτικές μέθοδοι

#### 4.4.1. Ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση συγκεκριμένων τμημάτων DNA σε πηκτές αγαρόζης και η απομόνωση τους από αυτές αποτελεί έναν απλό και αποδοτικό τρόπο διαχωρισμού και καθαρισμού τους. Η μέθοδος βασίζεται στην παρασκευή πηκτών με προσθήκη αγαρόζης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και θέρμανση έως ότου σχηματιστεί ένα διαυγές διάλυμα. Με την ψύξη του διαλύματος σχηματίζεται ένα πλέγμα του οποίου η πυκνότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου έχει ως αποτέλεσμα τα τμήματα του DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, να μετακινούνται προς την άνοδο. Η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων DNA εξαρτάται από το μέγεθος τους, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη διαμόρφωση τους, το δυναμικό που εφαρμόζεται στα άκρα της πηκτής και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης (D. R. Smith, 1993).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε πηκτή με συγκέντρωση αγαρόζης 1% σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x, παρουσία SYBR Safe DNA stain. Έγινε εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τάσης 90V και παρακολούθηση του μετώπου των χρωστικών που ενυπάρχουν στο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (6x loading buffer).

#### 4.4.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών έχει ως στόχο το διαχωρισμό τους με βάση τα μοριακά τους βάρη, και για αυτό επιλέγεται κάθε φορά η πυκνότητα της πηκτής που θα χρησιμοποιηθεί ανάλογα με την πρωτεΐνη που πρόκειται να ανιχνευθεί. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα ηλεκτροφόρησης είναι ασυνεχές, δηλαδή αποτελείται από δύο πηκτές διαφορετικής πυκνότητας, την πηκτή διαχωρισμού (separating gel) και την πηκτή επιστίβαξης (stacking gel). Το stacking gel έχει σταθερή πυκνότητα 5%, ενώ η πυκνότητα του separating gel προσαρμόζεται ανάλογα με τις

ανάγκες του πειράματος (B. J. Smith, 1984). Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκε separating gel πυκνότητας 10%.

**Πίνακας 9** Σύσταση του separating gel και του stacking gel

Separating gel 10% (15mL)		Stacking gel 5% (5mL)	
dH <sub>2</sub> O	5.9 mL	dH <sub>2</sub> O	3.4 mL
Tris-HCl 1.5M pH8.8	3.8 mL	Tris-HCl 1.5M pH6.8	630 µL
SDS 10%	150 µL	SDS 10%	50 µL
Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	5.0 mL	Μίγμα ακρυλαμιδίου 30%	830 µL
APS 10%	150 µL	APS 10%	50 µL
TEMED	6 µL	TEMED	5µL

Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου, σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία των παραγόντων υπερθειικό αμμώνιο (APS) και TEMED. Το TEMED είναι επιταχυντής, το οποίο καταλύει την αντίδραση πολυμερισμού των ελεύθερων ριζών του θείου που δημιουργούνται από το APS.

Μόλις η πηκτή είναι έτοιμη τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1× (Running Buffer 1×) 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×. Στη συνέχεια, τοποθετούνται για 5min 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 τα πηγάδια φορτώνεται ο μάρτυρας γνωστών μοριακών μεγεθών.

Τέλος, η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται στο τροφοδοτικό το οποίο διαβιβάζει ρεύμα τάσης 120V στο κλειστό κύκλωμα μεταξύ της δεξαμενής της συσκευής ηλεκτροφόρησης.



## 5. Αποτελέσματα- Συζήτηση

---

### 5.1. In silico μελέτη

#### 5.1.1. Πρόβλεψη επικρατειών (Domain Prediction)

Διάφορες μελέτες (Pallen, 2003; Rimmer et al., 2018; Vénien-Bryan et al., 2009) που υποστηρίζουν πως η αμινοτελική περιοχή της PhKα είναι επικράτεια γλυκοαμυλάσης. Με βάση αυτό, πρώτα, επιχειρήθηκε η επαλήθευση της παραπάνω θεωρίας, καθώς και η εύρεση περιορισμένης αμινοξικής περιοχής.

Χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα NCBI's Conserved Domain Database (CDD) και InterPro, στα οποία εισήχθη ολόκληρη η αμινοξική αλληλουχία της  $\alpha$  υπομονάδας της PhK.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως όντως το αμινοτελικό άκρο είναι περιοχή GH1. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με το πρόγραμμα NCBI Conserved Domains, η περιοχή GH1 εκτείνεται στα αμινοξέα 8-439. Το πρόγραμμα InterPro προτείνει πως η επικράτεια γλυκοαμυλάσης αφορά όλο το αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 8-922), αλλά εστιάζοντας στα αμινοξέα 10-453 εντοπίζεται περιοχή που ανήκει στην υπερικογένεια των γλυκοσιδασών με δομή  $(\alpha/\alpha)_6$ -βαρελιού (six-hairpin).

Υπάρχει συμφωνία αποτελεσμάτων με τις προηγούμενες μελέτες. Ο Pallen ήταν ο πρώτος που υποστήριξε πως οι υπομονάδες  $\alpha$  και  $\beta$  είναι πιθανώς επικράτειες γλυκοαμυλάσης (Pallen, 2003). Έπειτα, η Carrière et al. πρότειναν πως η περιοχή γλυκοαμυλάσης εκτείνεται στα αμινοξέα 8-432 (Carrière et al., 2008), ενώ στην πιο πρόσφατη μελέτη, ο Rimmer et al., παρουσίασαν πως η περιοχή GH1 αφορά τα αμινοξέα 1-436 (Rimmer et al., 2018).

### 5.1.2. Πρόβλεψη διαλυτότητας

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρήθηκε πως η περιοχή γλυκοαμυλάσης εκτείνεται περίπου στα αμινοξέα 8-440. Εντός αυτών των αμινοξέων επιχειρήθηκε η εύρεση περιορισμένης περιοχής που θα παρουσίαζε την καλύτερη δυνατή διαλυτότητα.

Παράλληλα, η αποτελεσματικότητα της έκφρασης διαλυτής πρωτεΐνης στο σύστημα του *E.coli* αυξάνεται όσο μειώνεται το μέγεθος του προς μελέτη πρωτεϊνικού μορίου.

Χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα ProteinSol και CamSol στα οποία εισήχθησαν διάφορες παραλλαγές της αμινοξικής αλληλουχίας 8-440. Τελικά, αποφασίστηκε πως η περιοχή που θα μελετηθεί είναι τα αμινοξέα 40-400.

Και τα δύο προγράμματα υποστηρίζουν πως το πρωτεϊνικό προϊόν που προκύπτει από αυτήν την περιοχή είναι μη διαλυτό. Πιο συγκεκριμένα, το σκορ διαλυτότητας σύμφωνα με το CamSol Instruct είναι περίπου -0.04, ενώ σύμφωνα με το Protein-Sol είναι 0.490, με επιτρεπτές τιμές [-1,1] και (0-1), αντίστοιχα. Ωστόσο, εμφανίζει καλύτερες πιθανότητες διαλυτότητας σε σύγκριση με άλλες αλληλουχίες που δοκιμάστηκαν.

### 5.1.3. Μοντελοποίηση μέσω threading

Εφόσον καθορίστηκε η αμινοξική αλληλουχία (40-400), στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα I-TASSER για τη μοντελοποίηση της προβλεπόμενης δομής της RhKa<sub>trnc(40-400)</sub>.

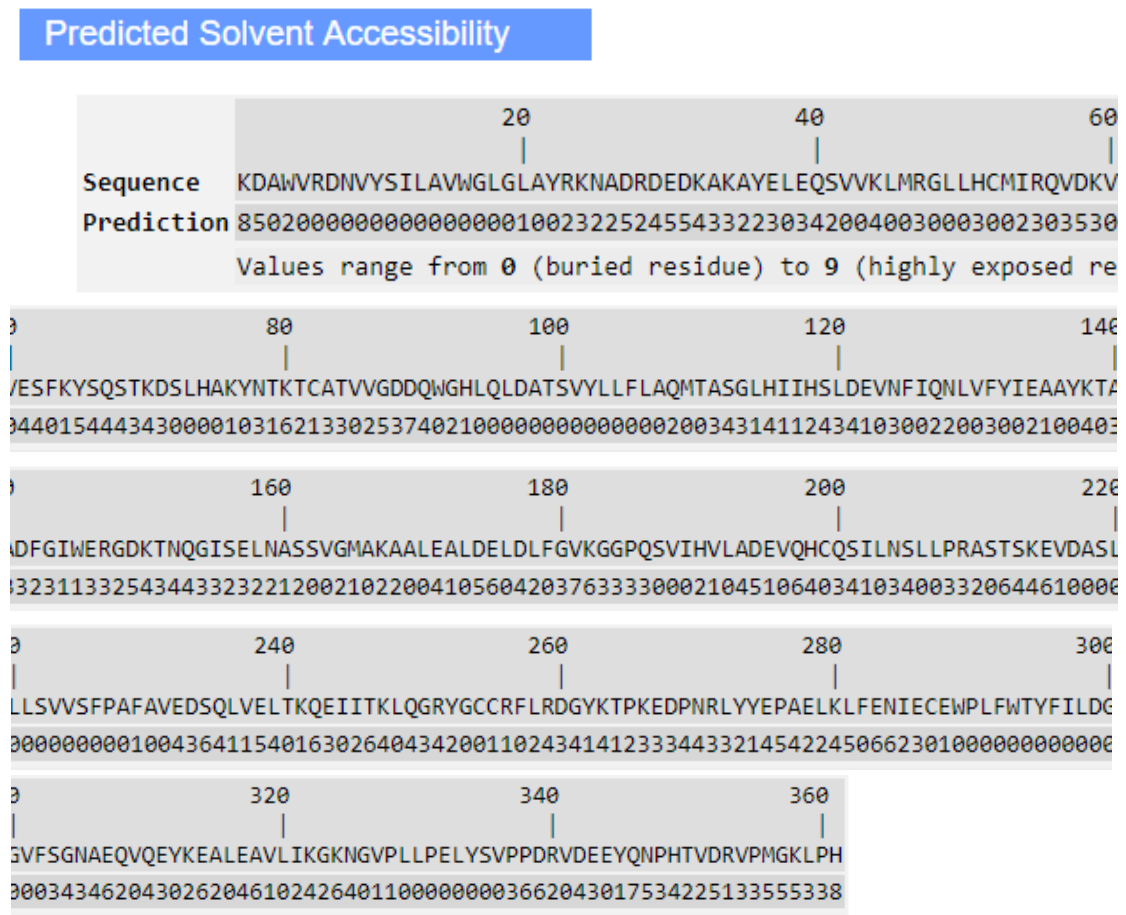
Το πρόγραμμα I-TASSER παρουσιάζει την προτεινόμενη δευτεροταγή δομή του μορίου (**Εικόνα 14**). Παρατηρείται πως η δευτεροταγής δομή αποτελείται κυρίως από α- έλικες (H) και βρόχους (C). Βρόχος ονομάζεται κάθε δευτεροταγή δομή που δεν μπορεί να καταταγεί στις γνωστές κατηγορίες δευτεροταγών διαμορφώσεων, όπως οι α- έλικες (H) και τα β-πτυχωτά φύλλα (S). Συνήθως, οι βρόχοι έχουν υδρόφιλα και εύκαμπτα κατάλοιπα, βρίσκονται σε επαφή με τον διαλύτη και επιτελούν σημαντικούς βιολογικούς ρόλους. Επίσης, παρατίθεται και η τιμή που αντιστοιχεί στην αξιοπιστία και την ακρίβεια της πρόβλεψης. Με 9 δίνεται η πιο ακριβής πρόβλεψη, ενώ με 0 η πιο αναξιόπιστη.

#### Predicted Secondary Structure

	20	40	60
Sequence	KDAWVRDNYVSI LAVWGLGLAYRKNADRDEDKAKAYELEQSVVKLMRGLLHCMIRQVDKV		
Prediction	CCCCSSCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH		
Conf. Score	9722762424788999999999984135640578999999999999999999999999879999		
	H:Helix; S:Strand; C:Coil		
80	100	120	140
Sequence	VESFKYSQSTKDSLHAKYNTKTCATVVGDDQWGHQLDATS VYLLFLAQMTASGLHIIHSLDEVNFIQNLVFI EAAYKTA		
Prediction	HHHHCCCCCHHCHSSSSSSCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCC		
Conf. Score	99872579961121365406887724686444505572999999999999974688306778999999999999986087		
160	180	200	220
Sequence	ADFGIWERGDKTNQGIS ELMASSVGMAKAALDELDLFGVKGGPQSVIHVLADDEVQHCQSILNSSLPRASTSKEVDASL		
Prediction	CCCCCCCCCCCCCHHH		
Conf. Score	7776200057567885432141798999999999741786100379984278988489998889887338843378630288E		
240	260	280	300
Sequence	LLSVVSFPFAVEDSQLVELTKQEIITKLQGRYGCCRF LRDGYKTPKEDPNRLYYEPAELKLFENIECEWPLFWTYFILDG		
Prediction	HHHCCCCSSSCCHHH		
Conf. Score	88761566501063899999999999998446666455336777663558531225887775336862103889999999999		
320	340	360	
Sequence	GVFSGNAEQVQEYKEALEAVLIKGNVPLLP ELYSVPPDRVDEEYQNPHTVDRVPMGKLP H		
Prediction	HHHCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHSSSSCCCCSSCSCSSCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH		
Conf. Score	998469999999999999999985743188998627601005888899999858799765789999988		

Εικόνα 14 Προτεινόμενη δευτεροταγής δομή των αμινοξέων 40-400

Με τη βοήθεια του προγράμματος I-TASSER είναι δυνατή και η πρόβλεψη των εκτεθειμένων και των μη εκτεθειμένων καταλοίπων στο διαλύτη. Το εύρος τιμών είναι 0-9, όπου με 0 συμβολίζονται τα τελείως εσωτερικά κατάλοιπα ενώ με 9 τα επιφανειακά κατάλοιπα (**Εικόνα 15**).



**Εικόνα 15** Προτεινόμενα εσωτερικά και επιφανειακά κατάλοιπα

### Μοντελοποίηση Ομολογίας (Homology modeling)

Η μοντελοποίηση ομολογίας αφορά την κατασκευή ενός μοντέλου ατομικής-ανάλυσης με βάση την αλληλουχία της προς μελέτη πρωτεΐνης, και στη συνέχεια ενός τρισδιάστατου μοντέλου με βάση τις ομόλογες βάσεις αλληλουχίας πρωτεΐνες που είναι καταχωρημένες στην PDB, τα templates. Η ποιότητα του μοντέλου ομολογίας εξαρτάται από την ποιότητα της στοίχισης αλληλουχίας και των δομών των «προτύπων».

Το I-TASSER στην αρχή πραγματοποιεί homology modeling. Ωστόσο, το ποσοστό Iden1 φαίνεται πως είναι χαμηλό (**Εικόνα 16**) και επομένως ένα δομικό μοντέλο που θα προέκυπτε από homology modeling είναι αναξιόπιστο (**Figure 1**).

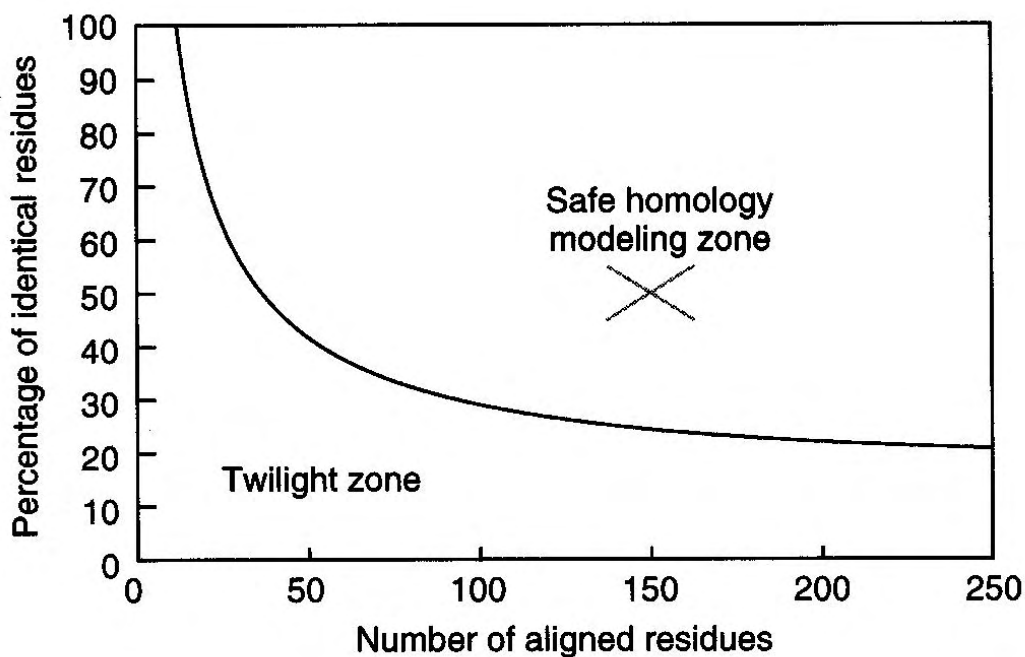


Figure 1 Τιμές αξιοπιστίας για επιτυχές homology modeling

Εξαιτίας αυτού, το I-TASSER πραγματοποιεί threading και παραθέτει τα δέκα καλύτερα templates που είναι ήδη καταχωρημένα στην PDB σε σχέση με την προς μελέτη αμινοξική αλληλουχία (Εικόνα 16). Ταυτόχρονα, προτείνει και τη πιθανή λειτουργία της αμινοξικής αλληλουχίας 40-400.

### Top 10 threading templates used by I-TASSER

Rank	PDB Hit	I den1	I den2	Cov	Norm. Z-score	Download Align.	
1	<a href="#">1ulvA</a>	0.20	0.29	0.81	1.11	<a href="#">Download</a>	<pre> Sec.Str CCCSSSCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHH Seq KDAWVRDENVYSILAVWGLGLAYRKNADRDEDKAI HAVWARDMYQSVTALLAAGD----- TSYGHELGRSTGSASPL </pre>
2	<a href="#">1gaiA</a>	0.13	0.19	0.87	2.44	<a href="#">Download</a>	<pre> FYTWTRODSGLVIKTLVDLFR-----NGDTI HAVWARDMYQSVTALLAAGD-----EEA NAGYMIPEQVWDRDEPTSYGHELGRSTGSASPLS YYMWTRODSALVFKNLIDETYA-----GLQR -----SKFTKL-Q----- FYTWTRODSGLVIKTLVDLFRNG----- ----- HLVWSRDLYHVANAFIAAGD----- FYTWTRODSGLVIKTLVDLFRN----- DAPATSTGALRTQYDVS LMTVKAASAETHREGY </pre>
3	<a href="#">1ulvA</a>	0.17	0.29	0.82	1.04	<a href="#">Download</a>	
4	<a href="#">2vn4</a>	0.14	0.22	0.81	3.26	<a href="#">Download</a>	
5	<a href="#">5hop</a>	0.14	0.16	0.63	2.82	<a href="#">Download</a>	
6	<a href="#">1gaiA</a>	0.12	0.19	0.83	1.14	<a href="#">Download</a>	
7	<a href="#">5hop</a>	0.12	0.16	0.50	4.14	<a href="#">Download</a>	
8	<a href="#">1lf6A</a>	0.17	0.28	0.73	1.57	<a href="#">Download</a>	
9	<a href="#">1gaiA</a>	0.15	0.19	0.86	0.65	<a href="#">Download</a>	
10	<a href="#">1ug9A</a>	0.14	0.24	0.91	1.46	<a href="#">Download</a>	

Εικόνα 16 Αποτελέσματα threading

Αξιοσημείωτο είναι πως και τα 10 καλύτερα προτεινόμενα templates από την PDB αντιστοιχούν σε υδρολάσες (GH-15).

Επιπλέον, μέσω αυτού του προγράμματος κατασκευάζονται κάποια αρχικά μοντέλα τα οποία έπειτα συγκρίνονται με άλλες υπάρχουσες δομές της PDB. Στην εικόνα φαίνεται το πρώτο μοντέλο που προτείνεται από το I-TASSER. Το συγκεκριμένο μοντέλο έχει C-score=-0.93, TM-score= 0.60±0.14 και RMSD=8.7±4.5Å.



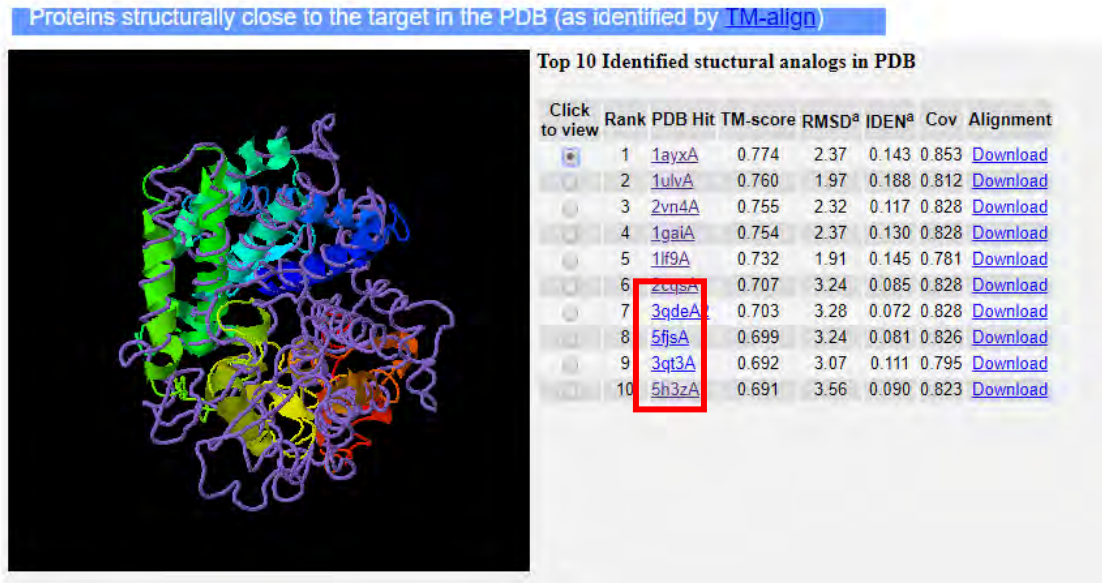
C-score=-0.93  
Estimated TM-score = 0.60±0.14  
Estimated RMSD = 8.7±4.5Å

**Εικόνα 17** Προτεινόμενο μοντέλο

Μετά την προσομοίωση κατασκευής των προτεινόμενων δομικών μοντέλων, το I-TASSER χρησιμοποιεί το πρόγραμμα TM-align, ώστε να ταιριάζει το πρώτο μοντέλο (**Εικόνα 17**) σε όλες τις δομές που έχουν καταχωρηθεί στην PDB. Ως αποτέλεσμα παρατίθενται οι 10 πρωτεΐνες οι οποίες έχουν την εγγύτερη δομική ομοιότητα στο προτεινόμενο από το I-TASSER μοντέλο. Λόγω της δομικής ομοιότητας, η προς μελέτη πρωτεΐνη έχει συχνά παρόμοια λειτουργία με αυτές τις 10 πρωτεΐνες.

Βρέθηκε πως η πρωτεΐνη που είναι δομικά πλησιέστερη στο προτεινόμενο μοντέλο είναι μια γλυκοαμυλάση του *Saccharomycopsis fibuligera* (PDB ID: 1AYX), με TM-score= 0.774, υποδηλώνοντας μια καλή τοπογραφική αντιστοίχιση (**Εικόνα 18A**). Με βάση το πρώτο αποτέλεσμα (mod\_1ayx.pdb) και χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα γραφικών PyMol, έγινε η γραφική αναπαράσταση του μοντέλου όπου φαίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο επίπεδο η προς μελέτη πρωτεΐνη και η πρωτεΐνη με PDB ID: 1AYX (**Εικόνα 18B**).

A



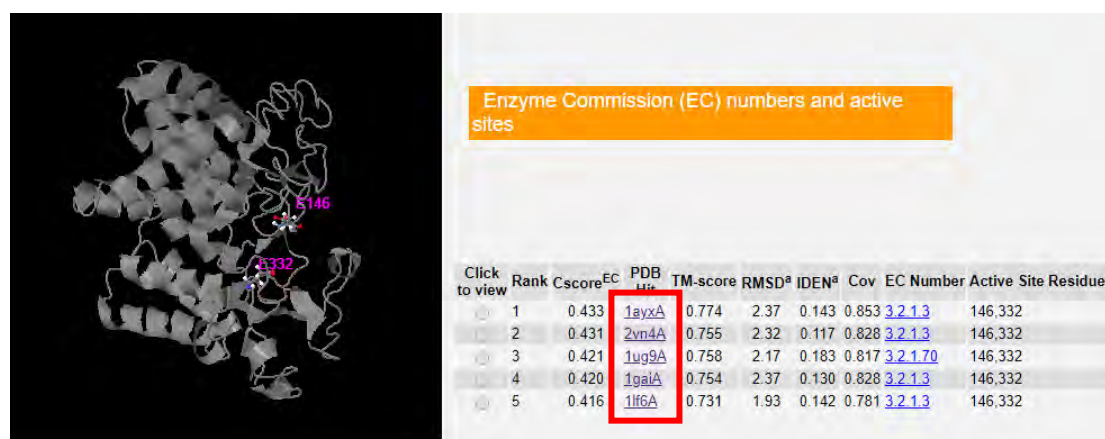
B

**Εικόνα 18** (A) Οι δέκα καλύτερες πρωτεΐνες δομικά εγγύτερες στην προς μελέτη πρωτεΐνη. Απεικονίζεται το μοντέλο mod\_1ayx.pdb. Με μωβ χρωματίζεται η πρωτεΐνη PDB ID:1AYX, ενώ το υπόλοιπο είναι η πρωτεΐνη προς μελέτη. (B) Superposition, mod\_1ayx.pdb, χρησιμοποιώντας το PyMol. Με πράσινο χρωματίζεται η πρωτεΐνη προς μελέτη, με κόκκινο η πρωτεΐνη PDB ID: 1AYX

Ενθαρρυντική είναι η παρατήρηση πως οι πέντε (5) καλύτερες πρωτεΐνες που προτείνονται ως οι δομικά εγγύτερες προς την προς μελέτη πρωτεΐνη, συμπίπτουν με τις δέκα (10) καλύτερες πρωτεΐνες που δόθηκαν ως αποτέλεσμα του threading. Να σημειωθεί πως το PDB ID: 1lf9 και το PDB ID: 1lf6 αναφέρονται στην ίδια πρωτεΐνη, μια γλυκοαμυλάση του *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, ωστόσο η καταχώρηση 1lf9 είναι η κρυσταλλική δομή της γλυκοαμυλάσης σε σύμπλοκο με την ακαρβόζη. Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένα PDB IDs (2cqs, 3qde, 5h3z) τα οποία είναι φωσφορυλάσες και ανήκουν στην οικογένεια των τρανσφερασών.

Στη συνέχεια, το I-TASSER χρησιμοποιεί το πρόγραμμα COFACTOR, το οποίο εξυπηρετεί την πρόβλεψη της βιολογικής λειτουργίας εξετάζοντας την αλληλουχία-στόχο ως προς τρεις διαφορετικές βάσεις δεδομένων (BioLip, UniProt-GOA, STRING). Η BioLip είναι βάση δεδομένων συσχέτισης της δομής και της λειτουργίας του πρωτεϊνικού μορίου. Η UniProt-GOA είναι βάση δεδομένων συσχέτισης της αλληλουχίας και της λειτουργίας του πρωτεϊνικού μορίου. Η STRING είναι βάση δεδομένων συσχέτισης των αλληλεπιδράσεων τύπου «πρωτεΐνη-πρωτεΐνη» και της λειτουργίας του πρωτεϊνικού μορίου.

Ως αποτέλεσμα παρουσιάζονται τα πέντε (5) καλύτερα ομόλογα ένζυμα που ανιχνεύονται στην PDB. Επίσης, παρατίθενται τα καταλυτικά κατάλοιπα της προς μελέτη πρωτεΐνης τα οποία προβλέπονται με βάση την αντιστοιχία ενεργής θέσης των πέντε (5) προτεινόμενων πρωτεϊνών και της προς μελέτη πρωτεΐνης (**Εικόνα 19**).



**Εικόνα 19** Αριθμός E.C. και ενεργές θέσεις

Ενθαρρυντική είναι η παρατήρηση πως οι πέντε (5) προτεινόμενες πρωτεΐνες του αποτελέσματος, συμπίπτουν με τις δέκα (10) καλύτερες προτεινόμενες πρωτεΐνες που δόθηκαν ως αποτέλεσμα του threading.

**Η επεξεργασία των μελετών αμινοξικής και δομικής στοίχισης, πρόβλεψης επικρατειών με threading και μοντελοποίησης ομολογίας ανέδειξαν το τμήμα 40-400 αμινοξέα πως αντιστοιχεί στην επικράτεια γλυκοαμυλάσης.**

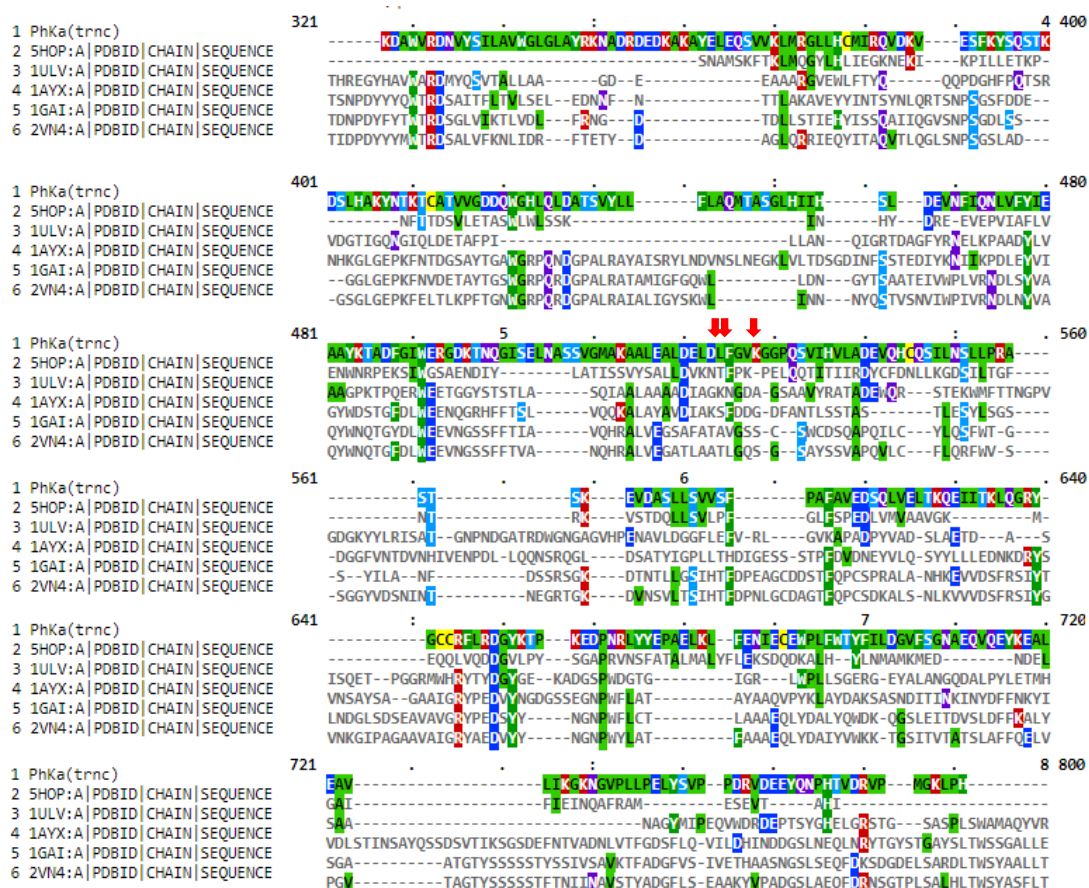


### 5.1.4. Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών (Multiple Sequencing Alignment, MSA)

Έγινε πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών της PhKa<sub>trnc</sub> με τις αλληλουχίες των πρωτεϊνών με PDB IDs : 1ayx, 1gai, 1ulv, 2vn4 και 5hop (**Εικόνα 20**).

Το βήμα αυτό εξυπηρετεί στον εντοπισμό των συντηρημένων καταλοίπων μεταξύ των γλυκοαμυλασών που πιθανώς έχουν δομική και λειτουργική σημασία και δεν πρέπει να αποτελέσουν στόχο των επικείμενων μεταλλάξεων. Επίσης, μέσω του MSA είναι δυνατή η ταυτοποίηση των πιθανών καταλυτικών κατάλοιπων στην αλληλουχία της PhKa<sub>trnc</sub>.

Η πολλαπλή στοίχιση έγινε με το πρόγραμμα CLUSTAL OMEGA και η απεικόνιση της στοίχισης έγινε με το πρόγραμμα MVIEW.



**Εικόνα 20** Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών. Ο χρωματισμός έχει γίνει με βάση την ταυτότητα των αμινοξέων.

Τα αποτελέσματα του MSA, σε συνδυασμό με τα δεδομένα του I-TASSER, υποδεικνύουν, αρχικά, πως τα προβλεπόμενα καταλυτικά κατάλοιπα είναι τα E146

και E332. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν πως τα κατάλοιπα που συμμετέχουν στην κατάλυση είναι δύο γλουταμινικά που απέχουν μεταξύ τους περίπου 200 θέσεις. Επιπλέον, είναι ευδιάκριτος μέσω του αποτελέσματος ο εντοπισμός των καλώς συντηρημένων αμινοξέων.

Επομένως, με τα παρόντα δεδομένα προτείνονται τα κατάλοιπα L178, F179 και K182 ως κατάλοιπα- στόχοι για μετάλλαξη (κόκκινα βέλη).

### 5.1.5. Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων

Με το πρόγραμμα Coot ελέγχθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των καταλοίπων που στοχεύονται για μετάλλαξη με τα κατάλοιπα του περιβάλλοντός τους. Επιπλέον, *in silico*, τα κατάλοιπα μεταλλάχθηκαν και ελέγχθηκε επίσης η αλληλεπίδρασή τους με τα περιβάλλοντα αμινοξέα. Και στις δύο περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση με τα προβλεπόμενα καταλυτικά αμινοξέα της PhKa<sub>trnc</sub>.

### 5.1.6. Σχεδιασμός μεταλλάξεων

Όσον αφορά τη δημιουργία των πρωτεϊνικών μεταλλαγμάτων που πιθανώς να έχουν αυξημένη διαλυτότητα σε σχέση με το αρχικό πρωτεϊνικό μόριο, μετά από εξέταση των κριτηρίων που πρέπει να πληρούν τα κατάλοιπα-στόχοι, έλεγχο βελτιστοποίησης της διαλυτότητας με τα αντίστοιχα προγράμματα, και έλεγχο αλληλεπίδρασης με τα περιβάλλοντα αμινοξέα, αποφασίστηκε η δημιουργία των παρακάτω μεταλλάξεων σε ένα τριπλό μετάλλαγμα:

- L178D
- F179D
- K182D

Όντως, αυτό το *in silico* σχεδιασμένο μόριο έδειξε μεγαλύτερη πιθανότητα διαλυτότητας όταν ελέγχθηκε με τα προγράμματα Protein-Sol και CamSol Instruct. Σύμφωνα με το πρώτο πρόγραμμα η διαλυτότητα αυξήθηκε περίπου στο 0.2, ενώ το νέο σκορ που υπολόγισε το Protein-Sol είναι 0.538.

Επιπρόσθετα, η μεταλλαγμένη αμινοξική αλληλουχία εξετάστηκε για την πρόβλεψη δομής και λειτουργίας με το πρόγραμμα I-TASSER. Ενθαρρυντική είναι η παρατήρηση πως δεν υπάρχουν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων του I-TASSER για την αγρίου τύπου και τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη.

Πιο συγκεκριμένα, αφού πραγματοποιήθηκε threading προτάθηκαν πάλι ως τα δέκα καλύτερα templates που αντιστοιχούν σε υδρολάσες (**Εικόνα 21A**). Επιπλέον, και τα αποτελέσματα για τις πρωτεΐνες που είναι δομικά εγγύτερες στην πρωτεΐνη στόχο είναι ανάλογα με τα αποτελέσματα που είχαν προκύψει κατά τη μελέτη του μη μεταλλαγμένου μορίου (**Εικόνα 21B**). Τέλος, δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα προτεινόμενα καταλυτικά αμινοξέα (**Εικόνα 21Γ**).

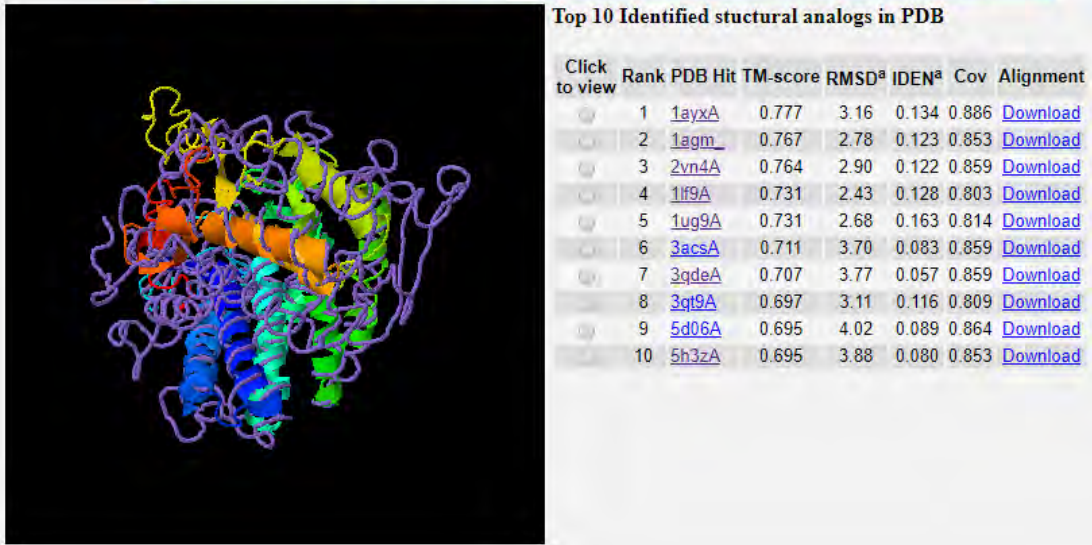
A

### Top 10 threading templates used by I-TASSER

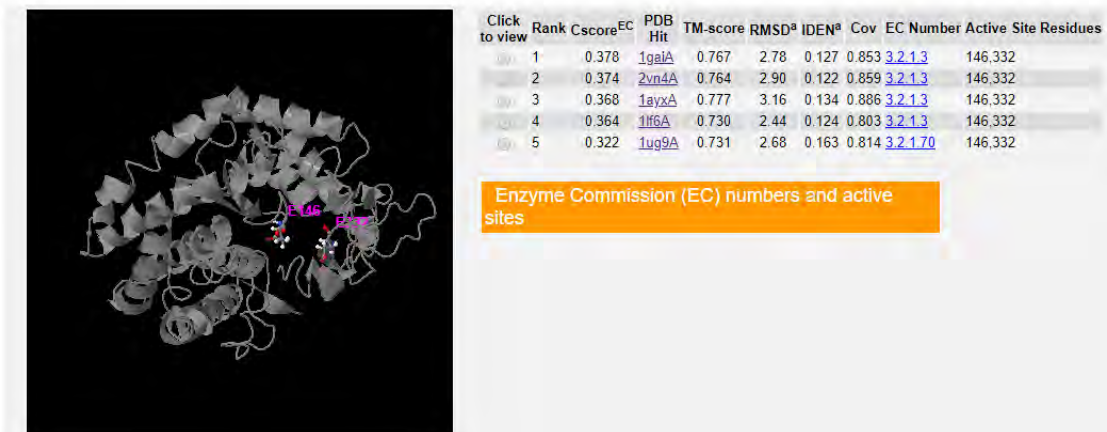
Rank	PDB Hit	Iden1	Iden2	Cov	Norm. Z-score	Download Align.	Sec.Str Seq
1	<a href="#">1js4A</a>	0.10	0.16	0.89	0.46	<a href="#">Download</a>	CCCSSCC <del>HHHHHHHHHH</del> KDAWVRD <del>NVYSILAVWGL</del>
2	<a href="#">1gaiA</a>	0.13	0.19	0.87	2.44	<a href="#">Download</a>	GLG <del>WVKFGFPMAFTATML</del>
3	<a href="#">1lf6A</a>	0.15	0.26	0.81	1.04	<a href="#">Download</a>	FYT <del>WRD</del> SGLV <del>IKTLVDL</del>
4	<a href="#">2vn4</a>	0.14	0.19	0.81	3.24	<a href="#">Download</a>	HLV <del>SRD</del> LYHVANAF <del>IAA</del>
5	<a href="#">5hop</a>	0.14	0.15	0.63	2.75	<a href="#">Download</a>	Y <del>MMWRD</del> SALV <del>FKNLIDE</del>
6	<a href="#">1gaiA</a>	0.13	0.19	0.82	1.14	<a href="#">Download</a>	-----SKFTKL-Q---
7	<a href="#">5hop</a>	0.13	0.15	0.51	4.21	<a href="#">Download</a>	FYT <del>WRD</del> SGLV <del>IKTLVDL</del>
8	<a href="#">1lf6A</a>	0.17	0.26	0.74	1.61	<a href="#">Download</a>	-----
9	<a href="#">1gaiA</a>	0.14	0.19	0.86	0.66	<a href="#">Download</a>	HLV <del>SRD</del> LYHVANAF <del>IAA</del>
10	<a href="#">1ug9A</a>	0.16	0.24	0.91	1.46	<a href="#">Download</a>	FYT <del>WRD</del> SGLV <del>IKTLVDL</del>
							DAPATSTGALRTQYDVSL

**B**

Proteins structurally close to the target in the PDB (as identified by TM-align)

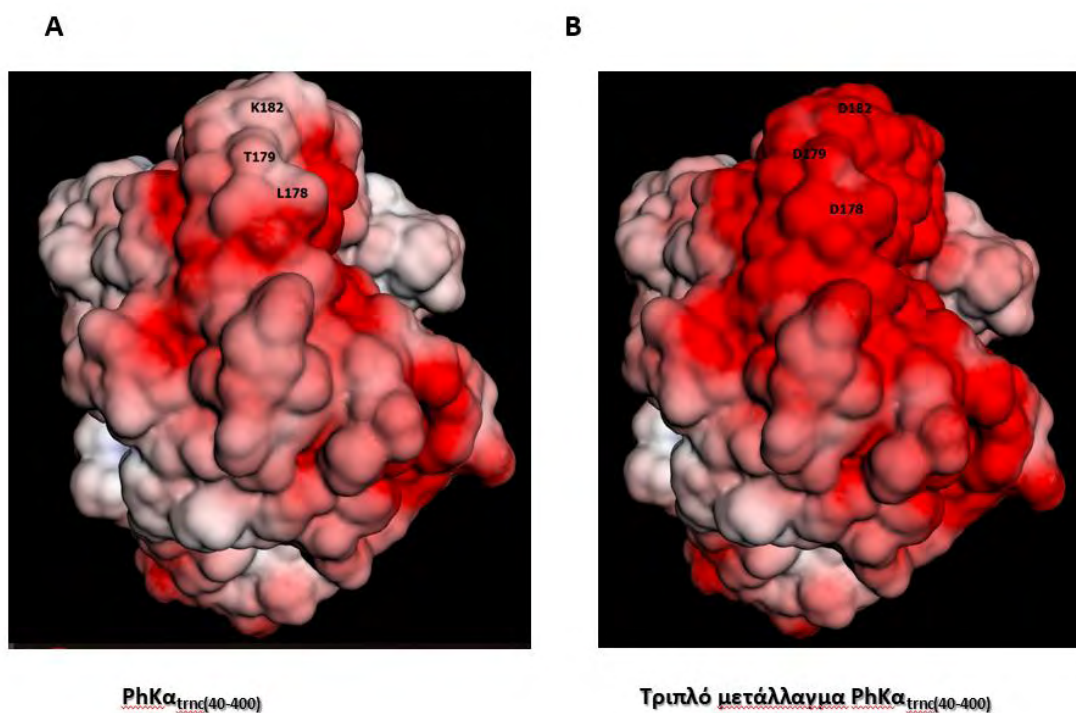


**Γ**



**Εικόνα 21** Αποτελέσματα I-TASSER για το προτεινόμενο μεταλλαγμένο πρωτεϊνικό μόριο

Τέλος, ελέγχθηκε η διαφορά στο ηλεκτροστατικό δυναμικό των δύο μορίων, του αρχικού πρωτεϊνικού μορίου της RhKa<sub>trnc</sub> και του τριπλού μεταλλάγματος (Εικόνα 22). Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PyMol με τη βοήθεια της επέκτασης APBS.



**Εικόνα 22 Ηλεκτροστατικό δυναμικό του μορίου πριν και μετά τις *in silico* μεταλλάξεις.** Παρατηρείται πως το φορτίο γίνεται πιο αρνητικό, γεγονός που ευνοεί την αύξηση της διαλυτότητας του μορίου.

Παρατηρείται πως όντως μετά την εφαρμογή των μεταλλάξεων υπάρχει διαφορά στο φορτίο της επιφάνειας του πρωτεϊνικού μορίου. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αποτελεσματικότητα της έκφρασης διαλυτής πρωτεΐνης είναι αντιστρόφως ανάλογη της παρουσίας μεγάλων περιοχών θετικού φορτίου στην επιφάνεια των πρωτεϊνών (Chan, Curtis, & Warwicker, 2013; Kramer et al., 2012).

## 5.2. Τεχνικές Κλωνοποίησης

### 5.2.1. Ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου της PhKa (PhKa<sub>trnc</sub>)

Το πρώτο βήμα του πειράματος ήταν η κατασκευή του τμήματος προς ένθεση στους κατάλληλους φορείς με τη δημιουργία κατάλληλων εκκινητών, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οι εκκινητές προσδίδουν σε κάθε τμήμα που ενισχύεται τα κατάλληλα άκρα που θα επιτρέπουν τη σύνδεση στο φορέα με τη χρήση του κατοχυρωμένου από την εταιρεία Clonetech ενζύμου in-fusion.

Τα δείγματα φορτώθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%.

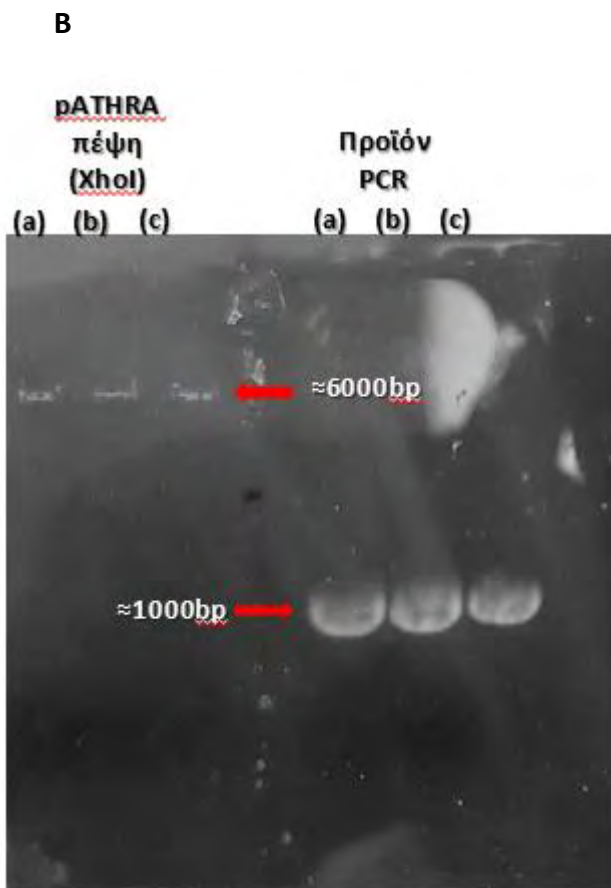
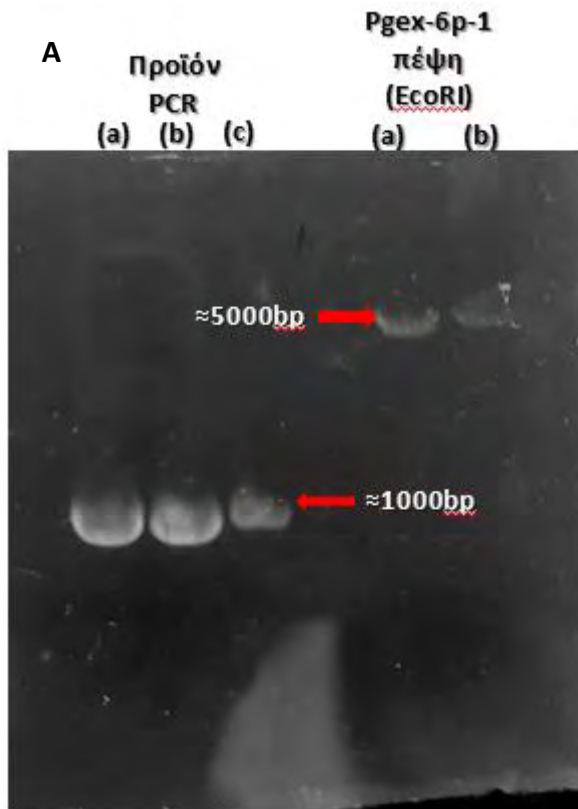
Το μήκος του PhKa<sub>trnc</sub> αναμένεται να έχει βάρος περίπου 1083bp ενώ προστίθενται σε αυτό και οι βάσεις των εκκινητών (**Εικόνα 23**).

### 5.2.2. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Ταυτόχρονα, οι πλασμιδιακοί φορείς pGEX-6P-1 και pATHRA κόπηκαν με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ώστε να ευθυγραμμιστούν.

Τα δείγματα φορτώθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Το αναμενόμενο μοριακό βάρος του φορέα pGEX-6P-1 είναι 4984bp και του φορέα pATHRA είναι 5708bp (**Εικόνα 23**).



Εικόνα 23 Πήκτωμα αγαρόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση (A) προϊόντων PCR με χρήση κατάλληλων εκκινητών για ένθεση στο φορέα pGEX-6P-1 (αριστερά) και του φορέα pGEX-6P-1 μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI (δεξιά) και (B) προϊόντων PCR με χρήση κατάλληλων εκκινητών για ένθεση στο φορέα pATHRA (δεξιά) και του φορέα pATHRA μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση XhoI (αριστερά). Παρατηρείται πως τόσο τα προϊόντα PCR, όσο και οι πλασμιδιακοί φορείς έχουν τα αναμενόμενα μοριακά βάρη. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (Ladder) είναι ο RTU DNA Ladder της Nippon Genetics.

### 5.2.3. Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού – In-fusion

Μετά την ηλεκτροφόρηση των τμημάτων σε πηκτή αγαρόζης 1% όπως περιγράφηκε παραπάνω, ακολούθησε εξαγωγή του DNA από την πηκτή, σύμφωνα με το πρωτόκολλο NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, της εταιρίας Machenery- Nagel. Η συγκέντρωση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν μετρήθηκε στο NanoDrop (**Πίνακας 10**).

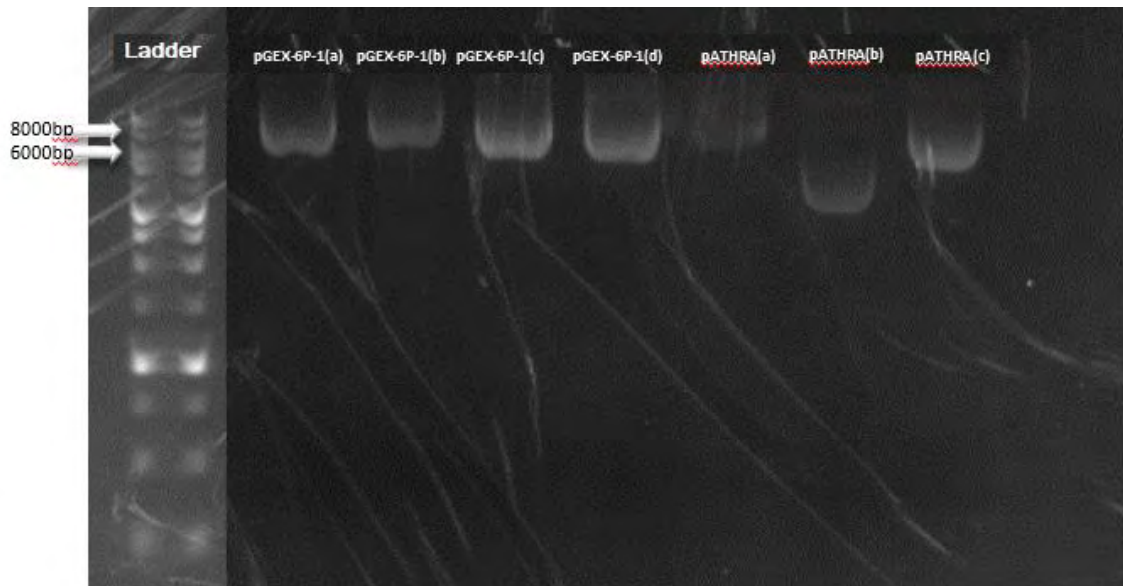
**Πίνακας 10** Συγκεντρώσεις δειγμάτων μετά από τη διαδικασία εξαγωγής του DNA από πηκτή αγαρόζης 1%

	Συγκέντρωση (ng/μL)
pGEX-6P-1 πέψη	30.7
Προϊόν PCR για ένθεση σε pGEX-6P-1	65
pATHRA πέψη	12.7
Προϊόν PCR για ένθεση σε pATHRA	138

Στη συνέχεια, έγινε η αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού In-fusion όπως περιγράφηκε παραπάνω (**4.2.5. Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού – In-fusion**). Επόμενα βήματα ήταν ο μετασηματισμός βακτηρίων *E.coli* XL1 Blue, η απομόνωση πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα και ο έλεγχος.

Ο έλεγχος της επιτυχίας της κλωνοποίησης έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% των δειγμάτων που είχαν προκύψει. Αναμένεται πως ύστερα από μια πετυχημένη αντίδραση In-fusion, ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P-1 θα έχει μοριακό βάρος 6067bp και ο πλασμιδιακός φορέας pATHRA θα έχει μοριακό βάρος 6791bp (**Εικόνα 24**).





**Εικόνα 24** Πήκτωμα αγαρόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που προέκυψαν από την αντίδραση In-fusion. Παρατηρείται πως οι κλώνοι a-d του pGEX-6P-1 είναι θετικοί και έχουν το αναμενόμενο μοριακό βάρος. Αντίθετα, μόνο οι κλώνοι a και c του pATHRA είναι θετικοί και έχουν το αναμενόμενο μοριακό βάρος, ενώ ο κλώνος b μάλλον είναι αρνητικός. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (Ladder) είναι ο RTU DNA Ladder της Nippon Genetics.

#### 5.2.4. Αλληλούχηση

Εφόσον ταυτοποιήθηκε πως οι φορείς έχουν κλωνοποιηθεί, επιλέχθηκε ένας κλώνος από τον κάθε πλασμιδιακό φορέα για να σταλεί για αλληλούχηση.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης παρατίθενται στο Παράρτημα (βλέπε παράγραφο Αποτελέσματα αλληλούχησης).

Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε εύκολα πως ο pGEX-6P-1 είχε εντεθεί με ορθό τρόπο το τμήμα της  $RhK_{\alpha_{trnc}}$ . Αντίθετα, τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του φορέα pATHRA δεν ήταν ευδιάκριτα. Η ασάφεια πιθανώς να οφείλεται στην ποσότητα του δείγματος που στάλθηκε, καθώς σύμφωνα με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, φαίνεται πως ο κλώνος a και c είναι θετικοί.

## 5.3. Μελέτες έκφρασης

### 5.3.1. Ανάπτυξη κυττάρων

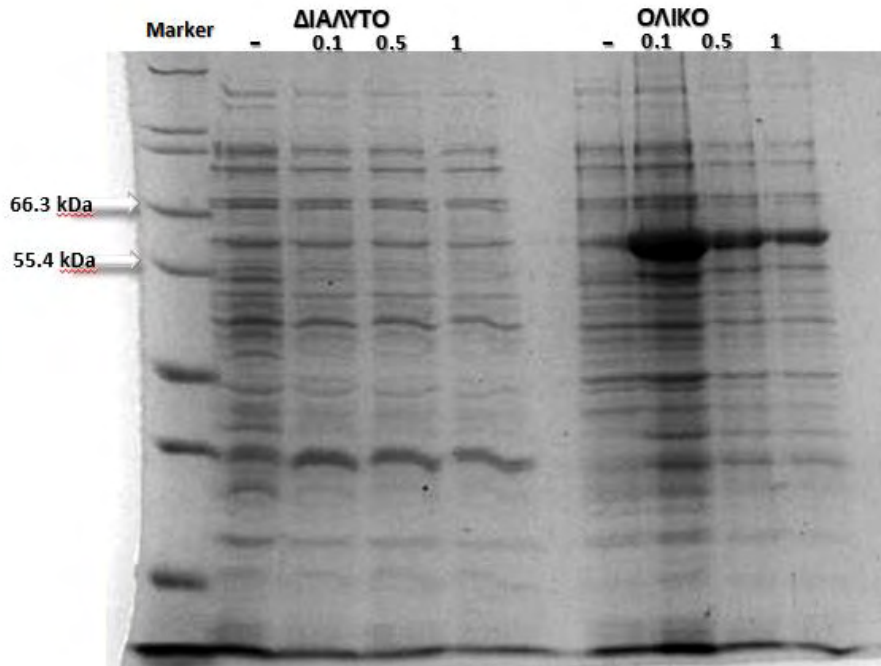
Η ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών BL21-Gold (DE3) και B834(DE3)-pLySs στις υγρές καλλιέργειες LB Broth ήταν επιτυχής.

Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε είναι αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 50μg/ml και στα B834pLySs προστέθηκε επιπλέον χλωραμφαινικόλη σε τελική συγκέντρωση 34μg/ml καθώς το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας και σε αυτό το αντιβιοτικό. Οι συγκεκριμένες μελέτες πραγματοποιήθηκαν στα πλασμίδια pGEX-6P-1 και pATHRA με τμήμα (αμινοξέα 40-400) του βελτιστοποιημένου γονιδίου PhKa.

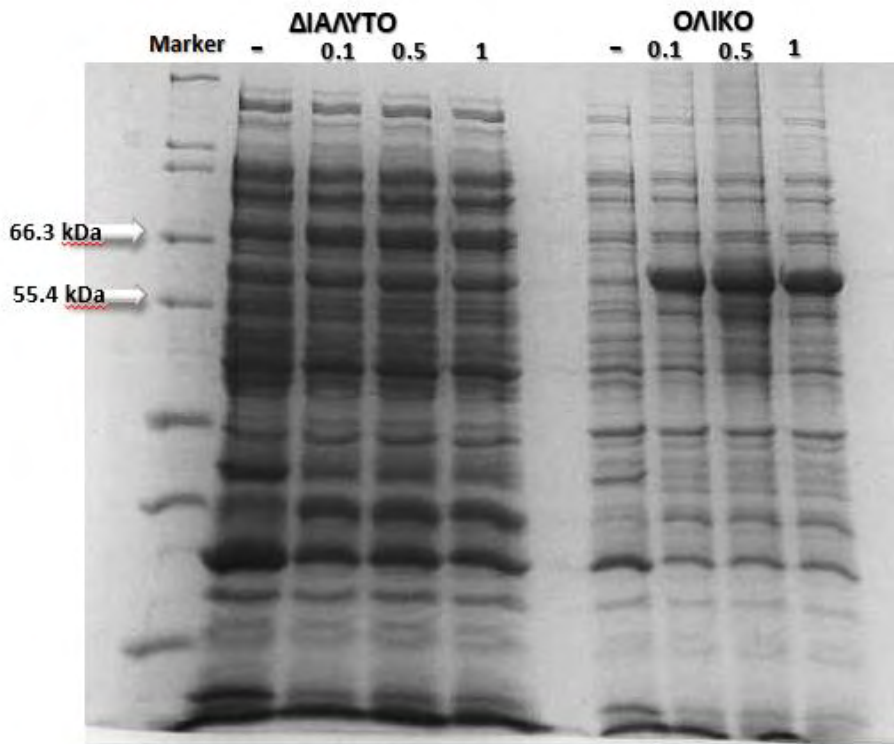
### 5.3.2. Επαγωγή υπερέκφρασης στους 37°C

Η επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης έγινε με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων IPTG. Ανάλογα με την συγκέντρωση του επαγωγέα παρασκευάστηκαν τα δείγματα “control, -”, “0.1”, “0.5” και “1”, χωρίς προσθήκη επαγωγέα, με IPTG 0.1mM, 0,5mM και 1mM, αντίστοιχα. Με κατεργασία των δειγμάτων όπως περιγράφηκε παραπάνω, προέκυψαν δείγματα που περιείχαν τα διαλυτά στοιχεία του βακτηριακού λύματος, και δείγματα που περιείχαν το ολικό βακτηριακό λύμα.

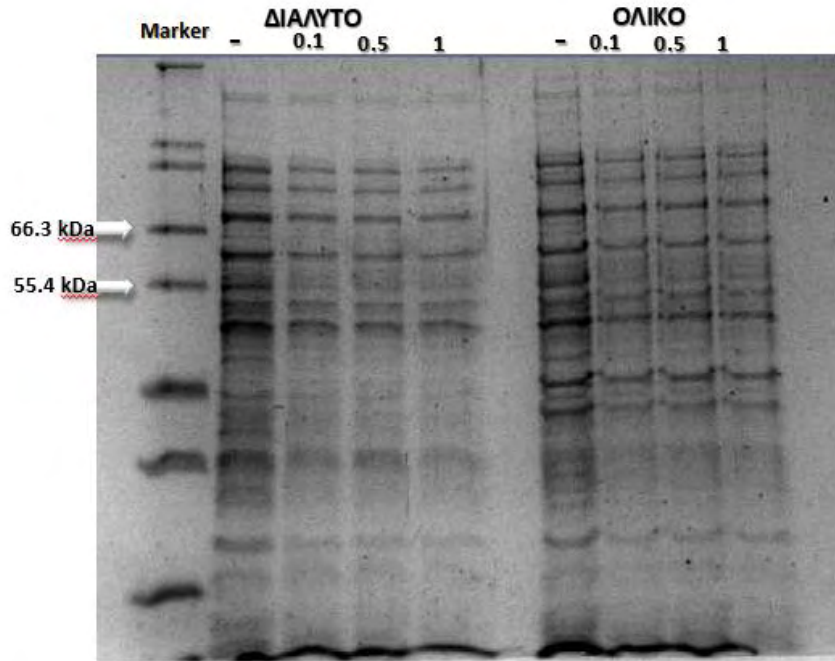
Ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10%, έως ότου το μέτωπο των χρωστικών ηλεκτροφόρησης να πλησιάσει το τέλος της πηκτής. Η διαμόρφωση των πηκτών είναι τέτοια ώστε να μπορούν να συγκριθούν τα ολικά και τα διαλυτά δείγματα, ώστε να είναι δυνατό να προκύψει ποσοστό διαλυτότητας επί του μη διαλυτού (**Εικόνα 25-28**). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη PhKa<sub>trnc</sub> αναμένεται να έχει μοριακή μάζα περίπου 40.7 kDa, ενώ μαζί με την ετικέτα GST που προστίθεται χάρη στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P-1 (26kDa) θα φτάσει περίπου τα 67kDa (**Εικόνα 25Εικόνα 26**). Ο πλασμιδιακός φορέας pATHRA προσθέτει ετικέτα αγχιστείας έξι (6) ιστιδινών (6His) που αυξάνει τη μοριακή μάζα της πρωτεΐνης κατά 1kDa (**Εικόνα 27Εικόνα 28**).



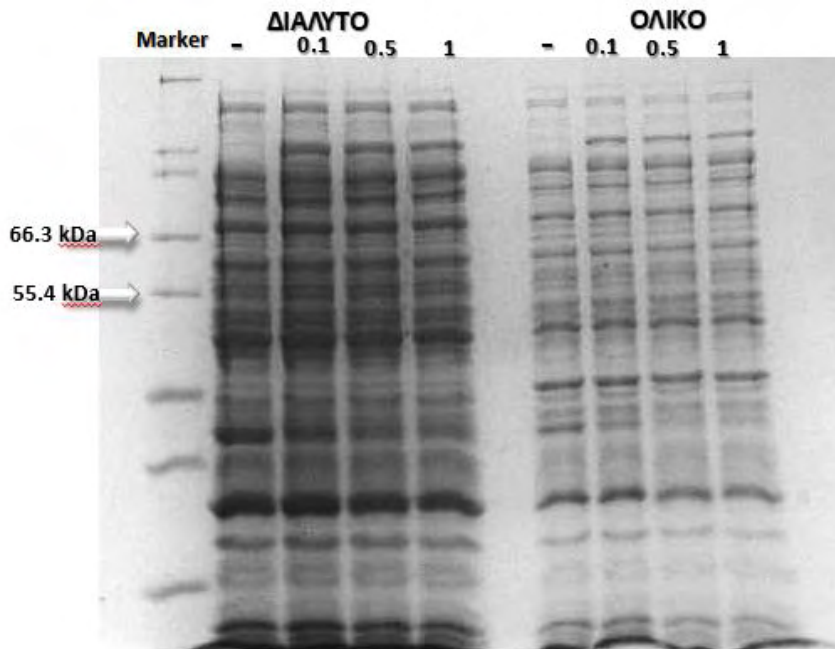
Εικόνα 25 Πήκτωμα ακρυλαμιδίου 10% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της μετασηματισμένης με πλασμιδιακό φορέα rGEX-6P-1, κυτταρικής σειράς BL21-Gold. Παρατηρείται πως η πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε στο αδιάλυτο (ολικό) κομμάτι



Εικόνα 26 Πήκτωμα ακρυλαμιδίου 10% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της μετασηματισμένης με πλασμιδιακό φορέα rGEX-6P-1, κυτταρικής σειράς B843pLySs. Παρατηρείται πως η πρωτεΐνη υπερεκφράστηκε στο αδιάλυτο (ολικό) κομμάτι



Εικόνα 27 Πήκτωμα ακρυλαμιδίου 10% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της μετασηματισμένης με πλασμιδιακό φορέα pATHRA, κυτταρικής σειράς BL21-Gold. Δεν παρατηρείται υπερέκφραση της πρωτεΐνης ούτε στο διαλυτό ούτε στο αδιάλυτο (ολικό) κομμάτι.



Εικόνα 28 Πήκτωμα ακρυλαμιδίου 10% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων της μετασηματισμένης με πλασμιδιακό φορέα pATHRA, κυτταρικής σειράς B834-pLySs. Δεν παρατηρείται υπερέκφραση της πρωτεΐνης ούτε στο διαλυτό ούτε στο αδιάλυτο (ολικό) κομμάτι.

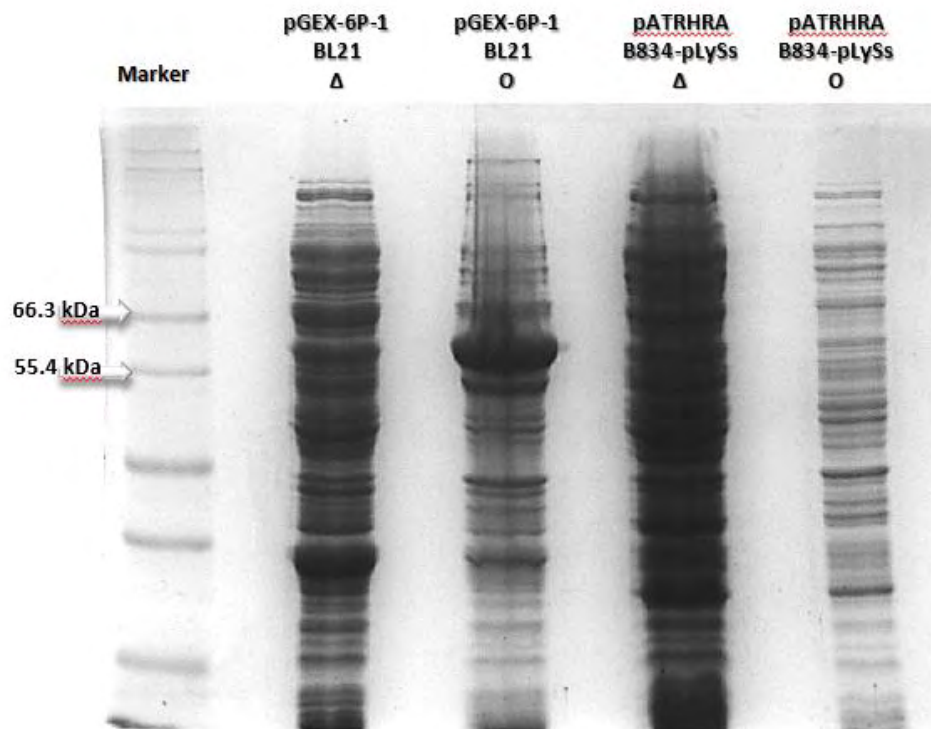
Από τα αποτελέσματα γίνεται σαφές πως στα κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με το φορέα pGEX-6P-1, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη υπερεκφράζεται, αλλά υπερεκφράζεται στο αδιάλυτο κομμάτι, πιθανώς με τη μορφή έγκλειστων σωματίων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η επαγωγή της έκφρασης επιτεύχθηκε σε μόλις 0.1 mM επαγωγέα IPTG.

Όσον αφορά τα μετασχηματισμένα κύτταρα από τον πλασμιδιακό φορέα pATHRA, σε αυτά δεν παρατηρείται καθόλου έκφραση της πρωτεΐνης. Παρότι η ηχητική αгарόζης έδειξε να υπάρχει ένθεμα, εντούτοις κατά τον έλεγχο έκφρασης δεν παρατηρήθηκε το επιθυμητό πρωτεϊνικό προϊόν.

### 5.3.3. Επαγωγή υπερέκφρασης στους 18°C

Έπειτα από τις παρατηρήσεις που προήλθαν από την επαγωγή της υπερέκφρασης στους 37°C, αποφασίστηκε η πραγματοποίηση επαγωγή της υπερέκφρασης στους 18°C για συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Η πειραματική διαδικασία αφορούσε μόνο την κυτταρική σειρά BL-21 Gold που μετασχηματίστηκε με pGEX-6P-1 και την κυτταρική σειρά B834-pLySs που μετασχηματίστηκε με το φορέα pATHRA. Η μείωση της θερμοκρασίας, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αποτελεί μάλλον τον πιο εύκολο και πετυχημένο τρόπο λήψης ενός πρωτεϊνικού προϊόντος στη διαλυτή του μορφή (Duong-Ly & Gabelli, 2014a). Επίσης, καθώς διαπιστώθηκε πως υπάρχει επιτυχής επαγωγή έκφρασης με χρήση 0.1 mM, η επαγωγή της έκφρασης στους 18°C, δεν έγινε με διάφορες συγκεντρώσεις IPTG, αλλά μόνο με 0.1mM επαγωγέα.

Η πειραματική διαδικασία είναι η ίδια με αυτήν κατά την επαγωγή στους 37°C και έχει περιγραφτεί παραπάνω. Τα δείγματα που προέκυψαν φορτώθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 10% και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση έως ότου το μέτωπο των χρωστικών ηλεκτροφόρησης να πλησιάσει το τέλος της πηκτής. Τα δείγματα φορτώθηκαν με τρόπο τέτοιο ώστε να μπορεί να υπολογιστεί ποσοστό διαλυτότητας της πρωτεΐνης – στόχου (**Εικόνα 29**)



**Εικόνα 29** Πήκωμα ακρυλαμιδίου 10% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που προέκυψαν από την επαγωγή της υπερέκφρασης στους 18°C. Παρατηρείται υπερέκφρασης της πρωτεΐνης στο αδιάλυτο (ολικό, O) κομμάτι του λύματος της κυτταρικής σειράς BL21-Gold. Δεν παρατηρείται έκφραση της πρωτεΐνης ούτε στο διαλυτό ούτε στο αδιάλυτο κομμάτι της κυτταρικής σειράς B834-pLySs.

Τα αποτελέσματα έδειξαν υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στην κυτταρική σειρά BL21-Gold στο αδιάλυτο κομμάτι, αλλά απουσία έκφρασης στην κυτταρική σειρά B834-pLySs. Η τελευταία παρατήρηση πιθανώς υποδηλώνει κάποιο λάθος κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης και υποδεικνύει ανάγκη επανάληψης της πειραματικής διαδικασίας.

## Ετερόλογη έκφραση – Σύστημα έκφρασης *E.coli*

### 1. Το βακτήριο *Escherichia coli* ως σύστημα έκφρασης

Γενικά, τα βακτηριακά συστήματα έκφρασης είναι ιδιαίτερα ελκυστικά για την έκφραση ετερόλογων γονιδίων τόσο προκαρυωτικής όσο και ευκαρυωτικής προέλευσης. Το σύστημα του Gram- αρνητικού βακτηρίου *E.coli* είναι από τα πιο δημοφιλή συστήματα παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε φθηνά μέσα υπό καλά καθορισμένες εργαστηριακές συνθήκες και έχει πολύ μικρό χρόνο διπλασιασμού, περίπου 20 λεπτά. Εξαιτίας αυτής της ταχείας αύξησης, η επιλογή των μεταλλαγμάτων είναι εύκολη και βολική. Επιπλέον, τα κύτταρα *E. coli* έχουν υψηλά ποσοστά ενσωμάτωσης του ξένου DNA και μπορούν να εκφράζουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με πολύ υψηλό ρυθμό (Kaur et al., 2018). Στα πλεονεκτήματα της χρήσης αυτού του συστήματος περιλαμβάνεται και ο πλούτος πληροφοριών που αφορούν τόσο τη γενετική όσο και τη φυσιολογία αυτού του βακτηρίου καθώς την επιρροή γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων στην έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών.

Ωστόσο, η χρήση αυτού του συστήματος έχει διάφορους περιορισμούς. Πρώτος και κυριότερος περιορισμός είναι η αδυναμία του *E.coli* να πραγματοποιεί πολύπλοκες μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις τυπικές για τους ευκαρυώτες όπως γλυκοσυλιώσεις, φωσφορυλιώσεις, πρωτεολυτικές επεξεργασίες κ.ά., που μπορεί να επηρεάσουν τη βιοδραστικότητα, τη δομή, τη λειτουργία, τη διαλυτότητα, τη σταθερότητα και το χρόνο ημιζωής του μορίου. Ένα άλλο μειονέκτημα στη χρήση αυτού του συστήματος είναι η περιορισμένη ικανότητα να διευκολύνει τον εκτενή σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που εκφράζονται στο *E.coli* τείνουν να διατηρούν την αμινοτελική μεθειονίνη, γεγονός το οποίο, επίσης, μπορεί να επηρεάσει την σταθερότητα του πρωτεϊνικού προϊόντος. Επιπρόσθετα, ορισμένες πρωτεΐνες στόχοι είναι πιθανό να εκφραστούν στην αδιάλυτη μορφή τους εξαιτίας κακής αναδίπλωσης λόγω έλλειψης των κατάλληλων μοριακών συνοδών σε αυτό το σύστημα (Yin, Li, Ren, & Herrler, 2007). Τέλος, μπορεί το βακτήριο να μην είναι ικανό να «διαβάσει» κάποιες τριπλέτες των ευκαρυωτών και να μην επιτυγχάνεται υπερέκφραση του επιθυμητού μορίου (Kaur et al., 2018).

## **2. Παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών στο σύστημα *E.coli***

Στους διαφορετικούς ξενιστές, η έκφραση των πρωτεϊνών ελέγχεται από διάφορους εσωτερικούς παράγοντες.

### **Μέγεθος ετερόλογης πρωτεΐνης**

Οι πρωτεΐνες με μοριακό βάρος μικρότερο από 100kDa είναι καλά ανεκτές στο *E. coli* και ως εκ τούτου εκφράζονται σε σημαντικά επίπεδα. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες που υπερβαίνουν τα 100 kDa δεν είναι σε θέση να εκφραστούν σωστά στο βακτήριο και κατά συνέπεια αποικοδομούνται ή υποβάλλονται σε πρόωρο τερματισμό της έκφρασής τους. Για αυτά τα μόρια προτιμάται διαφορετικό σύστημα έκφρασης. Από την άλλη πλευρά, μικρές πρωτεΐνες και πεπτίδια (<10kDa) είναι δύσκολο να εκφραστούν σταθερά στο *E. coli* λόγω της λανθασμένης αναδίπλωσής τους και συχνά υπόκεινται σε πρωτεολυτική αποικοδόμηση (Kaur et al., 2018).

### **Πρόβλημα συχνότητας εμφάνισης κωδικονίων (*codon biasing*)**

Ο γενετικός κώδικας χρησιμοποιεί 61 τριπλέτες νουκλεοτιδίων (κωδικόνια) τα οποία κωδικοποιούν 20 αμινοξέα και τρία κωδικόνια λήξης. Κάθε αμινοξύ μπορεί να κωδικοποιείται από ένα (μεθειονίνη, τρυπτοφάνη) έως και έξι (αργινίνη, λευκίνη και σερίνη) συνώνυμα κωδικόνια. Αυτά τα κωδικόνια «διαβάζονται» στο ριβόσωμα από συμπληρωματικά tRNAs που είναι φορτωμένα με το κατάλληλο αμινοξύ. Ο εκφυλισμός του γενετικού κώδικα συνεπάγεται πολλές εναλλακτικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες να κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη. Η συχνότητα με την οποία χρησιμοποιούνται τα διαφορετικά κωδικόνια ποικίλλει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, μεταξύ πρωτεϊνών που εκφράζονται σε υψηλά ή χαμηλά επίπεδα, εντός του ίδιου οργανισμού και μερικές φορές ακόμη και εντός του ίδιου οπερονίου (Gouy & Gautier, 1982).

Σε συνθήκες ετερόλογης έκφρασης, το περιβάλλον του ξενιστή είναι τελείως διαφορετικό. Η έκφραση λειτουργικών πρωτεϊνών σε ετερόλογο ξενιστή αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο της σύγχρονης βιοτεχνολογίας (Gustafsson et al., 2004). Δυστυχώς, οι πρωτεΐνες είναι συχνά δύσκολο να εκφραστούν έξω από τις φυσικές τους συνθήκες. Μπορεί να περιέχουν κωδικόνια που σπάνια χρησιμοποιούνται από τον ξενιστή, που προέρχονται από οργανισμούς που χρησιμοποιούν μη- κανονικό κώδικα ή μπορεί να περιέχουν ρυθμιστικά στοιχεία περιορισμού της έκφρασης εντός της κωδικοποιούσας αλληλουχίας. Στην ετερόλογη έκφραση, ο ξενιστής αναγκάζεται να εκφράσει συγκεκριμένη πρωτεΐνη για την οποία δε διαθέτει αφθονία tRNA, καθώς η συχνότητα εμφάνισης των κωδικονίων αντανάκλα την αφθονία των αντίστοιχων tRNAs. Επομένως, εάν το mRNA του ανασυνδυασμένου γονιδίου περιέχει «σπάνια»



κωδικόνια, τότε είναι πιθανό να προκύψουν προβλήματα κατά τη μετάφραση. Αυτά τα προβλήματα μπορεί να αφορούν παύση της μετάφρασης, τερματισμό της πρώιμης μετάφρασης με αποτέλεσμα τη δημιουργία ποικιλίας προϊόντων πρωτεϊνών με ελλιπή κομμάτια (truncated), μετατόπιση του πλαισίου μετάφρασης και λανθασμένες ενσωματώσεις αμινοξέων (Kane, 1995).

Οι τριπλέτες των κωδικονίων που δεν χρησιμοποιούνται συχνά από την *Escherichia coli* παρατίθενται παρακάτω (Πίνακας 11) (S. Zhang, Zubay, & Goldman, 1991).

Πίνακας 11 (Zhang *et al.*, 1991)

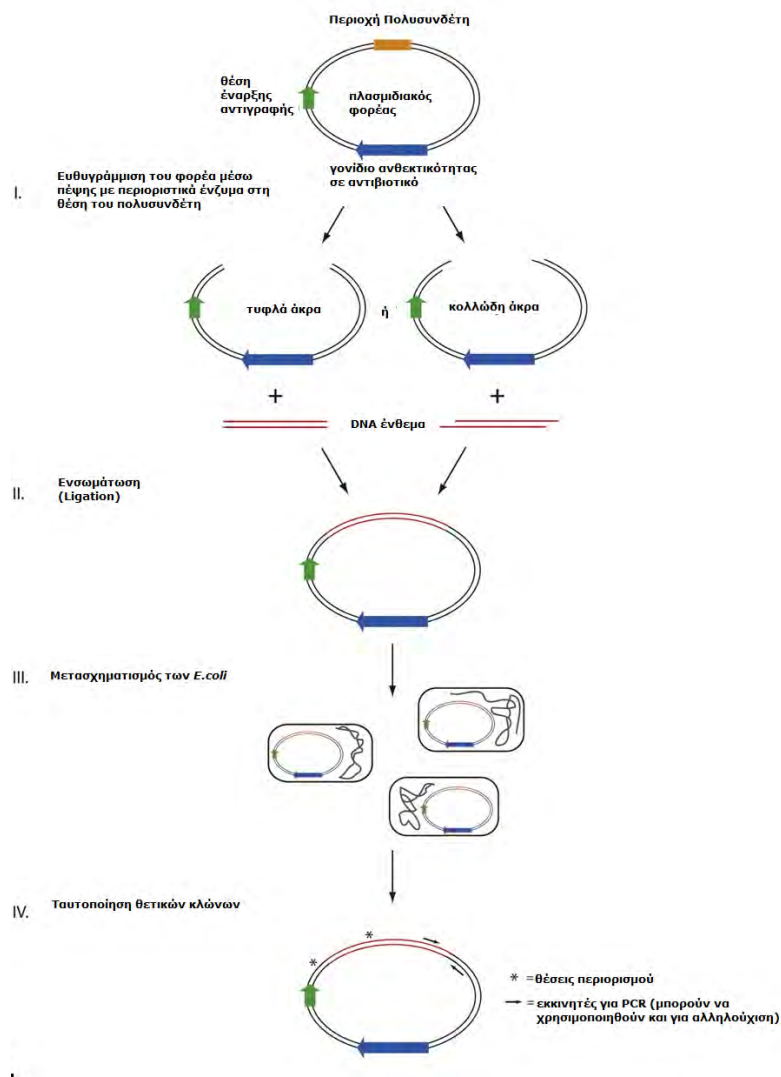
AGG	
AGA	
CGG	Αργινίνη (Arg, R)
CGA	
GGA	Γλυκίνη (Gly, G)
AUA	Ισολευκίνη (Ile, I)
CUA	Λευκίνη (Leu, L)
CCC	Προλίνη (Pro, P)

Το *Escherichia coli* μπορεί να είναι το πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα έκφρασης για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για δομικές και λειτουργικές μελέτες, ωστόσο υπάρχουν σημαντικές προκλήσεις σε αυτή τη διαδικασία. Η κυριότερη ο σχηματισμός αδιάλυτων συσσωματωμάτων, που ονομάζονται έγκλειστα σωμάτια (inclusion bodies). Έχει διαπιστωθεί πως το περισσότερο από το 30% των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που εκφράζονται σε *E. Coli* είναι αδιάλυτες (Leibly *et al.*, 2012). Είναι φανερό λοιπόν πως η παραγωγή διαλυτών πρωτεϊνών στο *E. Coli* εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στον ερευνητικό τομέα της δομικής βιολογίας (Paraneophytou & Kontopidis, 2014).

### 3. Τεχνολογία Ανασυνδυασμένου DNA

Η μοριακή κλωνοποίηση είναι μια βασική τεχνική για την δημιουργία των πειραματικών εργαλείων που βασίζονται στο DNA για την έκφραση τους σε βακτηριακά ή θηλαστικά κύτταρα. Ως μοριακή κλωνοποίηση ορίζεται η απομόνωση και η ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Τα περισσότερα από αυτά τα θραύσματα DNA έχουν δημιουργηθεί είτε μέσω πέψης ενός ήδη υπάρχοντος τμήματος DNA με ένζυμα περιορισμού, ή έπειτα από εφαρμογή της αντίδρασης αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) (Lessard, 2013).

Η διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης περιλαμβάνει την προετοιμασία του φορέα και του DNA ενθέματος, την ενσωμάτωση (ligation) του ενθέματος μέσα στο φορέα, το μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων, συνήθως *E.coli*, και την ταυτοποίηση των θετικών κλώνων (Εικόνα 30) (Lessard, 2013).



Εικόνα 30 Τα τέσσερα βασικά στάδια της μοριακής κλωνοποίησης (Lessard, 2013)

Πιο αναλυτικά, κατά την κατασκευή του DNA, το ολικό DNA από έναν οργανισμό δότη απομονώνεται, κόβεται ενζυματικά με ειδικά ένζυμα, τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, και ενώνεται με ένα φορέα κλωνοποίησης ο οποίος έχει επίσης κοπή κατά προτίμηση με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η ένωση φορέα και ενθέματος γίνεται όταν τα δύο μόρια αναμειχθούν μεταξύ τους και προστεθεί το ένζυμο DNA λιγάση. Το DNA που δημιουργείται ονομάζεται ανασυνδυασμένο. Ακολουθεί ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων, που επιτυγχάνεται με τη μεταφορά του ανασυνδυασμένου DNA στα κύτταρα- ξενιστές. Για να εισέλθει ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μέσα στο βακτήριο, τα τοιχώματα του βακτηρίου, μετά από κατάλληλη κατεργασία γίνονται παροδικά διαπερατά (δεκτικά) σε μακρομόρια. Η επιλογή και η απομόνωση των θετικών κλώνων (μετασχηματισμένα βακτήρια) γίνεται εύκολα με τη χρήση αντιβιοτικού, καθώς τα περισσότερα πλασμίδια φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό. Έτσι, τα κύτταρα που δεν έχουν μετασχηματισθεί δεν θα επιβιώσουν παρουσία αντιβιοτικού (Lodish et al. 2000)

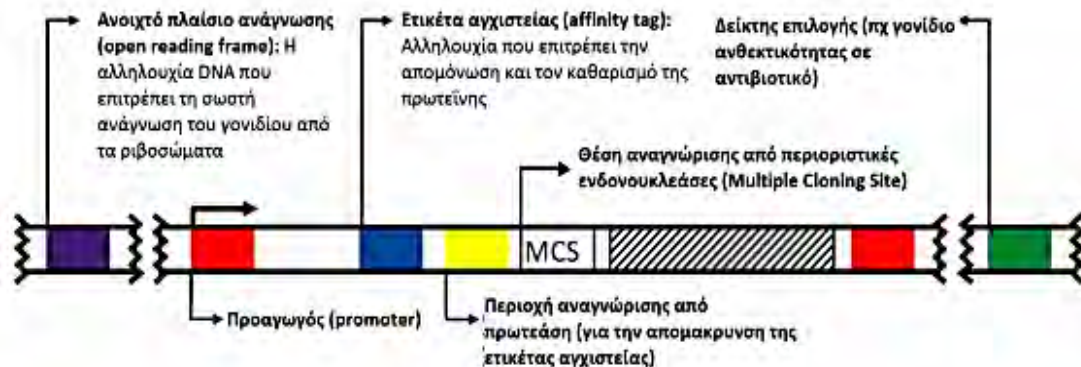
### **Φορείς έκφρασης**

Ο φορέας έκφρασης είναι γενετικό στοιχείο που χρησιμοποιείται για να δέχεται και να μεταφέρει ενθέματα DNA, και ο οποίος βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή, ώστε η έκφραση του να μπορεί να ρυθμιστεί με την προσθήκη κάποιου επαγωγέα ή με κάποια αλλαγή στο θρεπτικό μέσο. Σκοπός του φορέα είναι να απομονώσει, πολλαπλασιάσει και εκφράσει το εισαγόμενο γονίδιο. Ως φορείς μπορούν να χρησιμοποιηθούν πλασμίδια, κοσμίδια, βακτηριακά τεχνητά χρωμοσώματα (BACs), τεχνητά χρωμοσώματα ζύμης (YACs), ή DNA φάγων, αλλά προτιμώνται βακτηριοφάγοι ή πλασμίδια (Lodish et al. 2000).

Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά τμήματα DNA, τα οποία αντιγράφονται μέσα στον ξενιστή και η ύπαρξή τους είναι ανεξάρτητη από το χρωμοσωμικό ή γονιδιωματικό DNA του ξενιστή. Οι πλασμιδιακοί φορείς επιτρέπουν, αφού έχει εισαχθεί το επιθυμητό ένθεμα DNA, αυτό να αντιγραφεί εύκολα και σε μεγάλα ποσά, και συχνά παρέχουν τα απαραίτητα στοιχεία ελέγχου ώστε να κατευθύνουν τη γονιδιακή έκφραση του κλωνοποιημένου DNA. Για αυτούς τους λόγους, τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται σε μοριακές μεθόδους όπως η έκφραση πρωτεϊνών, η μελέτη γονιδιακής έκφρασης και η ανάλυση λειτουργίας βιομορίων (Lodish et al. 2000).

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στην έκφραση αντιπροσωπεύουν τη μικρότερη εκδοχή των φυσικών πλασμιδίων που περιλαμβάνουν μερικά βασικά χαρακτηριστικά, όπως: μια θέση έναρξης της αντιγραφής, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, η περιοχή κλωνοποίησης, κάποιος μοριακός δείκτης και τέλος η εισαγωγή κάποιου ετικέτας στην παραγόμενη πρωτεΐνη που θα βοηθάει στην απομόνωση και τον καθαρισμό της. Συχνά, στα πλασμίδια υπάρχει μία αλληλουχία που περιλαμβάνει πολλές θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού

μαζί, και ονομάζεται πολυσυνδότης (multiple cloning site, MCS) (Εικόνα 31) (Lessard, 2013; Rosano & Ceccarelli, 2014).



Εικόνα 31 Βασικά χαρακτηριστικά ενός φορέα κλωνοποίησης (τροποποίηση) (Rosano and Ceccarelli, 2014)

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι φορείς για έκφραση είναι οι T7 φορείς έκφρασης. Αυτοί οι φορείς περιέχουν, ανοδικά του γονιδίου- στόχου, τον υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης και το χειριστή του οπερονίου της λακτόζης, καθώς επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό, θέση MCS, και μια ετικέτα αγχιστείας, π.χ. 6-His. Η T7 πολυμεράση RNA εκφράζεται σε πολλά στελέχη έκφρασης E. Coli και ο χειριστής της λακτόζης επιτρέπει την επαγωγή της έκφραση χρησιμοποιώντας IPTG (ισοπροπυλοθειογαλακτοζίνη) (Rosano & Ceccarelli, 2014).

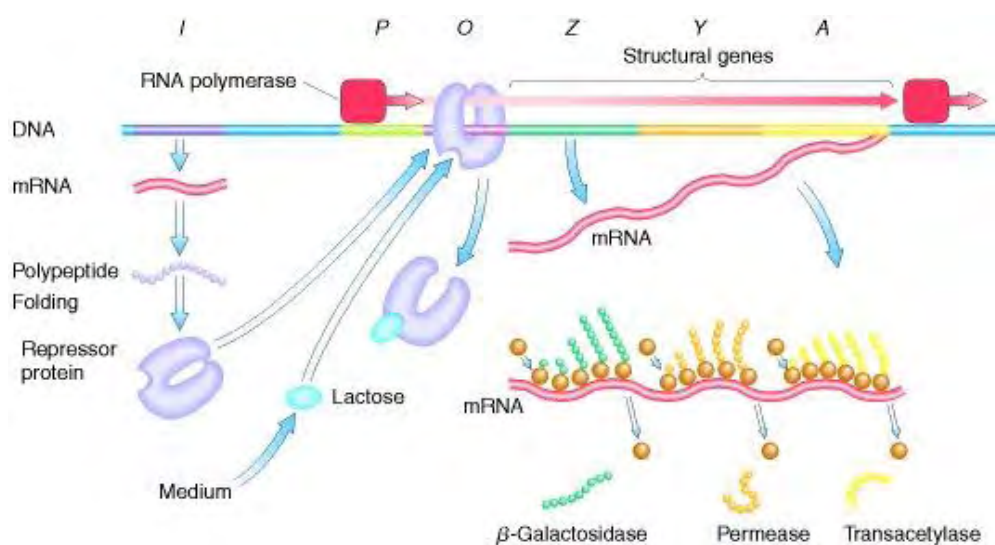
### **Κλωνοποίηση με ομόλογο ανασυνδυασμό (In-fusion®)**

Αντίθετα με τους κλασικούς τρόπους κλωνοποίησης που αξιοποιούν το ένζυμο λιγάση του DNA, η συγκεκριμένη διαδικασία σύνδεσης του ενθέματος με τον ευθυγραμμισμένο φορέα βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Το σύστημα In-fusion® βασίζεται στην ιδιότητα ρεκομπινάσης που έχει η DNA πολυμεράση του ιού της δαμαλίτιδας (Vvpol). Το ένζυμο αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση τα κοινά άκρα που έχουν ο φορέας και το ένθεμα (Park, Throop, & LaBaer, 2015).

## Επαγωγή με ισοπροπουλοθειογαλακτοζίνη (IPTG)

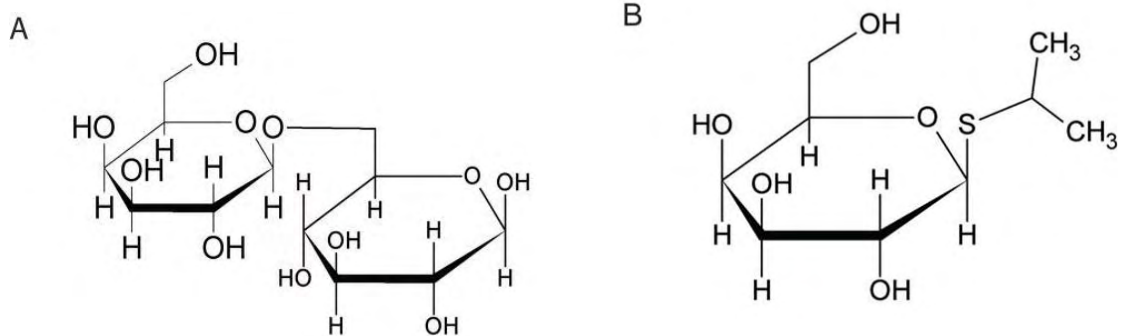
Η επαγωγή με IPTG βασίζεται στον τρόπο ρύθμισης και λειτουργίας του οπερονίου της λακτόζης (*lac operon*).

Γενικά, απουσία λακτόζης, ο *lac* καταστολέας (γονίδιο *lacI*) προσδένεται στον χειριστή (O) του DNA, μπλοκάροντας έτσι την πρόσβαση της RNA πολυμεράση στην περιοχή του υποκινητή (P) του γονιδίου, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η μεταγραφή. Αντίθετα, παρουσία λακτόζης, αυτή συνδέεται στον *lac* καταστολέα και προκαλεί αλλαγή της στερεο-διαμόρφωσής του καθιστώντας αδύνατη την πρόσδεσή του στην αλληλουχία του χειριστή. Επομένως, δεν παρεμποδίζεται η μεταγραφή των *lac* γονιδίων (Z, Y, A) (**Εικόνα 32**) (Griffiths, 1999).



Εικόνα 32 Η ρύθμιση του οπερονίου της λακτόζης. Το I γονίδιο κωδικοποιεί τον καταστολέα, ο οποίος, απουσία λακτόζης προσδένεται στο χειριστή, εμποδίζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων. Η λακτόζη συνδέεται στο χειριστή και προκαλεί στερεοδιαμορφωτική αλλαγή αφήνοντας ελεύθερη την αλληλουχία του υποκινητή στην RNA πολυμεράση ώστε να μεταγράψει τα γονίδια *lac* (Griffiths et al., 1999).

Το IPTG αποτελεί ένα μοριακό βιολογικό αντιδραστήριο που μιμείται την αλλολακτόζη (**Εικόνα 33**), ενός μεταβολίτη της λακτόζης που διεγείρει τη μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης (*lac operon*). Το IPTG ως δομικό ανάλογο της αλλολακτόζης μπορεί να προσδένεται στον *lac* καταστολέα και να επάγει παρόμοια αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης η οποία έχει ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της συγγένειας του καταστολέα με την περιοχή χειριστή του DNA. Το IPTG διαφέρει από τη λακτόζη στο σημείο ότι εφόσον δεν αποτελεί μέρος κανενός μεταβολικού μονοπατιού, δεν αποικοδομείται. Αυτό του προσδίδει το κύριο πλεονέκτημά του έναντι της λακτόζης και το καθιστά πιο χρήσιμο ως επαγωγέα για το *lac* οπερόνιο, καθώς η συγκέντρωσή του θα παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της έκφρασης (Daber, Stayrook, Rosenberg, & Lewis, 2007).



Εικόνα 33 (A) Δομή της αλλολακτόζης (B) Δομή του IPTG (Daber et al., 2007).

## In silico μελέτες – Προγράμματα

### **NCBI's Conserved Domain Database (CDD)**

Διαδικτυακή πλατφόρμα που αποτελείται από μία συλλογή πολλαπλών στοιχίσεων αλληλουχιών που αφορούν αρχαίες πρωτεϊνικές περιοχές/επικράτειες και πρωτεΐνες πλήρους μήκους.

Το πρόγραμμα πραγματοποιεί RPS-BLAST. Η αναγνώριση των διατηρημένων περιοχών σε πρωτεϊνικές αλληλουχίες είναι ταχεία καθώς η συλλογή πολλαπλών στοιχίσεων αλληλουχιών έχει τη μορφή πινάκων ειδικής θέσης (PSSM). Το περιεχόμενο του CDD περιλαμβάνει πρωτεϊνικές επικράτειες που έχουν προγραμματιστεί από το NCBI και οι οποίες χρησιμοποιούν πληροφορίες 3D δομής για να καθορίσουν ρητά τα όρια των επικρατειών της προς μελέτη πρωτεΐνης. Επίσης, το πρόγραμμα παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις σχέσεις αλληλουχίας / δομής / λειτουργίας καθώς εισάγει δεδομένα από διάφορες εξωτερικές βάσεις δεδομένων, όπως Pfam, SMART, COG, PRK, TIGRFAM.

### **InterPro**

Διαδικτυακή πλατφόρμα που παρέχει λειτουργική ανάλυση πρωτεϊνικών αλληλουχιών, ταξινομώντας τις σε οικογένειες και προβλέποντας την παρουσία επικρατειών και σημαντικών θεσέων.

Η InterPro χρησιμοποιεί προγνωστικά μοντέλα που παρέχονται από τις ακόλουθες διαφορετικές βάσεις δεδομένων.

- CATH-Gene3D
- CDD
- MobiDB
- HAMAP
- PANTHER
- Pfam
- PIRSF
- PRINTS
- ProDom
- PROSITE
- SFLD
- SMART
- SUPERFAMILY
- TIGRFAMs

## **CamSol Instrict**

Διαδικτυακή πλατφόρμα που προσδιορίζει το προφίλ διαλυτότητας της προς μελέτη πρωτεΐνης υπολογίζοντας το με τη βοήθεια ενός γραμμικού συνδυασμού των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αμινοξέων της (π.χ. φορτίο, υδροφοβικότητα και άλλα). Έπειτα, με βάση αυτό το προφίλ, προκύπτει το σκορ διαλυτότητας που αφορά ολόκληρη την πρωτεΐνη.

## **ProteinSol**

Διαδικτυακή πλατφόρμα θεωρητικών υπολογισμών και αλγόριθμων πρόγνωσης για την κατανόηση της πρωτεϊνικής διαλυτότητας και σταθερότητας.

Το λογισμικό μπορεί να προβλέψει τη διαλυτότητα με βάση τις ιδιότητες αλληλουχίας μιας πρωτεΐνης, ή της δομής της προς μελέτη πρωτεΐνης, υπολογίζοντας την επιφανειακή κατανομή φορτίου και την υδροφοβικότητα, καθώς και να προβλέψει την πρωτεϊνική σταθερότητα σε 91 διαφορετικούς συνδυασμούς pH και ιοντικής ισχύος.

## **I-TASSER**

Διαδικτυακή πλατφόρμα που βασίζεται σε αλγόριθμους και πραγματοποιεί προβλέψεις δομής και λειτουργίας πρωτεϊνών. Επιτρέπει στους χρήστες να δημιουργούν αυτόματα πρότυπα- μοντέλα υψηλής ποιότητας της τρισδιάστατης δομής και λειτουργίας της προς μελέτη πρωτεΐνης από την αμινοξική της αλληλουχία.

Αρχικά, όταν υποβάλλεται μια αλληλουχία, το πρόγραμμα προσπαθεί να ανακτήσει templates παρόμοιας αναδίπλωσης (ή υπερδευτεροταγούς δομής) από τη βάση δεδομένων PDB, με τη βοήθεια μιας επέκτασης του I-TASSER, το LOMETS (meta-threading). Στη συνέχεια, τα τμήματα που προκύπτουν από τα templates της PDB επανασυναρμολογούνται σε μοντέλα πλήρους μήκους. Σε περιπτώσεις όπου δεν εντοπίζεται το κατάλληλο πρότυπο από το LOMETS, το I-TASSER κατασκευάζει όλες τις δομές με μοντελοποίηση ab initio. Τα τελικά πλήρη ατομικά μοντέλα λαμβάνονται από το REMO, το οποίο κατασκευάζει τις πρωτεϊνικές ατομικές δομές από τα ίχνη των C-α ατόμων μέσω της βελτιστοποίησης του δικτύου δεσμών- υδρογόνου.

Τα μοντέλα που προτείνονται από το I-TASSER συνοδεύονται με τις τιμές: C-score, TM-score, RMSD.

**C-score**: σκορ εμπιστοσύνης για την εκτίμηση της ποιότητας των προβλεπόμενων μοντέλων από το I-TASSER. Υπολογίζεται με βάση τα templates που έχουν προκύψει από το threading και τις προσομοιώσεις της κατασκευής του δομικού μοντέλου. Η τιμή C είναι στην περιοχή [-5,2], όπου σκορ C υψηλότερης τιμής υποδηλώνει ένα μοντέλο με υψηλή εμπιστοσύνη και αντίστροφα.



TM-score: κλίμακα για τη μέτρηση της δομικής ομοιότητας μεταξύ δύο δομών. Ένα σκορ  $TM > 0,5$  υποδηλώνει ένα μοντέλο σωστής τοπολογίας και ένα σκορ  $TM < 0,17$  σημαίνει τυχαία ομοιότητα. Αυτές οι τιμές δεν εξαρτώνται από το μήκος της πρωτεΐνης.

RMSD: μέση απόσταση όλων των ζευγών καταλοίπων ανάμεσα σε δύο δομές. Ένα τοπικό σφάλμα συνεπάγεται μεγάλη τιμή RMSD παρόλο που η γενική τοπολογία θα είναι σωστή.

## **CLUSTAL OMEGA**

Διαδικτυακό πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης αλληλουχιών που στοιχίζει τρεις ή περισσότερες αλληλουχίες μαζί σε έναν υπολογιστικά αποδοτικό και ακριβή τρόπο. Η στοίχιση αλληλουχιών που αποκλίνουν εξελικτικά πολύ μεταξύ τους μπορεί να παράγει ένα βιολογικό αποτέλεσμα μεγάλης σημασίας. Η απεικόνιση της στοίχισης έγινε με MVIEW.

## **Coot**

Διαδικτυακό πρόγραμμα που εξυπηρετεί την κατασκευή μακρομοριακών μοντέλων, την ολοκλήρωση και την επικύρωσή τους, και είναι ιδιαίτερα κατάλληλο για τη μοντελοποίηση πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας δεδομένα ακτίνων Χ.

Το Coot εμφανίζει τους χάρτες και τα μοντέλα και επιτρέπει χειρισμούς μοντέλων όπως εξιδανικεύσεις, βελτιώσεις πραγματικού χώρου, χειροκίνητη περιστροφή, προσαρμογή άκαμπτου σώματος, αναζήτηση προσδέματος, διαλυτοποίηση, μεταλλάξεις, στροφομερή, διαγράμματα Ramachandran, σκελετοποίηση, μη κρυσταλλογραφική συμμετρία και πολλά άλλα.

## **Παρασκευές υλικών**

### **Παρασκευή LB Agar (Μέσο στερεής καλλιέργειας)**

- 35gr/L LB Agar
- dH<sub>2</sub>O
- Αντιβιοτικό σε κατάλληλη συγκέντρωση

### **Παρασκευή LB Broth (Μέσο υγρής καλλιέργειας)**

- 25gr/L LB Broth
- dH<sub>2</sub>O

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Τελικός όγκος 50mL)

- 20mM Tris
- 150mM NaCl
- 0.1M PMSF

Γίνεται ρύθμιση του pH στο 8 και φιλτράρισμα με filter 0.22μM

Παρασκευή Acrylamide Mix 30% (Τελικός όγκος 200mL)

- 58gr ακρυλαμίδιο
- 1.6gr δις-ακρυλαμίδιο (N,N' – methylene- bis- acrylamide)
- dH<sub>2</sub>O

Παρασκευή υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10%

- 10g Ammonium persulfate
- ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 100ml
- φύλαξη στους -20°C

Ρυθμιστικό διάλυμα (4x) (Τελικός όγκος 10mL)

- 4mL 100% glycerol
- 2.4mL 1M Tris/HCl pH 6.8
- 0.8gr SDS
- 4mg bromophenol blue
- 0.5mL β-mercaptoethanol
- 3.1mL H<sub>2</sub>O

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Running Buffer (10x) (Τελικός όγκος 500mL)

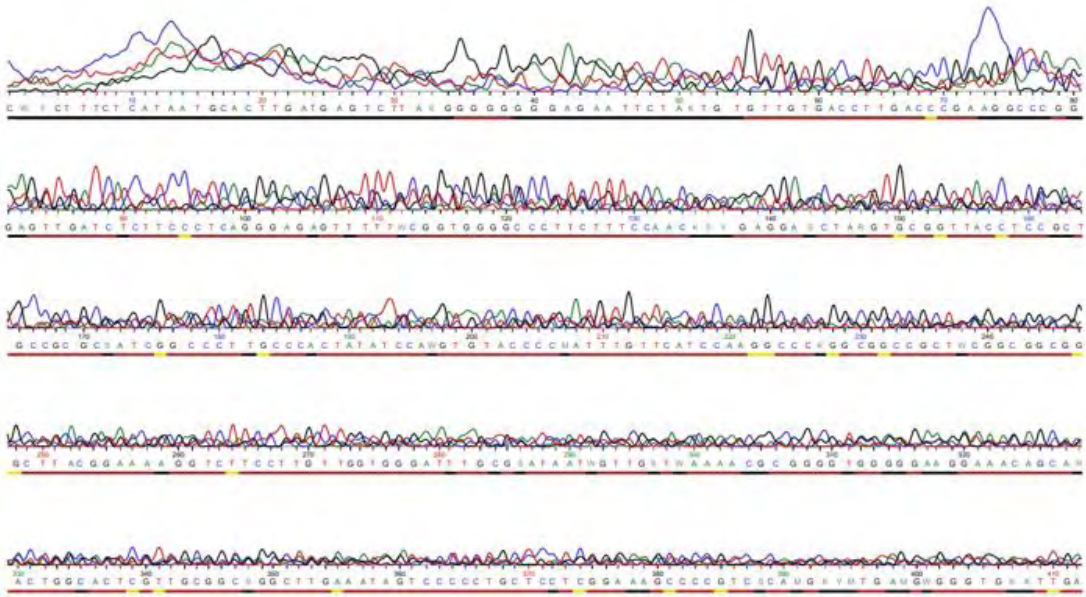
- 72gr Glycine
- 15gr Tris
- 5gr SDS
- Μέχρι τα 500 ml dH<sub>2</sub>O (απαιτείται θέρμανση)

Χρωστική Coomassie Blue R-250 0.05% (Τελικός όγκος 400mL) προς χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης

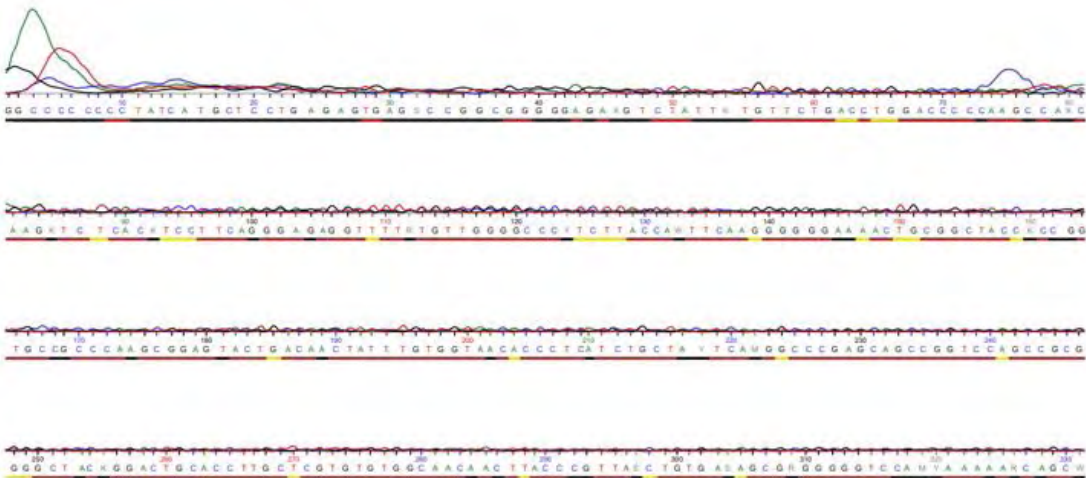
- 160mL Methanol 40%
- 40mL Acetic Acid 10%
- 200ml ddH<sub>2</sub>O
- 0.2gr 0.1% Coomassie Blue R-250



## pATHRA\_Foward Primer



## pATHRA\_Reverse Primer



- Adams, J. A. (2003). Activation Loop Phosphorylation and Catalysis in Protein Kinases: Is There Functional Evidence for the Autoinhibitor Model? †. *Biochemistry*, 42(3), 601–607. <https://doi.org/10.1021/bi020617o>
- Adeva-Andany, M. M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., & Ameneiros-Rodríguez, E. (2016). Glycogen metabolism in humans. *BBA Clinical*, 5, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.02.001>
- Aleshin, A. E., Feng, P. H., Honzatko, R. B., & Reilly, P. J. (2003). Crystal structure and evolution of a prokaryotic glucoamylase. *Journal of Molecular Biology*, 327(1), 61–73. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00084-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00084-6)
- Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1985). Theory of Protein Solubility. *Methods in Enzymology*, 114(1956), 49. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(85\)14005-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(85)14005-X)
- Avramopoulout, V., Mamalaki, A., & Tzartos, S. J. (2004). Soluble, oligomeric, and ligand-binding extracellular domain of the human  $\alpha 7$  acetylcholine receptor expressed in yeast: Replacement of the hydrophobic cysteine loop by the hydrophilic loop of the ACh-binding protein enhances protein solubility. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38287–38293. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402533200>
- Bachman, J. (2013). Site-directed mutagenesis. *Methods in Enzymology*, 529, 241–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00019-7>
- Bagby, S., Tong, K. I., & Ikura, M. (2001). Optimization of protein solubility and stability for protein nuclear magnetic resonance. *Methods in Enzymology*, 339, 20–41. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)39307-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)39307-2)
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2010). 10. 4 Covalent Modification Is a Means of Regulating Enzyme Activity. In *Biochemistry* (pp. 2–7). New York: W H Freeman.
- Bruno, C., Manfredi, G., Andreu, A. L., Shanske, S., Krishna, S., Ilse, W. K., & DiMauro, S. (1998). A Splice Junction Mutation in the  $\alpha$ MGene of Phosphorylase Kinase in a Patient with Myopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249(3), 648–651. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1998.9211>
- Brushia, R. J., & Walsh, D. A. (1999). Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 4(9), D618–41. <https://doi.org/10.1093/infdis/jjr671>
- Burwinkel, B., Hu, B., Schroers, A., Clemens, P. R., Moses, S. W., Shin, Y. S., ... Kilimann, M. W. (2003). Muscle glycogenosis with low phosphorylase kinase activity: mutations in PHKA1, PHKG1 or six other candidate genes explain only a minority of cases. *European Journal of Human Genetics*, 11(7), 516–526. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200996>
- Burwinkel, B., Shiomi, S., Al Zaben, A., & Kilimann, M. W. (1998). Liver glycogenosis due to phosphorylase kinase deficiency: PHKG2 gene structure and mutations associated with cirrhosis. *Human Molecular Genetics*, 7(1), 149–154. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.1.149>
- Carrière, C., Jonic, S., Mornon, J.-P., & Callebaut, I. (2008). 3D mapping of glycogenosis-causing mutations in the large regulatory alpha subunit of phosphorylase kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1782(11), 664–670. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2008.09.011>
- Carrigan, P. E., Ballar, P., & Tuzmen, S. (2011). Site-directed mutagenesis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 700, pp. 107–124). Humana Press, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1007/978-1->

- Carrió, M. M., & Villaverde, A. (2002). Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *Journal of Biotechnology*, *96*(1), 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00032-9)
- Chan, P., Curtis, R. A., & Warwicker, J. (2013). Soluble expression of proteins correlates with a lack of positively-charged surface. *Scientific Reports*, *3*(1), 3333. <https://doi.org/10.1038/srep03333>
- Chen, J. C.-H., Krucinski, J., Miercke, L. J. W., Finer-Moore, J. S., Tang, A. H., Leavitt, A. D., & Stroud, R. M. (2000). Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: A model for viral DNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(15), 8233–8238. <https://doi.org/10.1073/pnas.150220297>
- Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G., & Dobson, C. M. (2003). Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature*, *424*(6950), 805–808. <https://doi.org/10.1038/nature01891>
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., ... Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, *325*(5942), 834–840. <https://doi.org/10.1126/science.1175371>
- Chrisman, T. D., Jordan, J. E., & Exton, J. H. (1982). Purification of rat liver phosphorylase kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *257*(18), 10798–10804. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6809757>
- Christensen, T., Stoffer, B. B., Svensson, B., & Christensen, U. (1997). Some details of the reaction mechanism of glucoamylase from *Aspergillus niger*—kinetic and structural studies on Trp52→Phe and Trp317→Phe mutants. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *250*(3), 638–645. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00638.x>
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation - A 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences*, *25*(12), 596–601. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01712-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01712-6)
- Corchero, J. L., & Villaverde, A. (1998). Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, *58*(6), 625–632. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980620\)58:6<625::AID-BIT8>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980620)58:6<625::AID-BIT8>3.0.CO;2-K)
- Daber, R., Stayrook, S., Rosenberg, A., & Lewis, M. (2007). Structural Analysis of Lac Repressor Bound to Allosteric Effectors. *Journal of Molecular Biology*, *370*(4), 609–619. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.028>
- Dale, G. E., Broger, C., Langen, H., Arcy, A. D., & Stüber, D. (1994). Improving protein solubility through rationally designed amino acid replacements: Solubilization of the trimethoprim-resistant type s1 dihydrofolate reductase. *Protein Engineering, Design and Selection*, *7*(7), 933–939. <https://doi.org/10.1093/protein/7.7.933>
- De Marco, A., & De Marco, V. (2004). Bacteria co-transformed with recombinant proteins and chaperones cloned in independent plasmids are suitable for expression tuning. *Journal of Biotechnology*, *109*(1–2), 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.025>
- Doherty, A. J., Connolly, B. A., & Worrall, A. F. (1993). Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene*, *136*(1–2), 337–340. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90491-K](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90491-K)
- Dong, H., Nilsson, L., & Kurland, C. G. (1995). Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of Bacteriology*, *177*(6), 1497–1504. <https://doi.org/10.1128/jb.177.6.1497-1504.1995>
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014a). Explanatory chapter: Troubleshooting protein expression: What to do when the protein is not soluble. In *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 231–247).

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00018-5>

- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014b). Explanatory chapter: Troubleshooting recombinant protein expression: General. In *Methods in Enzymology* (4th ed., Vol. 541, pp. 209–229). New York: W. H. Freeman. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00017-3>
- Dyda, F., Hickman, A. B., Jenkins, T. M., Engelman, A., Craigie, R., & Davies, D. R. (1994). Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science (New York, N.Y.)*, *266*(5193), 1981–1986. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7801124>
- Echaniz-Laguna, A., Akman, H. O., Mohr, M., Tranchant, C., Talmant-Verbist, V., Rolland, M. O., & Dimauro, S. (2010). Muscle phosphorylase b kinase deficiency revisited. *Neuromuscular Disorders*, *20*(2), 125–127. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2009.11.004>
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of *Coot*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *66*(4), 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
- Finn, R. D., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Bateman, A., Bork, P., Bridge, A. J., ... Mitchell, A. L. (2017). InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D190–D199. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1107>
- Fischer, E. H., & Krebs, E. G. (1955). Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *The Journal of Biological Chemistry*, *216*(1), 121–132. <https://doi.org/citeulike-article-id:9395137>
- Fowler, S. B., Poon, S., Muff, R., Chiti, F., Dobson, C. M., & Zurdo, J. (2005). Rational design of aggregation-resistant bioactive peptides: Reengineering human calcitonin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(29), 10105–10110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501215102>
- Frandsen, T. P., Dupont, C., Lehmebeck, J., Staffer, B., Sierks, M. R., Honzatko, R. B., & Svensson, B. (1994). Site-Directed Mutagenesis of the Catalytic Base Glutamic Acid 400 in Glucoamylase from *Aspergillus niger* and of Tyrosine 48 and Glutamine 401, Both Hydrogen-Bonded to the  $\gamma$ -Carboxylate Group of Glutamic Acid 400. *Biochemistry*, *33*(46), 13808–13816. <https://doi.org/10.1021/bi00250a035>
- Gouy, M., & Gautier, C. (1982). Codon usage in bacteria: Correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Research*, *10*(22), 7055–7074. <https://doi.org/10.1093/nar/10.22.7055>
- Grand, R. J. A., Nairn, A. C., & Perry, S. V. (1980). Preparation of Calmodulins from Barley (*Hordeum Sp*) and Basidiomycete Fungi. *Biochemical Journal*, *185*(3), 755–760. <https://doi.org/10.1042/bj1850755>
- Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., ... Gunsalus, K. C. (2008). Protein production and purification. *Nature Methods*, *5*(2), 135–146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>
- Griffiths, A. J. F. (1999). Regulation of the Lactose System. In S. Tenney, N. Filochetti, R. Rossignol, & J. O’Neil (Eds.), *Modern genetic analysis* (pp. 436–446). New York: W. H. Freeman. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/libproxy1.nus.edu.sg/books/NBK21402/>
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, *22*(7), 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.04.006>
- Hanks, S. K., & Quinn, A. M. (1991). Protein Kinase Catalytic Domain Sequence Database: Identification of Conserved Features of Primary Structure and Classification of Family Members. *Methods in Enzymology*, *200*(C), 38–62. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)00126-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)00126-H)
- Hanson, P. I., & Schulman, H. (1992). Inhibitory autophosphorylation of multifunctional  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis. *Journal of*

*Biological Chemistry*, 267(24), 17216–17224. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1324926>

- Harmann, B., Zander, N. F., & Kilimann, M. W. (1991). Isoform diversity of phosphorylase kinase alpha and beta subunits generated by alternative RNA splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(24), 15631–15637. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1874721>
- Hartley, D. L., & Kane, J. F. (1988). Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*, 16(2), 101–102. <https://doi.org/10.1042/bst0160101>
- Hebditch, M., Carballo-Amador, M. A., Charonis, S., Curtis, R., & Warwicker, J. (2017). Protein–Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics*, 33(19), 3098–3100. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx345>
- Henrissat, B., & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(5), 637–644. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(97\)80072-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80072-3)
- Hiromi, K., Ohnishi, M., & Tanaka, A. (1983). Subsite structure and ligand binding mechanism of glucoamylase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 51(1), 79–95. <https://doi.org/10.1007/BF00215589>
- Hirono H, Hayasaka K, Sato W, Takahashi T, T. G. (1995). Isolation of cDNA encoding the human liver phosphorylase kinase alpha subunit (PHKA2) and identification of a missense mutation of the PHKA2 gene in a family with liver phosphorylase kinase deficiency. *Biochem Mol Biol Int*, 36(3), 505–511. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7549948>
- Jenkins, T. M., Hickman, A. B., Dyda, F., Ghirlando, R., Davies, D. R., & Craigie, R. (1995). Catalytic domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: identification of a soluble mutant by systematic replacement of hydrophobic residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13), 6057–6061. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7597080>
- Johnson, J. D., Snyder, C., Walsh, M., & Flynn, M. (1996). Effects of myosin light chain kinase and peptides on Ca<sup>2+</sup> exchange with the N- and C-terminal Ca<sup>2+</sup> binding sites of calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 761–767. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.761>
- Johnson, L. N. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, 37(4), 627–641. <https://doi.org/10.1042/BST0370627>
- Jones, T. A., da Cruz e Silva, E. F., Spurr, N. K., Sheer, D., & Cohen, P. T. W. (1990). Localisation of the gene encoding the catalytic  $\gamma$  subunit of phosphorylase kinase to human chromosome bands 7p12-q21. *BBA - Gene Structure and Expression*, 1048(1), 24–29. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(90\)90017-V](https://doi.org/10.1016/0167-4781(90)90017-V)
- Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(5), 494–500. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80082-4](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80082-4)
- Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803–822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080>
- Khoury, G. A., Baliban, R. C., & Floudas, C. A. (2014). Proteome-wide post-translational modification statistics: Frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific Reports*, 1(1), 90. <https://doi.org/10.1038/srep00090>
- Kilimann, M. W., Zander, N. F., Kuhn, C. C., Crabb, J. W., Meyer, H. E., & Heilmeyer Jr., L. M. (1988). The alpha and beta subunits of phosphorylase kinase are homologous: cDNA cloning and primary structure of the beta subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(24), 9381–9385. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9381>



- Kramer, R. M., Shende, V. R., Motl, N., Pace, C. N., & Scholtz, J. M. (2012). Toward a molecular understanding of protein solubility: Increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophysical Journal*, *102*(8), 1907–1915. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.01.060>
- Krebs, E., Love, D., Bratvold, G., Trayser, K., Meyer, W., & Fisher, E. (1964). Purification and properties of rabbit skeletal muscle phosphorylase b kinase. *Biochemistry*, *3*(8), 1022–1033. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14220660>
- Kurokawa, Y., Yanagi, H., & Yura, T. (2000). Overexpression of protein disulfide isomerase DsbC stabilizes multiple-disulfide-bonded recombinant protein produced and transported to the periplasm in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(9), 3960–3965. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3960-3965.2000>
- Leibly, D. J., Nguyen, T. N., Kao, L. T., Hewitt, S. N., Barrett, L. K., & van Voorhis, W. C. (2012). Stabilizing Additives Added during Cell Lysis Aid in the Solubilization of Recombinant Proteins. *PLoS ONE*, *7*(12), e52482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052482>
- Lessard, J. C. (2013). Molecular cloning. In *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 85–98). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00007-0>
- Lodish, H., Berk, A., & Zipursky, SL, et al. (2000). DNA Cloning with Plasmid Vectors. In *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York: W H Freeman. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21498/>
- Lowe, E. D., Noble, M. E. M., Skamnaki, V. T., Oikonomakos, N. G., Owen, D. J., & Johnson, L. N. (1997). The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition. *The EMBO Journal*, *16*(22), 6646–6658. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.22.6646>
- Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., ... Bryant, S. H. (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D200–D203. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1129>
- Marks, F., Klingmüller, U., & Müller-Decker, K. (2009). *Cellular signal processing: an introduction to the molecular mechanisms of signal transduction*. (G. S. Group, Ed.) (1st ed.).
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., ... Lopez, R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, *41*(W1), W597–W600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt376>
- Meyer, W. L., Fischer, E. H., & Krebs, E. G. (1964). Activation of Skeletal Muscle Phosphorylase B Kinase by Ca. *Biochemistry*, *3*, 1033–1039. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14220661](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14220661)
- Middaugh, C., & Volkin, D. (1992). Protein Solubility. In T. Ahern & M. Manning (Eds.), *Stability of Protein Pharmaceuticals* (pp. 109–134). New York: Plenum Press.
- Mosavi, L. K., & Peng, Z. -y. (2003). Structure-based substitutions for increased solubility of a designed protein. *Protein Engineering Design and Selection*, *16*(10), 739–745. <https://doi.org/10.1093/protein/gzg098>
- Nadeau, O. W., Carlson, G. M., & Gogol, E. P. (2002). A Ca<sup>2+</sup>-dependent global conformational change in the 3D structure of phosphorylase kinase obtained from electron microscopy. *Structure*, *10*(1), 23–32. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00678-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00678-5)
- Nadeau, O. W., Fontes, J. D., & Carlson, G. M. (2018). The regulation of glycogenolysis. *Journal of Biological Chemistry*, jbc.R117.803023. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.803023>
- Nadeau, O. W., Gogol, E. P., & Carlson, G. M. (2005). Cryoelectron microscopy reveals new features in the three-dimensional structure of phosphorylase kinase. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *14*(4), 914–920. <https://doi.org/10.1110/ps.041123905>

- Nadeau, O. W., Liu, W., Boulatnikov, I. G., Sage, J. M., Peters, J. L., & Carlson, G. M. (2010). The glucoamylase inhibitor acarbose is a direct activator of phosphorylase kinase. *Biochemistry*, *49*(31), 6505–6507. <https://doi.org/10.1021/bi101006j>
- Norcum, M. T., Wilkinson, D. A., Carlson, M. C., Hainfeld, J. F., & Carlson, G. M. (1994). Structure of phosphorylase kinase: A three-dimensional model derived from stained and unstained electron micrographs. *Journal of Molecular Biology*, *241*(1), 94–102. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1476>
- Oliveira, A. P., Ludwig, C., Picotti, P., Kogadeeva, M., Aebersold, R., & Sauer, U. (2012). Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation. *Molecular Systems Biology*, *8*, 623. <https://doi.org/10.1038/msb.2012.55>
- Ørngreen, M. C., Schelhaas, H. J., Jeppesen, T. D., Akman, H. O., Wevers, R. A., Andersen, S. T., ... Vissing, J. (2008). Is muscle glycogenolysis impaired in X-linked phosphorylase b kinase deficiency? *Neurology*, *70*(20), 1876–1882. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000289190.66955.67>
- Owen, D. J., Noble, M., Garman, E. F., Papageorgiou, A. C., & Johnson, L. N. (1995). Two structures of the catalytic domain of phosphorylase kinase: an active protein kinase complexed with substrate analogue and product. *Structure*, *3*(5), 467–482. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00180-0](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00180-0)
- Pallen, M. J. (2003). Glucoamylase-like domains in the alpha- and beta-subunits of phosphorylase kinase. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *12*(8), 1804–1807. <https://doi.org/10.1110/ps.0371103>
- Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S., & Ramírez, O. T. (2004). Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions. In *Recombinant Gene Expression* (Vol. 267, pp. 015–052). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-774-2:015>
- Papaneophytou, C. P., & Kontopidis, G. (2014). Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in Escherichia coli: A general review. *Protein Expression and Purification*, *94*, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.016>
- Park, J., Throop, A. L., & LaBaer, J. (2015). Site-specific recombinational cloning using gateway and in-fusion cloning schemes. *Current Protocols in Molecular Biology*, *2015*, 3.20.1-3.20.23. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0320s110>
- Price, N., & Stevens, L. (1999). *Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins*. New York: Oxford University Press.
- Priddy, T. S. (2005). Ca<sup>2+</sup>-induced structural changes in phosphorylase kinase detected by small-angle X-ray scattering. *Protein Science*, *14*(4), 1039–1048. <https://doi.org/10.1110/ps.041124705>
- Ramachandran, C., Goris, J., Waelkens, E., Merlevede, W., & Walsh, D. A. (1987). The interrelationship between cAMP-dependent alpha and beta subunit phosphorylation in the regulation of phosphorylase kinase activity. Studies using subunit specific phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(7), 3210–3218. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3029103>
- Rice, N. A., Nadeau, O. W., Yang, Q., & Carlson, G. M. (2002). The calmodulin-binding domain of the catalytic  $\gamma$  subunit of phosphorylase kinase interacts with its inhibitory  $\alpha$  subunit. Evidence for a Ca<sup>2+</sup>-sensitive network of quaternary interactions. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(17), 14681–14687. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201229200>
- Rimmer, M. A., Nadeau, O. W., Yang, J., Artigues, A., Zhang, Y., & Carlson, G. M. (2018). The structure of the large regulatory  $\alpha$  subunit of phosphorylase kinase examined by modeling and hydrogen-deuterium exchange. *Protein Science*, *27*(2), 472–484. <https://doi.org/10.1002/pro.3339>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, *5*(APR), 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Sauer, J., Sigurskjold, B. W., Christensen, U., Frandsen, T. P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., ... Svensson, B. (2000). Glucoamylase: Structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 275–293. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00232-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00232-6)
- Serber, Z., & Ferrell, J. E. (2007). Tuning Bulk Electrostatics to Regulate Protein Function. *Cell*, 128(3), 441–444. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.018>
- Shenolikar, S., Cohen, P. T. W., Cohen, P., Nairn, A. C., & Perry, S. V. (1979). The Role of Calmodulin in the Structure and Regulation of Phosphorylase Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *European Journal of Biochemistry*, 100(2), 329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb04175.x>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., ... Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Skamnaki, V. T., Owen, D. J., Noble, M. E., Lowe, E. D., Lowe, G., Oikonomakos, N. G., & Johnson, L. N. (1999). Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies. *Biochemistry*, 38(44), 14718–14730. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10545198>
- Smith, B. J. (1984). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In *Proteins* (Vol. 1, pp. 41–56). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:41>
- Smith, D. R. (1993). Agarose Gel Electrophoresis. In *Transgenesis Techniques* (Vol. 18, pp. 433–438). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-245-0:433>
- Sormanni, P., Amery, L., Ekizoglou, S., Vendruscolo, M., & Popovic, B. (2017). Rapid and accurate in silico solubility screening of a monoclonal antibody library. *Scientific Reports*, 7(1), 8200. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07800-w>
- Sormanni, P., Aprile, F. A., & Vendruscolo, M. (2015). The CamSol Method of Rational Design of Protein Mutants with Enhanced Solubility. *Journal of Molecular Biology*, 427(2), 478–490. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2014.09.026>
- Thomas, J. G., Ayling, A., & Baneyx, F. (1997). Molecular Chaperones, Folding Catalysts, and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E.coli*: To Fold or to Refold. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 66(3), 197–238. <https://doi.org/10.1007/BF02785589>
- Trevino, S. R., Scholtz, J. M., & Pace, C. N. (2007). Amino Acid Contribution to Protein Solubility: Asp, Glu, and Ser Contribute more Favorably than the other Hydrophilic Amino Acids in RNase Sa. *Journal of Molecular Biology*, 366(2), 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.026>
- Trevino, S. R., Scholtz, J. M., & Pace, C. N. (2008a). Measuring and increasing protein solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(10), 4155–4166. <https://doi.org/10.1002/jps.21327>
- Trevino, S. R., Scholtz, J. M., & Pace, C. N. (2008b). Measuring and Increasing Protein Solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(10), 4155–4166. <https://doi.org/10.1002/jps.21327>
- Ubersax, J. A., & Ferrell, J. E. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 530–541. <https://doi.org/10.1038/nrm2203>
- Vénien-Bryan, C., Jonic, S., Skamnaki, V., Brown, N., Bischler, N., Oikonomakos, N. G., ... Johnson, L. N. (2009). The Structure of Phosphorylase Kinase Holoenzyme at 9.9 Å Resolution and Location of the Catalytic Subunit and the Substrate Glycogen Phosphorylase. *Structure*, 17(1), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.013>
- Wehner, M., Clemens, P. R., Engel, A. G., & Kilimann, M. W. (1994). Human muscle glycogenosis due to phosphorylase kinase deficiency associated with a nonsense mutation in the muscle isoform of

- the alpha subunit. *Human Molecular Genetics*, 3(11), 1983–1987. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7874115>
- Wuyts, W., Reyniers, E., Ceuterick, C., Storm, K., de Barys, T., & Martin, J.-J. (2005). Myopathy and phosphorylase kinase deficiency caused by a mutation in the PHKA1 gene. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 133A(1), 82–84. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30517>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Yin, J., Li, G., Ren, X., & Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 335–347. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.012>
- Yokoyama, S. (2003). Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(1), 39–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12547425>
- Yuan, C. J., & Graves, D. J. (1989). Ca<sup>2+</sup>-independent interaction of the  $\gamma$  subunit of phosphorylase kinase with dansyl-calmodulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274(2), 317–326. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90445-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90445-1)
- Zhang, S., Zubay, G., & Goldman, E. (1991). Low-usage codons in Escherichia coli, yeast, fruit fly and primates. *Gene*, 105(1), 61–72. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90514-C](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90514-C)
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>