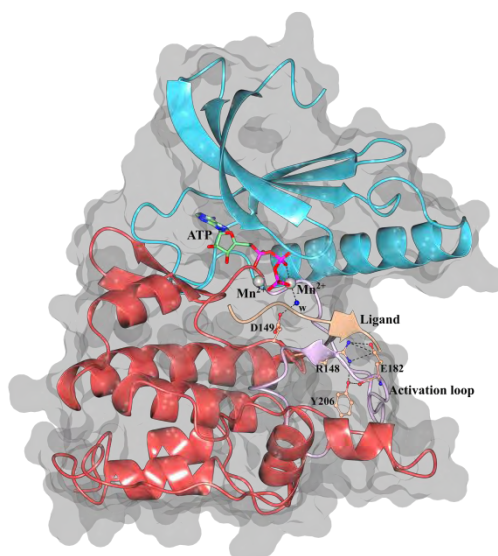




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ετερόλογη Έκφραση της Καταλυτικής γ Υπομονάδας της Ανθρώπινης Μυϊκής Ισομορφής της Κινάσης της Φωσφορυλάσης του Γλυκογόνου



Heterologous Expression of the Catalytic γ Subunit of the Human Muscle Isoform of the Glycogen Phosphorylase Kinase

Διπλωματική Εργασία

Γκούσκου Αναστασία

2016

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

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

Λέκτορας Βιοχημείας – Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Λεωνίδας Δ. Δημήτριος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία**

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
1. Εισαγωγή	8
1.1 Φωσφορυλίωση - Πρωτεϊνικές Κινάσες.	8
1.1.1 Κατηγορίες Πρωτεϊνικών Κινασών.	9
1.2 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK)	9
1.2.1 Ισομορφές της PhK.	10
1.2.2 Υπομονάδες της PhK.	10
1.2.3 Υποκυτταρικός Εντοπισμός	12
1.2.4 Ο ρόλος της PhK στο μεταβολισμό του γλυκογόνου	12
1.2.5 Δομή	15
1.2.6 Ρύθμιση ενζυμικής δραστηριότητας	20
1.2.7 Αναγνώριση υποστρωμάτων	23
1.2.8 Καταλυτικός Μηχανισμός	23
1.2.9 Η PhK ως μοριακός φαρμακευτικός στόχος	24
1.3 Ετερόλογη έκφραση	25
1.3.1 Συστήματα έκφρασης	25
1.3.2 Έκφραση σε <i>E.coli</i>	26
1.3.3 Φορείς έκφρασης-βασικά χαρακτηριστικά	26
1.3.4 Τύποι μοριακής κλωνοποίησης	27
Κλωνοποίηση του DNA	29
1.4 <i>In silico</i> μελέτες πρωτεϊνικής ανάλυσης	31
1.4.1 Στοιχισή αλληλουχιών (Sequence alignment)	32
2. Αντικείμενο της πτυχιακής εργασίας	34
3. Οργανολογία	35
3.1 Υλικά	35
3.1.1 Αντιδραστήρια	35
3.1.2 Βακτηριακά στελέχη	36
3.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς	37
3.2 Όργανα	39
4. Μεθοδολογία	40
4.1 <i>In silico</i> μελέτες	40

4.1.1 Στοιχίση (Alignment)	40
4.1.2 Δομική Στοιχίση (Structural Alignment)	40
4.1.3 Πρόβλεψη Επικρατειών (Domain Prediction)	40
4.1.4 Μοντελοποίηση Ομολογίας (Homology Modeling)	40
4.2 Τεχνικές Κλωνοποίησης	40
4.2.1 1 ^η μέθοδος (Με χρήση DNA λιγάσης)	41
4.2.2 2η μέθοδος (με χρήση ενζύμου in-fusion)	55
4.3 Αναλυτικές Μέθοδοι	61
4.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	61
4.3.2 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS (SDS-PAGE)	63
5. Αποτελέσματα / Συζήτηση	65
5.1 <i>In silico</i> μελέτες πρωτεϊνικής ανάλυσης.	65
5.1.2 Στοιχίση (Alignment)	65
5.1.3 Δομική Στοιχίση (Structural Alignment)	68
5.1.4 Πρόβλεψη Επικρατειών (Domain Prediction)	69
5.1.5 Μοντελοποίηση Ομολογίας (Homology Modeling)	70
5.2 Τεχνικές Κλωνοποίησης	72
5.2.1 Ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου και του κολοβωμένου τμήματος με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.	72
5.2.2 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	74
5.2.4 Αντίδραση σύνδεσης με DNA λιγάση	75
5.2.5 Πέψη ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με EcoRI για επιβεβαίωση της παρουσίας ενθέματος (2 ^η μέθοδος)	75
5.2.6 Έλεγχος έκφρασης σε κύτταρα <i>E.coli</i> (BL21 Gold, B834 και B834 pLysS)	76
5.2.7 Αλληλούχιση τμήματος που προέκυψε μετά την PCR για τη 2η μέθοδο	77
6. Παράρτημα	79
7. Βιβλιογραφία	85

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους όσους μου συμπαραστάθηκαν στην εκπόνηση της συγκεκριμένης επιστημονικής εργασίας. Κατ' αρχάς τις πιο θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να τις απονείμω στην επιβλέπουσα, λέκτορα Βιοχημείας – Μεταβολισμού, Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη. Χαίρομαι γιατί το θέμα το οποίο μου υπέδειξε ήταν πρωτότυπο και απαιτητικό. Επέδειξε κατανόηση, με στήριξε στα δύσκολα της επιστημονικής μου εργασίας και με ενθάρρυνε να προχωρώ χωρίς φόβο στα επιστημονικά μονοπάτια. Οφείλω να αναγνωρίσω ότι αφιέρωσε πολύτιμο προσωπικό χρόνο για τη διεκπεραίωση της εργασίας αυτής. Ακόμη θα ήταν μέγιστη παράλειψη αν δεν ευχαριστούσα τους υπεύθυνους καθηγητές και τα μέλη των εργαστηρίων Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος, Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας για την ανοχή και την απίστευτη κατανόησή τους, καθώς ήταν συχνές οι φορές που προσέτρεχα στα συγκεκριμένα εργαστήρια για τη χρήση οργάνων και αντιδραστηρίων.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τη βαθύτατη εκτίμησή μου για όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας. Αποτέλεσαν, ειλικρινά, τους φίλους μου, τους συνεργάτες μου, τους υποστηρικτές μου, την οικογένειά μου κατά τη διεξαγωγή της πτυχιακής μου εργασίας. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Γεώργιο Στραβοδήμο για τις υποδείξεις του, την έμπρακτη βοήθειά του, την εξαιρετική του υπομονή, την πίστη του ότι μπορώ να τα καταφέρω μόνη μου και το πνεύμα συνεργασίας το οποίο μου εμφύσησε. Αναγνωρίζω την πολύτιμη προσφορά της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Θεοδώρας Σολοβού που ήταν δίπλα μου με ενδιαφέρον στις όποιες απορίες της υπέβαλα, καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου και Θάνο Κυρίτση για τις πολύτιμες συμβουλές και το χρόνο τους. Δε θα μπορούσα να ξεχάσω τους φίλους και συναδέλφους Μαρίνα Γιαννάκη, Ραφαέλα Μπέτα, Ευθύμιο Κυριάκη, για τον άψογο χαρακτήρα τους, τις ανεπανάληπτες στιγμές και το όμορφο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριό μας όλους αυτούς τους μήνες.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ανιδιοτελή αγάπη με την οποία με περιέβαλε όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

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 και αποτελεί ένζυμο-κλειδί στο μονοπάτι μεταβολισμού του γλυκογόνου. Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν νέες ιδέες για την αξιοποίηση της PhK ως φαρμακευτικού στόχου για την αντιμετώπιση διαταραχών του μεταβολισμού των υδατανθράκων ή ακόμα και του καρκίνου. Ωστόσο οι γνώσεις μας γύρω από τους τρόπους ρύθμισης του ενζύμου είναι ελλιπείς κυρίως λόγω της πολυπλοκότητας της δομής του. Τα τελευταία χρόνια επιλύθηκε η δομή, με πρωτεϊνική κρυσταλλογραφία ακτίνων - X, της κολοβωμένης ενεργής καταλυτικής υπομονάδας της (PhK_{ytnc}) από μυϊκό ιστό κουνελιού και διατυπώθηκε ο ενζυμικός μηχανισμός της. Εντούτοις, η ανθρώπινη μυϊκή ισομορφή της δεν έχει μέχρι σήμερα μελετηθεί.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η έκφραση της γ καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης μυϊκής ισομορφής PhK (hPhK_γ). Πραγματοποιούνται *in silico* μελέτες πρωτεϊνικής ανάλυσης για την αναγνώριση της επικράτειας κινάσης (kinase domain) της hPhK_γ με βάση την ισομορφή που ευρίσκεται στο σκελετικό μυ κουνελιού. Ακολουθεί σχεδιασμός εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων της hPhK_γ και της κολοβωμένης μορφής της, hPhK_{ytnc}, με βάση τις *in silico* μελέτες. Απώτερος σκοπός είναι η εισαγωγή των αλληλουχιών αυτών σε φορείς pGEX και pET κατάλληλους για έκφραση γονιδίων σε *E.coli*. Από τις τεχνικές κλωνοποίησης που εφαρμόζονται η πρώτη περιλαμβάνει τη χρήση περιοριστικών ενζύμων και DNA λιγάσης, ενώ η δεύτερη βασίζεται στη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Οι φορείς θα χρησιμοποιηθούν για την έκφραση των πρωτεϊνών με υψηλή απόδοση σε κατάλληλα στελέχη *E.coli* και θα αξιοποιηθούν ως εργαλεία για τη βιοχημική και δομική μελέτη τους.

Abstract

Phosphorylase Kinase (PhK) was the first protein kinase that was recognized by Fischer, Graves and Krebs in 1955 and isolated from Krebs in 1964 from rabbit

skeletal muscle. It is a key enzyme in the pathway of glycogen metabolism. In recent years new ideas have been developed for the utilization of PhK as a drug target for the treatment of metabolic disorders or even cancer. However, our knowledge of the regulation of this enzyme is incomplete mainly due to the complexity of its structure. Although the structure of the truncated active catalytic subunit (PhK_{gtrnc}) from rabbit muscle tissue has been resolved with the use of X-ray protein crystallography, and the catalytic mechanism of the enzyme has been proposed, the human muscle isoform has not yet been studied.

The present study focuses on the expression of gamma catalytic subunit of human muscle isoform of PhK (hPhK γ). *In silico* protein studies are used to identify the kinase domain of hPhK γ based on the isoform present in rabbit skeletal muscle. The primer design for the amplification of hPhK γ gene and the truncated form hPhK γ _{trc}, is based on the *in silico* studies. The ultimate goal is the insertion of these sequences into vectors pGEX and pET suitable for gene expression in *E. coli*. The molecular cloning techniques involve the use of restriction enzymes and DNA ligase, as well as homologous recombination methods. These vectors will be used for the expression of proteins in high yield in suitable *E.coli* strains and will be utilized as tools for their biochemical and structural study.

1.Εισαγωγή

1.1 Φωσφορυλίωση - Πρωτεϊνικές Κινάσες.

Οι ομοιοπολικές, αντιστρεπτές ή μη αντιστρεπτές, τροποποιήσεις που ακολουθούν την μετάφραση των πρωτεϊνών όπως φωσφορυλίωση, αδενυλίωση, ακυλίωση, ουριδιλίωση, μεθυλίωση, ADP-ριβοζυλίωση κ.α, είναι αναγκαίες για να επιτελούν οι πρωτεΐνες το βιολογικό τους ρόλο. Η τροποποίηση των πρωτεϊνών με φωσφορυλίωση ή αποφωσφορυλίωση όπως καταλύεται από τις πρωτεϊνικές κινάσες και πρωτεϊνικές φωσφατάσες αντίστοιχα, αποτελεί έναν βασικό μηχανισμό ρύθμισης για τα βιολογικά συστήματα.

Η πρόσδεση της φωσφορικής ομάδας που αποτελείται από τέσσερα άτομα οξυγόνου συμμετέχει εκτεταμένα σε αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου οι οποίοι συνδέουν διάφορα μέρη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μιας πρωτεΐνης (Johnson et al., 1997) και προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση της, κοντά ή μακριά, στην περιοχή φωσφορυλίωσης με αποτέλεσμα την αλλαγή των επιφανειακών ιδιοτήτων της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την προαγωγή ή την αναστολή της βιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος σε ενδοκυτταρικές μεταβολικές διαδικασίες ή σχετίζονται με γονιδιακή έκφραση, κυτταρική ανάπτυξη και κινητικότητα, κυτταρική διαφοροποίηση και κυτταρική διαίρεση. Πιο ειδικά η φωσφορυλίωση μπορεί να αλλάξει την επιφανειακή διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης με συνέπειες στην αναγνώριση της από άλλες πρωτεΐνες ή να προάγει την κατάλληλη διαμόρφωση για αναγνώριση και σύνδεση, των υποστρωμάτων (σε περιπτώσεις ενζύμων) καθώς και ρυθμιστικών υπομονάδων. Μπορεί επίσης να προκαλεί αλλαγές στην τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή μιας πρωτεΐνης παρόμοιες με την αλλοστερική τροποποίηση της. Τέλος είναι δυνατόν να μην προκληθεί καμιά αλλαγή διαμόρφωσης, όπως στην περίπτωση των “σιωπηλών” φωσφορυλίωσεων που οι περιοχές φωσφορυλίωσης βρίσκονται σε σημεία του μορίου που δεν παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις.

Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση καταλύεται από τις πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες. Οι ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες είναι τα ένζυμα που καταλύουν την μεταφορά της γ φωσφορικής ομάδας του ATP ή GTP όπως στην περίπτωση της κινάσης της καζεΐνης II (Gatica et al., 1993) κυρίως σε μια σερίνη, θρεονίνη ή τυροσίνη των πρωτεϊνικών τους υποστρωμάτων (Krebs, 1986), αν και έχει αναφερθεί

και η περίπτωση της πρωτεϊνικής κινάσης της ιστόνης H4 που φωσφορυλιώνει ιστιδίνη (Huang et al., 1991).

1.1.1 Κατηγορίες Πρωτεϊνικών Κινασών.

Η κατάταξη των κινασών γίνεται με βάση το αμινοξύ που φωσφορυλιώνουν (Krebs, 1986). Έτσι διακρίνονται σε : (α) κινάσες σερίνης / θρεονίνης, (β) κινάσες τυροσίνης, (γ) κινάσες διπλής εξειδίκευσης, ικανές να φωσφορυλιώνουν σερίνη / θρεονίνη και τυροσίνη. Οι κινάσες σερίνης / θρεονίνης εντοπίζονται σε όλους τους ευκαρυώτες σε αντίθεση με τις κινάσες τυροσίνης που είναι εξελικτικά πιο σύγχρονες και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία και την κυτταρική ανάπτυξη. Ομοιότητες στην αμινοξική αλληλουχία συνηγορούν στην άποψη ότι όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες μοιράζονται μια κοινή περιοχή 270 περίπου αμινοξέων (Hanks & Hunter, 1995).

1.2 Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK)

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. Το μοριακό της βάρος έχει υπολογιστεί στα $1,3 \times 10^6$ Da. Είναι ένα ετεροτετραμερές μόριο και αποτελείται από 4 υπομονάδες με στοιχεία δεκαεξαμερούς (α,β,γ,δ)₄. Οι υπομονάδες α, β και δ είναι ρυθμιστικές ενώ η γ είναι η καταλυτική υπομονάδα. (Robert J. Brushia *et al.*, 1999). Η PhK είναι ένζυμο-κλειδί στον έλεγχο της γλυκογονόλυσης. Φωσφορυλιώνει την ανενεργό φωσφορυλάση (GP) του γλυκογόνου b (GPb) και τη μετατρέπει στην ενεργό φωσφορυλάση a (GPa) *in vivo*, αν και έχει βρεθεί ότι και άλλες πρωτεΐνες λειτουργούν ως υποστρώματά της *in vitro*, όπως η συνθάση του γλυκογόνου, η τροπονίνη I και η τροπονίνη T. (Robert J. Brushia *et al.*, 1999). Η ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου επιτυγχάνεται μέσω της φωσφορυλίωσης σε ένα κατάλοιπο σερίνης (ser14). Η PhK ενεργοποιείται ανταποκρινόμενη σε σήματα από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια- ορμόνες (πχ αδρεναλίνη, γλυκαγόνη), νευρικά ερεθίσματα (Ca^{2+}) και μεταβολικά σήματα (πχ

επίπεδα ADP) - ώστε να προκαλέσει την ταχεία κινητοποίηση του αποθηκευμένου γλυκογόνου. (Catherine Venien-Bryan, *et al.* 2009).

1.2.1 Ισομορφές της PhK.

Η PhK εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών -κυρίως στους μυς, στο ήπαρ και τον εγκέφαλο. Η PhK του εγκεφάλου απαντάται στα αστρογλοιακά κύτταρα, τα οποία φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του εγκεφάλου. Στους μύες, η ενεργοποίησή της συμβαίνει μέσω της απελευθέρωσης του Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο ως ανταπόκριση στη συστολή των μυών. (Joni S. Winchester, *et al.*, 2007).

1.2.2 Υπομονάδες της PhK.

Οι α και β υπομονάδες είναι μεγάλες πρωτεΐνες που μαζί αποτελούν περίπου το 80% του ολοενζύμου. Είναι ομόλογες ως προς την αλληλουχία τους, πράγμα που υποδηλώνει ότι πιθανόν να προέρχονται από κοινό προγονικό γονίδιο. Μαζί αναστέλλουν την καταλυτική δράση της γ υπομονάδας. Η α υπομονάδα διαθέτει 1230 αμινοξέα και μοριακό βάρος 134.8 KDa και η β υπομονάδα διαθέτει 1111 αμινοξέα και μοριακό βάρος 125,2 KDa. Τόσο η α όσο και η β υπομονάδα διαθέτουν περιοχές (που δεν ταυτίζονται) που μπορούν να φωσφορυλιωθούν. Η φωσφορυλίωση ή αυτοφωσφορυλίωση (*in vitro*) των περιοχών αυτών οδηγεί σε ενεργοποίηση της PhK. Και οι δύο υπομονάδες διαθέτουν διαφορετικές ισομορφές που εντοπίζονται σε διαφορετικούς ιστούς (μύες, συκώτι, εγκέφαλος). Ακόμη οι δύο αυτές υπομονάδες διαθέτουν μια αλληλουχία πολύ-ισοπρενυλίωσης στο C-τελικό τους άκρο ενώ είναι και φαρνεσυλιωμένες αν και δεν έχει εξηγηθεί ο λόγος που συμβαίνει αυτό. Έχει όμως βρεθεί ότι η φαρνεσυλίωση γενικά συμβάλλει στην πρόσδεση πρωτεϊνών σε μεμβράνες, οπότε είναι πιθανόν η PhK να ελέγχει με αυτόν τον τρόπο την τοποθέτησή της μέσα στο κύτταρο. Μπορεί ακόμη η φαρνεσυλίωση να βελτιώνει τον τρόπο σύνδεσης της α και β υπομονάδας ή να διευκολύνει την πρόσδεση της PhK σε άλλες πρωτεΐνες. (Robert J. Brushia *et al.*, 1999)

Η υπομονάδα δ έχει δράση καλμοδουλίνης. Είναι η μικρότερη και η μόνη υπομονάδα που διαθέτει μόνο μία ισομορφή. Διαθέτει 148 αμινοξέα και μοριακό βάρος 17,7 KDa. Η καλμοδουλίνη είναι ένα μόριο με κωδωνοειδές σχήμα, αποτελούμενο από μια κεντρική α-έλικα, που ενώνει δύο σφαιρικές περιοχές σύνδεσης του Ca^{2+} . Γενικά ένα μόριο καλμοδουλίνης συνδέεται σε πρωτεΐνες και τις ενεργοποιεί ή τις απενεργοποιεί έπειτα από σύνδεση με ιόντα ασβεστίου και στη συνέχεια αποσυνδέεται από αυτές όταν η συγκέντρωση του ασβεστίου μειωθεί.. Κάτι τέτοιο όμως δε συμβαίνει με τη δ υπομονάδα της PhK η οποία παραμένει προσκολλημένη στο ολοένζυμο ακόμη και μετά τη μείωση του ασβεστίου. (Robert J. Brushia *et al.*, 1999)

Η πρόσδεση Ca^{2+} στην υπομονάδα αυτή συνδέει τη συστολή των μυών με την παραγωγή ενέργειας. Συγκεκριμένα η σύσπαση του μυός οδηγεί στην απελευθέρωση Ca^{2+} από το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Στη συνέχεια όταν η συγκέντρωση του Ca^{2+} φτάσει σε υψηλά επίπεδα (της τάξης του 10^{-6}M) το ασβέστιο συνδέεται στην δ υπομονάδα προκαλώντας την αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωσή της και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση της PhK. Η δ υπομονάδα συνδέεται στενά με τη γ υπομονάδα στο C τελικό της άκρο (σε δύο συγκεκριμένες αλληλουχίες). Με την μείωση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στα μυϊκά κύτταρα η δ υπομονάδα παύει να ενεργοποιεί την καταλυτική υπομονάδα, αφού πλέον το ασβέστιο δεν συνδέεται πάνω της. (Robert J. Brushia *et al.*, 1999)

Η γ υπομονάδα έχει καταλυτικό ρόλο. Διαθέτει 386 αμινοξέα και μοριακό βάρος 44,7 KDa. Αποτελείται από μια περιοχή με δράση κινάσης (σερίνης - θρεονίνης) που εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-298) και μια ρυθμιστική περιοχή στο C-τελικό άκρο. Η περιοχή αυτή διαθέτει δύο περιοχές αλληλεπίδρασης με καλμοδουλίνη (αμινοξέα 301-327 και 342-367) και άρα αποτελεί την κύρια περιοχή πρόσδεσης με την δ υπομονάδα. Το τμήμα με δράση κινάσης είναι λειτουργικά ενεργό ακόμα και σε περίπτωση αποκοπής του από την υπόλοιπη πρωτεΐνη και μάλιστα η καταλυτική του ικανότητα αυξάνεται όταν είναι αποκομμένο. (Robert J. Brushia *et al.*, 1999). Ωστόσο δεν είναι δυνατόν να ρυθμιστεί μέσω φωσφορυλίωσης ή μέσω ασβεστίου σε αντίθεση με το ολοένζυμο. Αυτό συμβαίνει διότι απουσιάζουν οι περιοχές οι οποίες μπορούν να φωσφορυλιωθούν και οι δύο περιοχές σύνδεσης με την δ υπομονάδα που εντοπίζονται στο C- τελικό άκρο (Louise

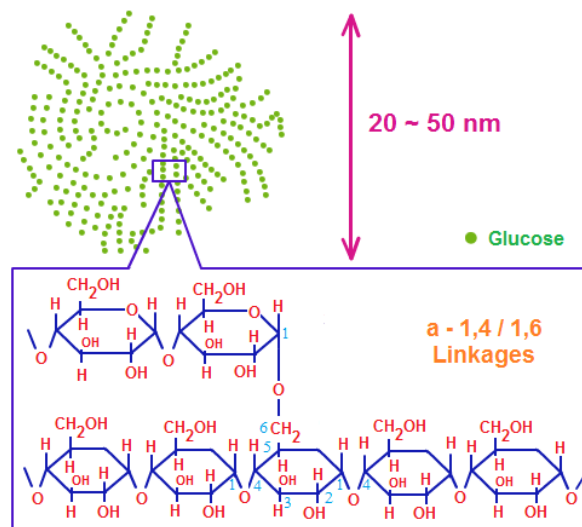
N. Johnson *et al.*, 1996). Οι δύο ισομορφές της (PhKg1 και PhKg2) εντοπίζονται στους σκελετικούς μύες και στο ήπαρ αντίστοιχα.

1.2.3 Υποκυτταρικός Εντοπισμός

Μελέτες στην εγκεφαλική ισομορφή του ενζύμου της PhK από εγκεφαλικό ιστό αρουραίων κατέδειξαν ότι η PhK εντοπίζεται σε αρκετά υποκυτταρικά διαμερίσματα. Έτσι σημαντικές συγκεντρώσεις του ενζύμου φαίνεται να υπάρχουν στα μιτοχόνδρια αλλά και στις μεμβράνες. Μάλιστα στα μιτοχόνδρια η κινάση εντοπίζεται τόσο στο διαμεμβρανικό χώρο όσο και στις μεμβράνες. Κάτι τέτοιο δεν φαίνεται να συμβαίνει όμως σε άλλους ιστούς, με εξαίρεση την ύπαρξη μικρής ενζυμικής δραστηριότητας στα μιτοχόνδρια της καρδιάς. Η ύπαρξη ενζυμικής δραστηριότητας στα συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα προτείνει την πιθανή ύπαρξη διαφορετικών μορφών της εγκεφαλικής ισομορφής της PhK. (Psarra *et al.*, 1996)

1.2.4 Ο ρόλος της PhK στο μεταβολισμό του γλυκογόνου

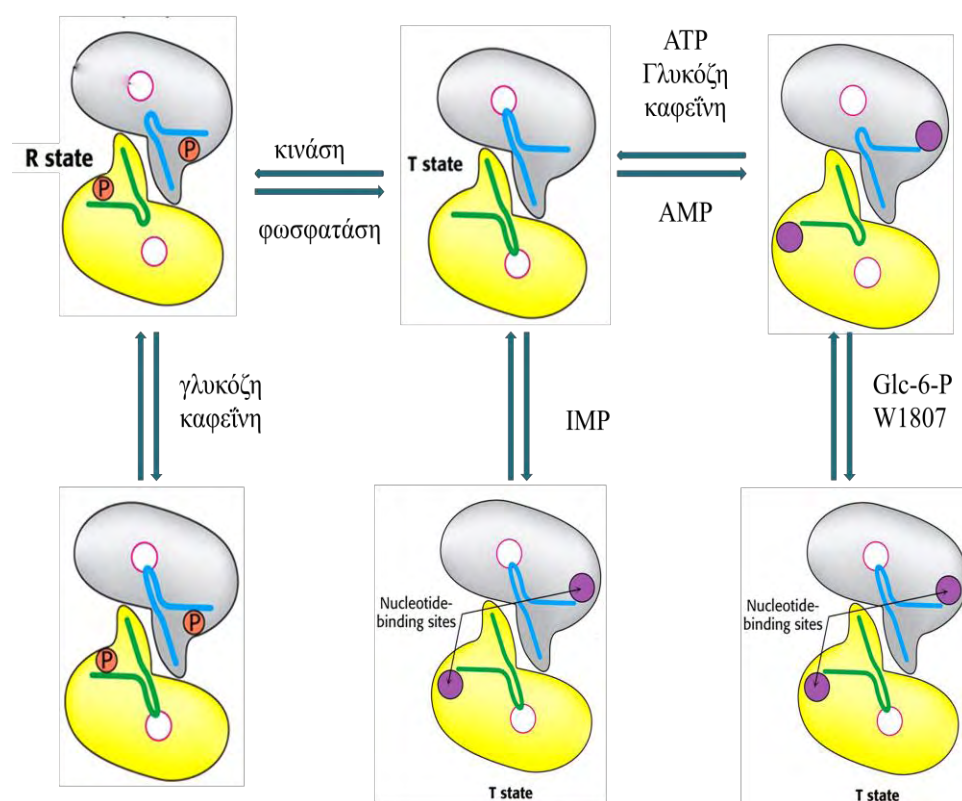
Το γλυκογόνο είναι ένα πολύ μεγάλο διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων α-D-γλυκόζης που μπορεί να αποικοδομηθεί για να αποδώσει γλυκόζη όταν χρειάζεται ενέργεια. Τα περισσότερα μόρια γλυκόζης του γλυκογόνου συνδέονται μεταξύ τους με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται από α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, οι οποίοι απαντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης (Stryer, 2001).



Εικόνα 1 Δομή γλυκογόνου (Biology Discussion.com)

Ο ελεγχόμενος μεταβολισμός του γλυκογόνου αυξάνει την ποσότητα γλυκόζης που είναι διαθέσιμη μεταξύ των γευμάτων. Συνεπώς, το γλυκογόνο ρυθμίζει τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Ο ρόλος αυτός του γλυκογόνου είναι πολύ σημαντικός, διότι η γλυκόζη είναι ουσιαστικά το μόνο καύσιμο που χρησιμοποιείται από τον εγκέφαλο, εκτός από την περίπτωση παρατεταμένης ασιτίας. Επιπλέον, η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική έντονη δραστηριότητα. Το γλυκογόνο αποθηκεύεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ και τους σκελετικούς μύες όπου εντοπίζεται στο κυττοσόλιο σε μορφή κοκκίων (glycogen particles). Η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο ήπαρ είναι γενικά μεγαλύτερη απ' ό,τι στους μύς, αλλά λόγω της μεγαλύτερης μάζας των γραμμωτών μυών εκεί αποθηκεύεται τελικά περισσότερο γλυκογόνο. Η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου στο ήπαρ ρυθμίζονται ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα της γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού ως συνόλου. Αντίθετα, στους μύς οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των αναγκών των μυών μόνο. Διάφορα ένζυμα λαμβάνουν μέρος στον καταβολισμό του γλυκογόνου, όμως το πιο καθοριστικό από αυτά είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) που καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του μορίου γλυκογόνου μέχρι και τέσσερις μονάδες γλυκόζης πριν από το σημείο διακλάδωσης. Για την απομάκρυνση των μορίων που βρίσκονται πλησιέστερα στη διακλάδωση, απαιτείται ένα ένζυμο αποδιακλάδωσης, η γλυκοζιδάση α-1,6, καθώς

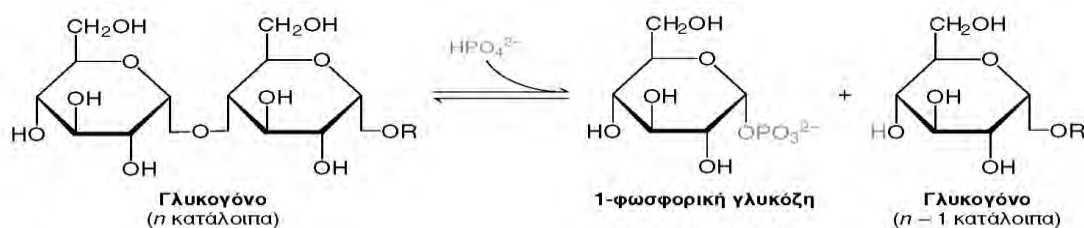
και μια μεταφοράση. Ο γλυκοζιτικός δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα (C-1) του τελικού μορίου και του τέταρτου άνθρακα (C-4) του γειτονικού μορίου διασπάται από το ορθοφωσφορικό ιόν. Ειδικότερα, ο δεσμός μεταξύ του πρώτου άνθρακα και του γλυκοζιτικού οξυγόνου διασπάται από το ορθοφωσφορικό και διατηρείται η διαμόρφωση α του πρώτου άνθρακα. Η GP μπορεί να βρίσκεται στην ενεργό μορφή α (GPα) και τη μη ενεργό μορφή β (GPβ). Η αλληλομετατροπή μεταξύ των δύο αυτών διαμορφώσεων γίνεται με φωσφορυλίωση. Συγκεκριμένα η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) φωσφορυλιώνει την ανενεργό φωσφορυλάση β (GPβ) και τη μετατρέπει σε ενεργό φωσφορυλάση α (GPα). (Εικόνα 2). Στους μυς η μορφή β της φωσφορυλάσης ενεργοποιείται από το AMP ενώ στο ήπαρ η γλυκόζη αναστέλλει τη μορφή α. (Stryer *et al.*, 2001).



Εικόνα 2 Ρύθμιση της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Stryer *et al.*, 2001)

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, γιατί το ελευθερωμένο σάκχαρο είναι φωσφορυλιωμένο. Μια υδρολυτική διάσπαση θα έδινε ένα σάκχαρο (γλυκόζη), το οποίο θα απαιτούσε μια φωσφορυλίωση με την κατανάλωση ενός μορίου ATP για να εισέλθει στη γλυκολυτική πορεία. Ένα πρόσθετο πλεονέκτημα της φωσφορολυτικής διάσπασης για τα κύτταρα των μυών είναι το γεγονός ότι η 1-φωσφορική γλυκόζη ιοντίζεται κάτω από φυσιολογικές

συνθήκες και δεν είναι δυνατόν να υποστεί διάχυση προς το εξωτερικό του κυττάρου, σε αντίθεση με τη γλυκόζη (Stryer *et al.*, 2001).



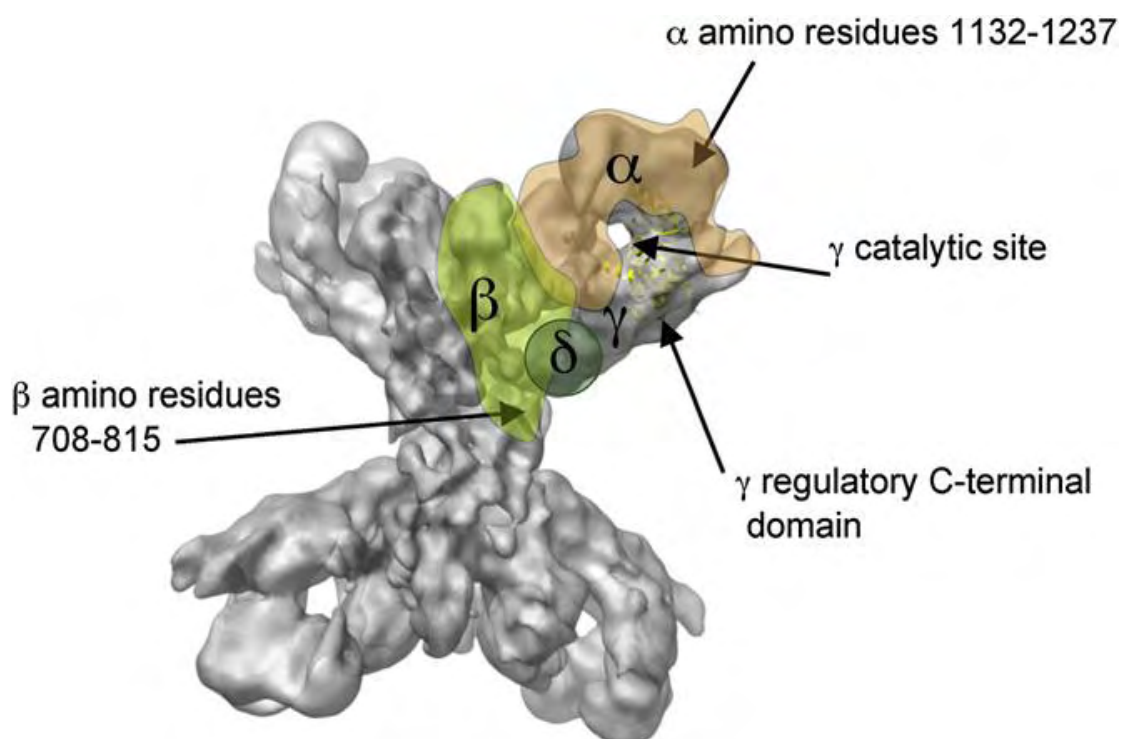
Εικόνα 3 Αποικοδόμηση γλυκογόνου (Stryer 2001)

Οι διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου, που εντοπίζονται στους μύες και στο ήπαρ, αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές πορείες που μπορεί να ακολουθήσει η 1-φωσφορική γλυκόζη, που είναι το κύριο προϊόν της γλυκογονόλυσης.

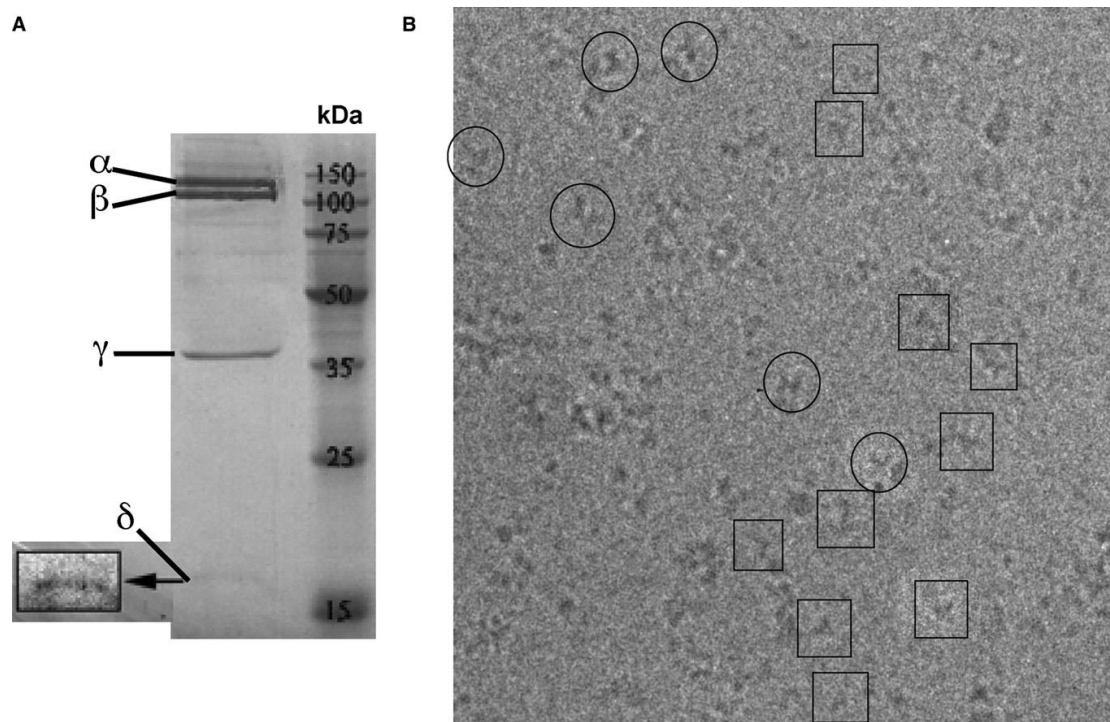
1.2.5 Δομή

Η PhK είναι μια από τις μεγαλύτερες και δομικά περίπλοκες πρωτεϊνικές κινάσες. Το μοριακό της βάρος έχει υπολογιστεί στα $1,3 \times 10^6$ Da. Είναι ένα ετεροτετραμερές μόριο και αποτελείται από 4 υπομονάδες με στοιχεία δεκαεξαμερούς $(\alpha, \beta, \gamma, \delta)_4$. Οι υπομονάδες α , β και δ είναι ρυθμιστικές ενώ η γ είναι η καταλυτική υπομονάδα. (Robert J. Brushia *et al.*, 1999). Το ολοένζυμο έχει σχήμα πεταλούδας, όπως έχει διαπιστωθεί από μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (εικόνα 5) στην PhK του κουνελιού με ανάλυση 9,9Å, με δύο λοβούς (σε σχήμα φτερών) που συνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια δύο δομών που θυμίζουν «λοξές γέφυρες». Οι διαστάσεις ολόκληρου του ενζύμου είναι 270x225x160 Å. Οι διαστάσεις των λοβών έχουν υπολογιστεί στα 225Å x 110Å και οι γέφυρες έχουν μήκος 55Å και πλάτος 45Å. Εκτός από τη δομή πεταλούδας, όμως, οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν αποκαλύψει και την ύπαρξη άλλων στερεοδιαμορφώσεων. (Catherine Venien-Bryan, *et al.* 2009). Μελέτες ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας και σταυροσυνδέσεων συνέβαλαν στην αναγνώριση των πιθανών θέσεων των επιμέρους υπομονάδων. Η υπομονάδα α είναι πιθανό βρίσκεται στο εξωτερικό άνω τμήμα των λοβών. Το N-

τελικό της άκρο αλληλεπιδρά με τη β υπομονάδα, ενώ το C-τελικό της με τη γ υπομονάδα. Η β υπομονάδα εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα των λοβών και αλληλεπιδρά με την α και τη γ υπομονάδα. Η γ υπομονάδα βρίσκεται στο εσωτερικό των λοβών όπως επαληθεύτηκε από σύνδεση ειδικών αντισωμάτων. Όπως αναφέρθηκε αλληλεπιδρά με την α υπομονάδα ενώ το C-τελικό της άκρο φαίνεται να αλληλεπιδρά με τη δ υπομονάδα, η οποία εντοπίζεται κοντά στη γέφυρα. (Εικόνα 4) (Skamnaki *et al.*, 2013)



Εικόνα 4 Σχηματική αναπαράσταση της δομής της ολοενζύμου της PhK σε ευκρίνεια 9.9 Å. όπου εντοπίζεται κάθε υπομονάδας της. (Catherine Venien-Bryan, et al. 2009)



Εικόνα 5 Α) Ηλεκτροφόρηση PhK σε πήκτωμα 10% SDS-PAGE

Β) Κρυο-ηλεκτρονική μικρογραφία της PhK. Η χαρακτηριστική μορφή πεταλούδας επισημαίνεται με κύκλο, ενώ οι λοιπές διαμορφώσεις με τετράγωνο (Catherine Venien-Bryan, et al. 2009)

1.2.5.1 γ υπομονάδα

Η καταλυτική γ υπομονάδα της PhK έχει εντοπιστεί με τη βοήθεια αντισωμάτων που συνδέονται σε αυτή (μέθοδος ELISA). Φαίνεται ότι βρίσκεται στο εσωτερικό των λοβών. Όπως προαναφέρθηκε, διαθέτει δύο περιοχές: μια περιοχή με δράση κινάσης (σερίνης/θρεονίνης) που εντοπίζεται στο N-τελικό άκρο (αμινοξέα 1-298) και μια ρυθμιστική περιοχή στο C-τελικό άκρο η οποία και συνδέεται με τη δ υπομονάδα. Η περιοχή με δράση κινάσης αποτελείται από ένα σχετικά μικρό αρχικό τμήμα (αμινοξέα 14-107) που σχηματίζεται κυρίως από β-φύλλα και από ένα μεγαλύτερο τμήμα (αμινοξέα 110-292) αποτελούμενο κυρίως από α έλικες. (Lowe E. D., et al., (1997). Σε προσπάθειες που έγιναν για απομόνωση της γ υπομονάδας από το υπόλοιπο ένζυμο, παρατηρήθηκε ότι απομονώνεται μαζί με τη δ υπομονάδα. Οι δύο υπομονάδες μπορούν να διαχωριστούν μόνο υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ενώ παραμένουν στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους ακόμα και απουσία Ca^{2+} . Η τομή σε οποιοδήποτε από τα αμινοξέα 290, 296 και 298 οδηγεί στη δημιουργία μιας πλήρως λειτουργικής καταλυτικής μονάδας ανεξάρτητης από την παρουσία ασβεστίου. Αυτό υποδηλώνει ότι η δράση της καταλυτικής υπομονάδας γ αναστέλλεται από την

σύνδεσή της με τις άλλες υπομονάδες. Αν και δεν είναι γνωστή η δομή του C-τελικού άκρου, από τη σύγκρισή της με άλλες πρωτεϊνικές κινάσες φαίνεται πως η γ υπομονάδα διαθέτει επιπλέον και μια περιοχή αυτοαναστολής στο άκρο αυτό. Η περιοχή αυτή αναδιπλώνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να μπλοκάρει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, παρεμποδίζοντας τη σύνδεση των υποστρωμάτων ή του ATP σε αυτό. (Εικόνα 6)

1.2.5.2 Μελέτες στη δομή της γ υπομονάδας

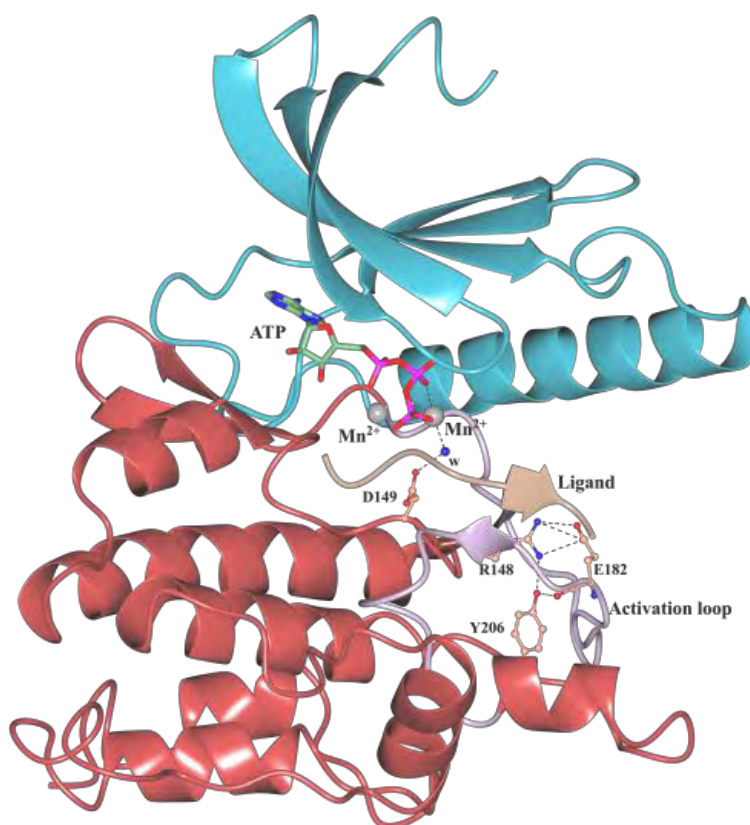
Η έκφραση της ανασυνδυασμένης γ υπομονάδας σε κύτταρα *E. coli* έδειξε ότι αν και η πρωτεΐνη που προκύπτει από ολόκληρο το γονίδιο εκφράζεται υπό τη μορφή αδιάλυτων (inclusion bodies), η κολοβωμένη μορφή της (στο αμινοξύ 297) εκφραζόταν σε διαλυτή μορφή. (Owen *et al.* 1995) Ακόμη η κολοβωμένη μορφή έδειξε παρόμοιες κινητικές παραμέτρους και εξάρτηση από μεταλλικά ιόντα με το ολοένζυμο με τη διαφορά ότι η δράση της ήταν ανεξάρτητη από την παρουσία ιόντων Ca^{2+} ή καλμοδουλίνης. Ακόμη μελέτες έδειξαν ότι μπορούν να παραχθούν μεγάλες ποσότητες της πρωτεΐνης μέσω αναδίπλωσης των αδιάλυτων (inclusion bodies) που δημιουργούνται κατά την έκφραση της πρωτεΐνης στους 37°C. Η μεθοδολογία αυτή παρήγαγε πρωτεΐνη που μπορούσε να κρυσταλλωθεί και κατά συνέπεια να μελετηθεί η δομή ολόκληρης και της κολοβωμένης μορφής της. (Owen *et al.* 1995)

Οι παραπάνω μελέτες έριξαν φως στη δομή και τη λειτουργία της καταλυτικής υπομονάδας της PhK. Παρ' όλα αυτά η περαιτέρω μελέτη της κινάσης περιορίζεται από τον τρόπο παραγωγής της προς κρυστάλλωση. Οι παραπάνω μέθοδοι είναι επίπονες και η πρωτεΐνη που παράγεται είναι ευαίσθητη σε πρωτεόλυση και οξείδωση κατά την αναδίπλωσή της. Επιπλέον είναι αδύνατη η δημιουργία κρυστάλλων έπειτα από αποθήκευση της πρωτεΐνης στους 4°C για πάνω από μία με δύο μέρες, έστω κι αν η πρωτεΐνη είναι καθαρή και καταλυτικά σταθερή.

Η γ υπομονάδα φαίνεται να διαθέτει μια ακόμα περιοχή στο εσωτερικό της. Το τμήμα αυτό λέγεται τμήμα ενεργοποίησης. Τα αμινοξέα 167-193 ανήκουν στο τμήμα ενεργοποίησης της hPhK γ . Ως τμήμα ενεργοποίησης ορίζεται το τμήμα που αποτελείται από τις συντηρούμενες αμινοξικές αλληλουχίες DFG και APE που αντιστοιχούν στα αμινοξέα 184-208 στην cAPK (Taylor & Radzio-Andzelm, 1994).

Η φωσφορυλίωση του τμήματος ενεργοποίησης έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου

Η φωσφορική ομάδα διαφόρων κινασών που έχουν φωσφορυλιωθεί στο τμήμα ενεργοποίησης παίρνει μέρος σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις με ομάδες βασικών αμινοξέων. Αυτές οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν το τμήμα ενεργοποίησης το οποίο εντοπίζεται στο κέντρο σύνδεσης του υποστρώματος. Στη περίπτωση της PhK, το αμινοξύ του τμήματος ενεργοποίησης που αντιστοιχεί στην Thr197 της cAPK είναι το Glu182. Η PhK είναι συνεχώς ενεργή, χωρίς φωσφορυλίωση αφού τη θέση του φωσφορυλιωμένου αμινοξέος του τμήματος ενεργοποίησης σε άλλες κινάσες κατέχει το Glu182 το οποίο αλληλεπιδρά με την Arg148, η οποία με τη σειρά της σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την Tyr206, όπως φαίνεται και στην εικόνα 6.

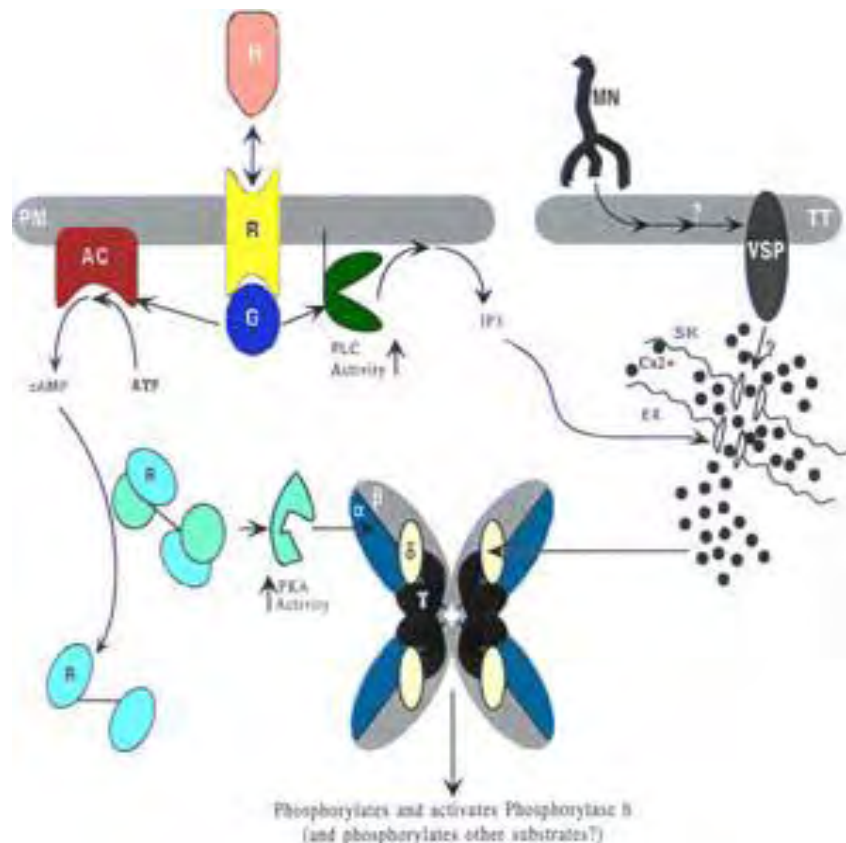


Εικόνα 6 Σχηματική απεικόνιση της γ υπομονάδας της PhK. Η N-τελική περιοχή φαίνεται με μπλε χρώμα. Η περιοχή με δράση κινάσης αποτελείται από ένα σχετικά μικρό αρχικό τμήμα (αμινοξέα 14-107) που σχηματίζεται κυρίως από β -φύλλα και από ένα μεγαλύτερο τμήμα (αμινοξέα 110-292) αποτελούμενο κυρίως από α έλικες. Τα αμινοξέα 167-193 ανήκουν στο τμήμα ενεργοποίησης της hPhKγ (μωβ χρώμα). Το C-τελικό άκρο φαίνεται με κόκκινο χρώμα. Ακόμη διαφαίνονται τα αμινοξέα Glu182, Arg148 και Tyr206.

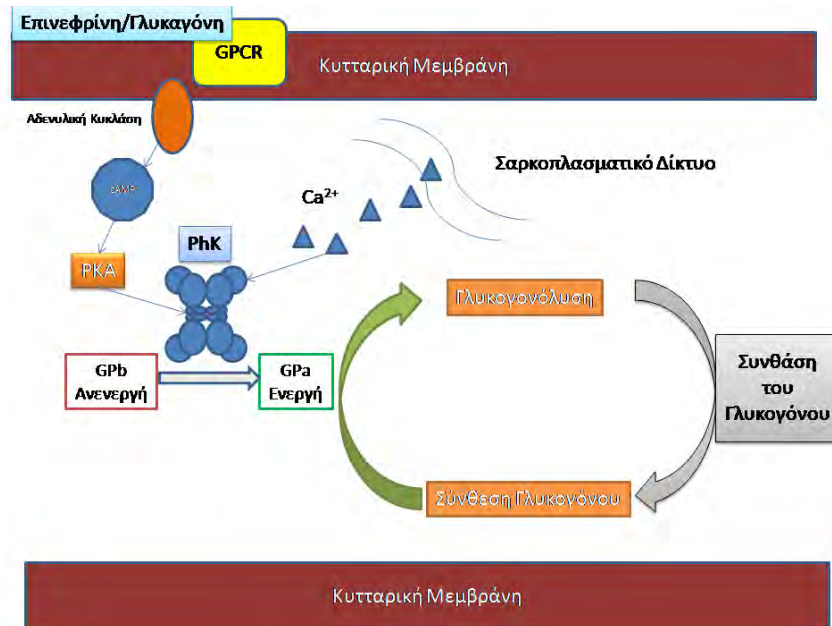
1.2.6 Ρύθμιση ενζυμικής δραστηριότητας

Μηχανισμοί ρύθμισης της PhK

Η Phk φωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Όπως φαίνεται και στις εικόνες 7 και 8 η PKA ενεργοποιείται μέσω του καταρράκτη του κυκλικού AMP (cAMP). Ορισμένες ορμόνες (όπως η αδρεναλίνη που συνδέεται σε β-αδρενεργικούς υποδοχείς στους περισσότερους ιστούς και η γλυκαγόνη στο ήπαρ) προκαλούν την ταχεία αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Συγκεκριμένα το cAMP είναι ένα ενδοκυτταρικό κυκλικό νουκλεοτίδιο τα επίπεδα του οποίου ρυθμίζονται από την ισορροπία μεταξύ της δράσης δύο ενζύμων: της αδενυλικής κυκλάσης (AC) που καταλύει την παραγωγή του από το ATP και μιας φωσφοδιεστεράσης (PDE) η οποία το διασπά. Η δραστηριότητα της αδενυλικής κυκλάσης διεγείρεται ύστερα από αλληλεπίδραση με G πρωτεΐνες ή διάφορα είδη φωσφοδιεστεράσης. Οι ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες διασπώνται σε α υπομονάδα και στο σύμπλοκο βγ το οποίο και ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση. Κύριος στόχος του cAMP είναι η πρωτεϊνική κινάση A (PKA ή αλλιώς εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση ή cAPK) η οποία ενεργοποιείται και στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την PhK. Η φωσφορυλίωση συμβαίνει αρχικά σε τέσσερις περιοχές της β υπομονάδας, αυξάνοντας έτσι την εξειδίκευση της κινάσης. Φωσφορυλίωση συμβαίνει παράλληλα και στη α υπομονάδα (σε 7 περιοχές) προς ενίσχυση του αποτελέσματος της φωσφορυλίωσης της β υπομονάδας, όμως η φωσφορυλίωση της α από μόνη της δεν οδηγεί στην ενεργοποίηση της Phk. Αφού η PKA φωσφορυλιώνει και την α και τη β υπομονάδα κι επειδή υπάρχουν τέσσερις από κάθε υπομονάδα στο ολοένζυμο, είναι πιθανόν να δημιουργούνται πολλά φωσφορυλιωμένα ενδιάμεσα (ανάλογα με τον αριθμό των υπομονάδων που φωσφορυλιώνονται) στον καταρράκτη ενεργοποίησης από το cAMP. Συνεπώς η φωσφορυλίωση δεν αποτελεί έναν απλό διακόπτη on/off αλλά έναν πολύπλοκο μηχανισμό ρύθμισης της δράσης και της εξειδίκευσης του ολοενζύμου σε πολλά στάδια. (Robert J. Brushia and Donal A. Walsh, (1999), (Stryer *et al.*, 2001)



Εικόνα 7 Μονοπάτια ενεργοποίησης της PhK (Robert J. Brushia and Donal A. Walsh, 1999)



Εικόνα 8 PhK και μεταβολισμός του γλυκογόνου. Ορμονικά ερεθίσματα προσδένονται σε μεμβρανικούς υποδοχείς (GPCR) που με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλες πρωτεΐνες (αδενυλική κυκλάση). Η PKA ενεργοποιείται από το cAMP και στη συνέχεια ενεργοποιεί την PhK με φωσφορυλίωση. Η PhK ενεργοποιεί στη συνέχεια την φωσφορυλάση του γλυκογόνου φωσφορυλιώνοντάς την.

Ασβεστόιο και αυτοαναστολή

Η δράση της Phk είναι ασβεστοεξαρτώμενη. Οι ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τη φωσφολιπάση C οδηγώντας στη απελευθέρωση της τριφωσφορικής ινositόλης (IP3), η οποία συνδέεται στους ειδικούς υποδοχείς της στο ενδοπλασματικό και το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Ακόμη στα μυϊκά κύτταρα η εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί σε ενεργοποίηση του υποδοχέα της διυδροπυριδίνης (DHPR) που συνδέεται μηχανικά με τον υποδοχέα της ρυανοδίνης, απελευθερώνοντας ιόντα Ca στο κυτταρόπλασμα (Berridge et al 2000, Carafoli, 2002). Η υπομονάδα που ελέγχει τη ρύθμιση μέσω ασβεστίου είναι η δ, που έχει δράση καλμοδουλίνης. Έχει προταθεί ότι το C τελικό άκρο της γ υπομονάδας (η περιοχή που συνδέεται με τη δ υπομονάδα) περιλαμβάνει έναν ασβεστοεξαρτώμενο μοριακό διακόπτη. Όταν ο διακόπτης αυτός βρίσκεται στην κατάσταση off (απουσία Ca^{2+}) η περιοχή αναδιπλώνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να παρεμποδίζεται η προσέγγιση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Αντίθετα παρουσία Ca^{2+} η δ υπομονάδα συνδέεται στο C τελικό άκρο της γ υπομονάδας μεταβάλλοντας την κατάσταση από off σε on και επιτρέποντας στην καταλυτική υπομονάδα να προσεγγίσει την φωσφορυλάση του γλυκογόνου. (Robert J. Brushia and Donal A. Walsh, 1999)

Η ενεργοποίηση μέσω ασβεστίου μπορεί να επιτευχθεί και μέσω της σύνδεσής του στις υπομονάδες α και β, κάτι τέτοιο όμως δεν έχει αναλυθεί πλήρως.

Τόσο η φωσφορυλίωση όσο και η σύνδεση Ca^{2+} ενεργοποιούν μόνο μερικώς την PhK. Η μέγιστη δραστηριότητα του ενζύμου όμως επιτυγχάνεται με ταυτόχρονη φωσφορυλίωση της β υπομονάδας και σύνδεσης Ca^{2+} στη δ υπομονάδα.

Απενεργοποίηση της PhK

Η μεταβολική «μετατόπιση» από την γλυκογενόλυση στη σύνθεση του γλυκογόνου επιτυγχάνεται μέσω της αποφωσφορυλίωσης της PhK, της GPa και της συνθάσης του γλυκογόνου από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1). Η αργή φωσφορυλίωση των υπομονάδων α εξασφαλίζει ότι η κινάση και διαδοχικά η φωσφορυλάση παραμένουν ενεργές για μεγάλο διάστημα. (Stryer *et al.*, 2001).

Η ρύθμιση της δραστηριότητας της Phk γίνεται με τους παραπάνω τρόπους ή με συνδυασμό τους. Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι το pH επιδρά σημαντικά στην δράση

του ενζύμου *in vitro* (η δραστηριότητα του ενζύμου αυξάνεται όταν το pH μεταβαίνει από 6,8 προς 8,2) (Robert J. Brushia and Donal A. Walsh, (1999))

1.2.7 Αναγνώριση υποστρωμάτων

Η PhK αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αμινοξική αλληλουχία πάνω στην GPb πάνω στην οποία προσδένεται ώστε να φωσφορυλιώσει το κατάλοιπο σερίνης 14. Η αλληλουχία αυτή φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

Phosphorylase	KRKQISVRGL.
Neuromodulin_B50_GAP43	TKIQASFRGH.
Neurogranin	AKIQASFRGH.
MC-peptide	..RQMSFRL..
Optimal	..FRMMSFFLP.
PhKbeta426-435	QKRFPSCNCR.
PhKbeta22-30	..KRSGSIYEP.
Tau	...IGSTENLK

	Residue & Position							
Consensus Sequence	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3
	Lysine/Arginine	Lysine/Arginine	Glutamine	Small/Aliphatic	Convertible Serine	Phenylalanine/Aliphatic	Arginine/hydrophobic	Glycine

Εικόνα 9 Αλληλουχία αναγνώρισης από την PhK. Η αλληλουχία αυτή εντοπίζεται και σε άλλες πρωτεΐνες (επάνω). Τα αμινοξέα που την αποτελούν φαίνονται κάτω.

Το MC-πεπτίδιο διαθέτει μια αλληλουχία αμινοξέων που καθιστούν ισχυρότερη τη σύνδεση της PhK σε αυτό. Η PhK έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το MC-πεπτίδιο ($K_m = 400 \mu M$) σε σχέση με το φυσικό πεπτίδιο (NS: Ac-Lys-Gln- Ile-Ser-Val-Arg-Gly) ($K_m = 1800 \mu M$) που η αμινοξική του αλληλουχία αντιστοιχεί σε αυτή της GPb (αμινοξέα 11-17). Και τα δύο πεπτιδικά υποστρώματα έχουν περίπου 50 φορές μεγαλύτερη K_m σε σχέση με την GPb.

1.2.8 Καταλυτικός Μηχανισμός

Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα για την PhK (Owen *et al.*, 1995ab; Lowe *et al.*, 1997) και άλλες κινάσες συμφωνούν με τον μηχανισμό ευθύγραμμης μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας όπως περιγράφεται (Skamnaki *et al.*, 1999; Skamnaki &

Oikonomakos, 2000) και συνοψίζεται ο μηχανισμός μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας μπορεί να θεωρηθεί περίπτωση οξεοβασικής κατάλυσης.

Συνδυασμός κινητικών μελετών και μελετών σε διαλύματα διαφορετικού ιζώδους έδειξαν ότι η PhKγtrc, όπως και η PKA, παρουσιάζουν έναν μηχανισμό κατά τον οποίο το χημικό βήμα της μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας είναι γρήγορο ενώ το αργό βήμα είναι η απελευθέρωση των προϊόντων.

Στον πίνακα 1 φαίνονται οι κινητικές παράμετροι της PhKγtrc όταν αυτή συνδέεται με το ATP ή με την GPb.

Πίνακας 1 Κινητικές Παράμετροι της PhKγtrnc

Ενζυμικός τύπος	Ως προς μεταβλητή [GPb]			Ως προς μεταβλητή [ATP]		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}s^{-1}$)
PhKγtrnc	66.7 ± 2	8.9 ± 0.6	7.5	56.7 ± 2	105 ± 10	0.54

1.2.9 Η PhK ως μοριακός φαρμακευτικός στόχος

Μελέτες κυτταρικών και ζωικών μοντέλων έδειξαν ότι η αναστολή της PhK οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της GPb ευνοώντας τη γλυκογονική σύνθεση καθιστώντας έτσι, την PhK υποσχόμενο στόχο για αντιγλυκαιμικά φάρμακα. Πρόσφατα μελετήθηκε η σύνδεση του εξειδικευμένου αναστολέα KT5720 και μια σειράς αναλόγων ινδιρουβίδης στη PhKγtrc. (Begum J, *et al.*, 2015)

Επιπροσθέτως, η γλυκογονίαση IX συγκαταλέγεται στις σπάνιες μεταβολικές νόσους (1 άτομο ανά 100.000) και οφείλεται σε ανεπάρκεια της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK). Με βάση ιστολογικές παρατηρήσεις η ανεπάρκεια της PhK οδηγεί σε παθολογική συσσώρευση γλυκογόνου στους ιστούς (ασθένεια εναπόθεσης γλυκογόνου). Ισομορφές των υπομονάδων της PhK εκφράζονται σε διάφορους ιστούς και οι δύο τύποι της νόσου οφείλονται σε μεταλλάξεις της ηπατικής ή της μυϊκής ισομορφής του ενζύμου αντίστοιχα και

διαφέρουν ως προς την ηλικία εμφάνισης της νόσου και τα συμπτώματα. Μεταλλάξεις του γονιδίου PHKA1 που κωδικοποιεί την μυϊκή α υπομονάδα είναι υπεύθυνες για την ανεπάρκεια της μυϊκής PhK ενώ αντίστοιχα μεταλλάξεις του γονιδίου PHKA2 είναι υπεύθυνες για την πιο κοινή φυλοσύνδετη ανεπάρκεια της ηπατικής PhK (φυλοσύνδετη ηπατική γλυκογονίαση XLG)

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν νέες ιδέες για την αξιοποίηση της PhK ως φαρμακευτικού στόχου. Μελέτες έδειξαν ότι η γονιδιακή υπερέκφραση της PhK σχετίζεται με παθολογική αγγειογένεση και ανάπτυξη όγκων ενώ μελέτες σάρωσης αναστολέων υψηλής απόδοσης σε *in vivo* σύστημα zebrafish και *in vitro* μοντέλων αγγειογένεσης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση νέων αναστολέων της PhK με αντι-αγγειογενετική δράση. (Camus *et al* 2011)

1.3 Ετερόλογη έκφραση

Με τον όρο ετερόλογη έκφραση αναφερόμαστε στην έκφραση ενός γονιδίου ή τμήματός του από έναν οργανισμό-ξενιστή, ο οποίος φυσιολογικά δεν περιέχει το γονίδιο αυτό ή τμήμα του. Η εισαγωγή του DNA στον ετερόλογο φορέα γίνεται με τη βοήθεια της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Η ετερόλογη έκφραση μπορεί να γίνει σε πολλούς διαφορετικούς τύπους οργανισμών όπως βακτήρια, ζύμες, φυτικά ή ζωικά κύτταρα.

1.3.1 Συστήματα έκφρασης

Για την παραγωγή μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες είναι απαραίτητη η επιλογή του κατάλληλου συστήματος έκφρασης. Στα περισσότερα πειράματα που απαιτούν την έκφραση πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται προκαρυωτικά συστήματα έκφρασης. Ο κυριότερος βακτηριακός ξενιστής είναι η *E. coli*. Ένα άλλο σύστημα έκφρασης αξιοποιεί τη χρήση ευκαρυωτικών ξενιστών όπως ζύμες (πχ. *Pichia pastoris*, *S.cerevisiae* κ.α). Ως μήτρα για ενίσχυση μέσω PCR χρησιμοποιούνται είτε γονιδιώματα προκαρυωτών, είτε DNA από cDNA βιβλιοθήκες ευκαρυωτών. Στη συνέχεια το DNA τοποθετείται σε έναν πλασμιδιακό φορέα ο οποίος συχνά του προσδίδει μια αλληλουχία αγκιστείας στο N-τελικό ή C-τελικό

άκρο (πχ HisTag ή GST tag) κάτι που διευκολύνει τον μετέπειτα καθαρισμό της πρωτεΐνης. Συχνά γίνεται χρήση ακόμα πιο πολύπλοκων ευκαρυωτικών ξενιστών όπως κύτταρα θηλαστικών (ανθρώπου, ποντικού) ή και φυτών. Τέλος υπάρχουν συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών τα οποία δεν κάνουν χρήση κυττάρων, αλλά αντιγράφουν τους μηχανισμούς έκφρασης προκαρυωτών ή ευκαρυωτών. Η χρήση microchip πλακετών είναι η βάση της τεχνικής αυτής η οποία αποσκοπεί να ελαττώσει το χρόνο που απαιτείται για την έκφραση μιας πρωτεΐνης αλλά και να αυξήσει την ποσότητα που παράγεται. Ανασταλτικός παράγοντας για την πλήρη αξιοποίηση του συστήματος αυτού αποτελεί το γεγονός ότι δεν είναι δυνατή η δημιουργία δισουλφιδικών γεφυρών. (Shigeyuki Yokoyama, 2003).

Η επιλογή του κατάλληλου συστήματος έκφρασης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Κάποιοι από αυτούς είναι το είδος της πρωτεΐνης που πρόκειται να εκφραστεί, η πιθανή τοξικότητα της πρωτεΐνης προς κάποιους φορείς, εάν είναι απαραίτητες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, η ποσότητα της πρωτεΐνης που θα ήταν επιθυμητή, η μέθοδος καθαρισμού της πρωτεΐνης, το κόστος παραγωγής, οι συνθήκες ασφαλείας που πρέπει να τηρηθούν και τέλος για ποιο λόγο χρειαζόμαστε την πρωτεΐνη αυτή (πχ δομικές ή λειτουργικές μελέτες). (Kishwar Hayat Khan, 2013).

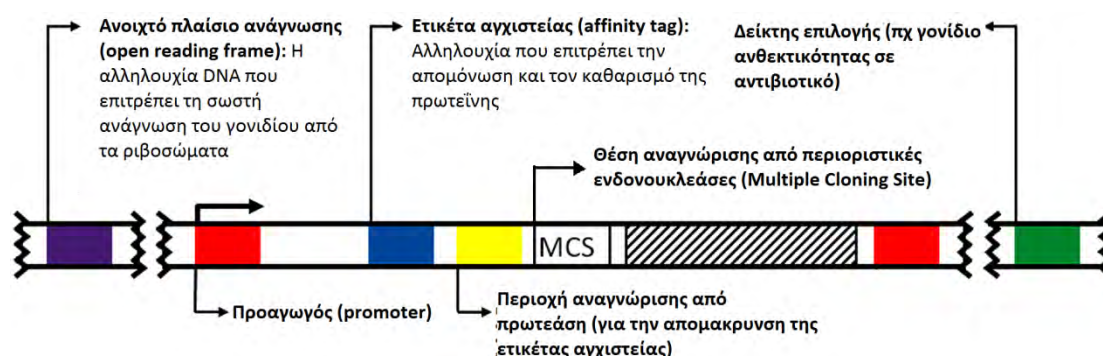
1.3.2 Έκφραση σε *E.coli*

Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση της *E. coli* ως οργανισμού - φορέα είναι γνωστά. Έχει εξαιρετικά ταχεία ανάπτυξη. Υπό βέλτιστες περιβαλλοντικές συνθήκες, ο χρόνος διπλασιασμού της είναι περίπου 20 λεπτά. Αυτό σημαίνει ότι μία καλλιέργεια μπορεί να φθάσει στην στατική φάση μέσα σε λίγες ώρες. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η έκφραση μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης μπορεί να προκαλέσει μία μεταβολική επιβάρυνση για τον μικροοργανισμό, προκαλώντας μια σημαντική αύξηση του χρόνου παραγωγής. Τα μέσα καλλιέργειας είναι σχετικά φθηνά ενώ ο μετασχηματισμός με εξωγενές DNA είναι γρήγορος και απλός. (Germán L. Rosano and Eduardo A. Ceccarelli, 2014).

1.3.3 Φορείς έκφρασης-βασικά χαρακτηριστικά

Οι πιο κοινοί φορείς έκφρασης που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι αποτέλεσμα του ρεπλικονίων, προαγωγών, δεικτών επιλογής, πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης και αλληλουχιών αγκιστείας που επιτρέπουν την πρωτεϊνική σύντηξη

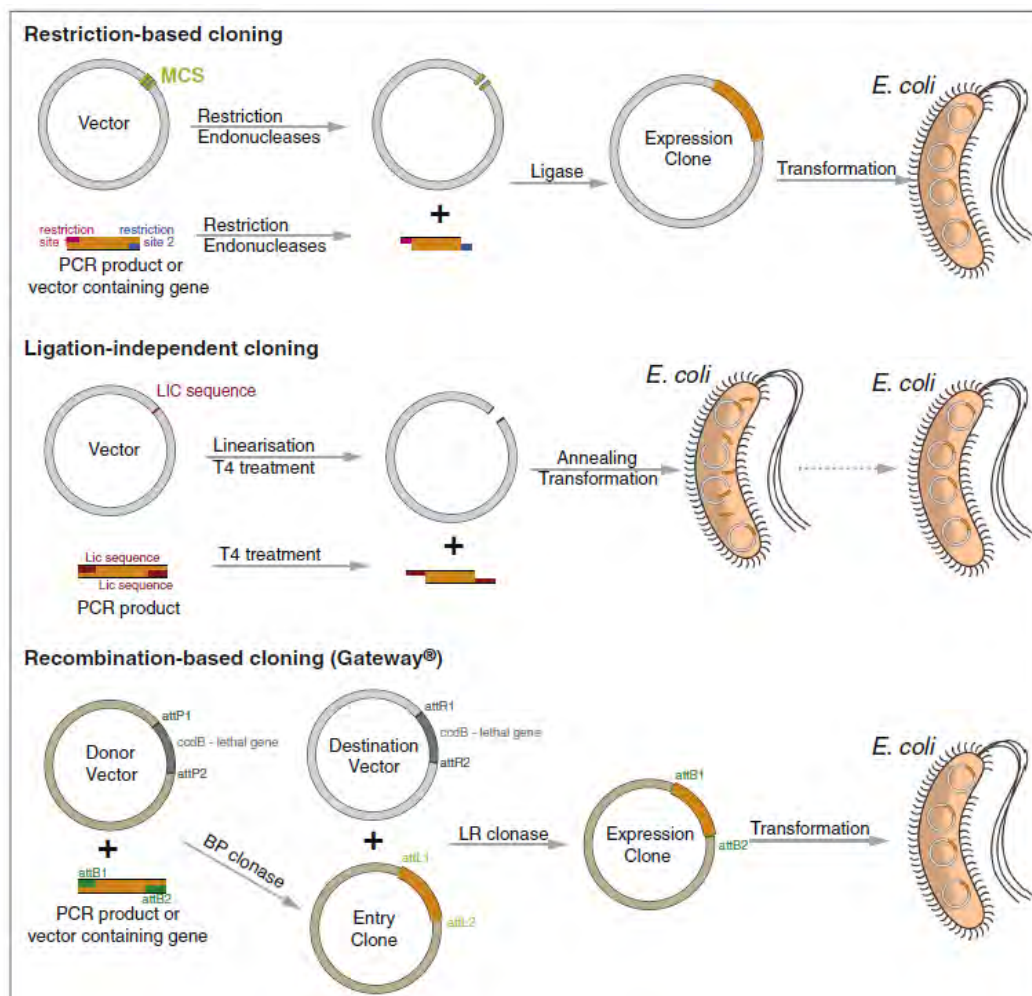
για την ευκολότερη απομόνωση της πρωτεΐνης. Για το λόγο πρέπει να γίνεται προσεκτικά η επιλογή του φορέα ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Τα βασικά χαρακτηριστικά ενός φορέα συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα. (German L. Rosano and Eduardo A. Ceccarelli, 2014).



Εικόνα 10 Βασικά χαρακτηριστικά ενός φορέα κλωνοποίησης (Τροποποιήθηκε από (German L. Rosano and Eduardo A. Ceccarelli, 2014)

1.3.4 Τύποι μοριακής κλωνοποίησης

Ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι μοριακής κλωνοποίησης (εικόνα 11). Ο πρώτος τύπος κάνει χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών για την πέψη τόσο του φορέα όσο και του ενθέματος DNA και κατόπιν γίνεται σύνδεση με τη βοήθεια DNA λιγάσης. Στο δεύτερο τύπο δεν γίνεται χρήση λιγάσης. Η δημιουργία ομόλογων άκρων γίνεται με τη χρήση εξωνουκλεάσης ή πολυμεράσης T4 και κατόπιν το ένθεμα και ο φορέας ενώνονται εντός του βακτηρίου μετά τον μετασχηματισμό του, με τη βοήθεια ενζύμων που εμπεριέχονται σε αυτό. Τέλος, ο τρίτος τύπος κλωνοποίησης βασίζεται στη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού. (Patrick HN Celie et al., 2016). Από τις παραπάνω τεχνικές, στην παρούσα εργασία έγινε χρήση της μεθόδου με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και της μεθόδου ομόλογου ανασυνδυασμού.



Εικόνα 11 Σχηματική απεικόνιση των βασικών τύπων κλωνοποίησης (Patrick HN Celie et al., 2016)

1.3.4.1 Κλωνοποίηση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές του DNA και το κόβουν (στις θέσεις αυτές ή πιο μακριά). Μετά την πέψη αυτή δημιουργείται ένα αμβλύ άκρο (απλή δίκλωνη εντομή) ή κολλώδη (συμπληρωματικά) άκρα. Η δημιουργία συμπληρωματικών άκρων είναι χρήσιμη στην κλωνοποίηση, διότι επιτρέπει τη σύνδεση αλληλουχιών που διαθέτουν τέτοια άκρα. Συχνά γίνεται πέψη με διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα ώστε να προκύψουν αλληλουχίες με άκρα που δεν είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους. Έτσι αποφεύγεται η συγκόλλησή ή η επανακυκλοποίηση τους. Για να πραγματοποιηθεί η διπλή πέψη είναι απαραίτητο να επιλεγθούν τα κατάλληλα ένζυμα που κόβουν μια φορά τόσο τους φορείς όσο και τα ενθέματα. (T.A. Brown, 2007)

Στη συνέχεια η σύνδεση φορέα και ενθέματος γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάση. Η πιο διαδεδομένη DNA λιγάση προέρχεται από κύτταρα *E. Coli* μολυσμένα με βακτηριοφάγο T4. Ο ρόλος της συνίσταται στη σύνθεση φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ μη συνδεδεμένων νουκλεοτιδίων που βρίσκονται σε ένα πολυνουκλεοτίδιο ενός δίκλωνου μορίου. Προκειμένου να συνδεθούν δύο κλάσματα περιορισμού, η λιγάση πρέπει να συνθέσει δύο φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, έναν σε κάθε κλώνο. Η αντίδραση μπορεί να συμβεί μόνο εάν τα άκρα που πρόκειται να συνδεθούν έλθουν κοντά το ένα με το άλλο κατά τύχη, διότι η λιγάση δεν μπορεί να τα συλλάβει και να τα φέρει κοντά. . (T.A. Brown, (2007)

1.3.4.2 Κλωνοποίηση με ομόλογο ανασυνδυασμό (*in-fusion*)

Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία, η διαδικασία επίδεσης του τμήματος του ενθέματος με τον γραμμικοποιημένο φορέα βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό και όχι με αντίδραση λιγάσης. Η αντίδραση καταλύεται από μία ρεκομπινάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση τα κοινά άκρα που έχουν ο φορέας και το ένθεμα. Στην παρούσα πειραματική εργασία έγινε χρήση της μεθόδου In-Fusion και του πρωτοκόλλου της εταιρείας Clontech που περιγράφεται στην μεθοδολογία.

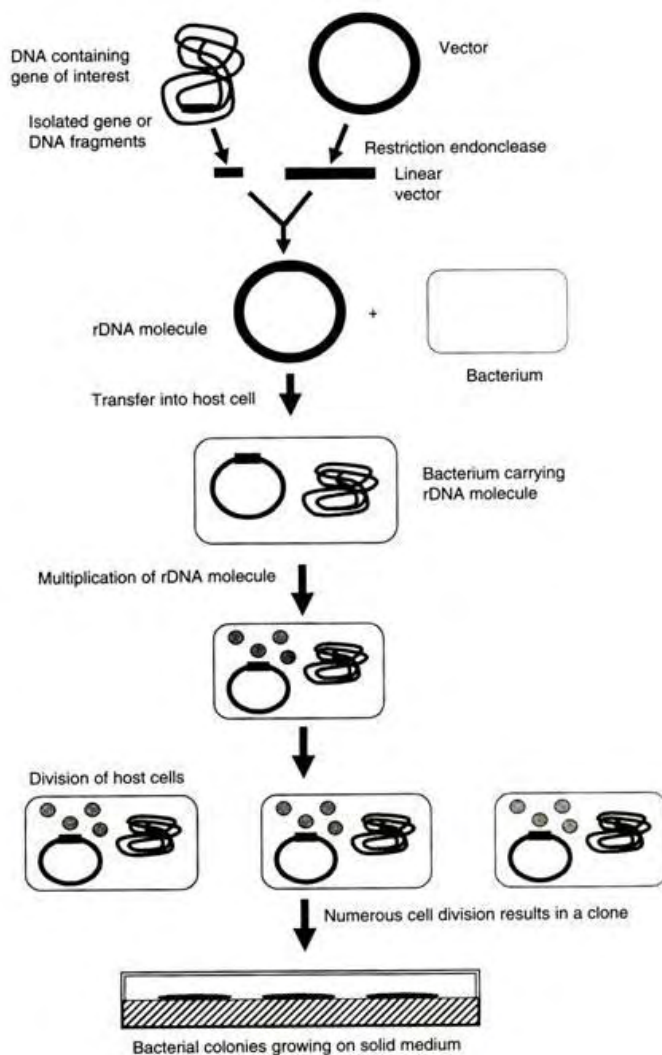
Κλωνοποίηση του DNA

Η κλωνοποίηση του DNA επινοήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 70 και επέφερε την επανάσταση στο χώρο της μοριακής βιολογίας. Τα στάδια της διαδικασίας αυτής είναι (κατά κύριο λόγο) και παρουσιάζονται και στην εικόνα 13:

- **Η κατασκευή του ανασυνδυασμένου DNA.** Για το σκοπό αυτό 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 κοπεί κατά προτίμηση με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Ο φορέας κλωνοποίησης είναι ένα μόριο DNA, π.χ. πλασμίδιο, κοσμίδιο, βακτηριακό τεχνητό χρωμόσωμα (BAC), τεχνητό χρωμόσωμα ζύμης (YAC) ή DNA φάγων, το οποίο μπορεί να αυτοδιπλασιάζεται ανεξάρτητα μέσα σε ένα κύτταρο-ξενιστή όπως ένα βακτήριο. Η ένωση φορέα και ενθέματος γίνεται αν τα δύο μόρια αναμειχθούν

μεταξύ τους και προστεθεί σε αυτά το ένζυμο DNA λιγάση. Το DNA που δημιουργείται είναι ανασυνδυασμένο.

- **Η μεταφορά του ανασυνδυασμένου μορίου DNA σε ένα κύτταρο-ξενιστή.** Η εισαγωγή του DNA σε βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή ονομάζεται μετασχηματισμός. Ως ξενιστές επιλέγονται συνήθως βακτήρια που δεν διαθέτουν πλασμίδια και άρα είναι ευαίσθητα στην παρουσία αντιβιοτικών. Για να εισέλθει ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μέσα στο βακτήριο, τα τοιχώματα του βακτηρίου γίνονται παροδικά διαπερατά σε μακρομόρια, μετά από κατάλληλη κατεργασία. Τα κύτταρα αυτά ονομάζονται δεκτικά.
- **Η επιλογή και απομόνωση των κυττάρων-ξενιστών.** Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα-ξενιστές που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο DNA επιλέγονται από εκείνα που δεν το έχουν προσλάβει. Η διάκριση αυτή μπορεί να γίνει εύκολα στην περίπτωση που το πλασμίδιο διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό. Τα κύτταρα που δεν έχουν μετασχηματισθεί δεν θα επιβιώσουν παρουσία αντιβιοτικού. Κάθε βακτήριο που προσλαμβάνει ένα μόνο μόριο ανασυνδυασμένου DNA πολλαπλασιάζεται και παράγει μια αποικία που αποτελεί ένα βακτηριακό κλώνο. Με την παραπάνω διαδικασία παράγονται χιλιάδες κλώνοι, που ο καθένας περιέχει ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA διαφορετικό από τους υπόλοιπους κλώνους. Το σύνολο των βακτηριακών κλώνων περιέχει το συνολικό DNA του οργανισμού δότη και αποτελεί μία γονιδιωματική βιβλιοθήκη. (T.A. Brown, (2007)



Εικόνα 12 Στάδια κλωνοποίησης(Biology Discussion.com)

Είναι δυνατός ο εντοπισμός και η απομόνωση ενός μόνο κλώνου από τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη, ο οποίος περιέχει το τμήμα του γονιδιώματος που θα θέλαμε να μελετήσουμε. Η επιλογή αυτή μπορεί να γίνει με τη βοήθεια μορίων-ανιχνευτών (DNA ή RNA) που είναι ιχνηθετημένα και που υβριδοποιούνται μόνο με το επιθυμητό τμήμα DNA. Στη συνέχεια είναι δυνατός ο πολλαπλασιασμός σε μεγάλη κλίμακα του κλώνου που περιέχει το επιθυμητό γονίδιο ώστε να προκύψουν μεγάλες ποσότητες DNA, κάτι που θα επιτρέψει την περαιτέρω μελέτη και επεξεργασία του. (T.A. Brown, (2007) Genomes 3).

1.4 *In silico* μελέτες πρωτεϊνικής ανάλυσης

In silico είναι μία φράση που αναφέρεται σε ό,τι πραγματοποιείται με τη βοήθεια υπολογιστή ή μέσω προσομοίωσης σε υπολογιστή. Η τεχνολογία αυτή έχει συμβάλει

στη μελέτη υπάρχουσών δομών βιομορίων, στη σύγκρισή τους καθώς και στη δημιουργία τρισδιάστατων μοντέλων (πρόβλεψη δομής) για βιομόρια για τα οποία είναι γνωστή μόνο η αλληλουχία του DNA. Τέλος ορισμένα προγράμματα είναι ικανά να προβλέψουν τη λειτουργία των βιομορίων αυτών στηριζόμενα στη σύγκρισή τους με υπάρχοντα μοντέλα.

1.4.1 Στοιχίση αλληλουχιών (Sequence alignment)

Η στοιχίση αλληλουχιών αποσκοπεί στον προσδιορισμό περιοχών ομοιότητας μεταξύ βιομορίων (νουκλεοτιδίων ή πρωτεϊνών). Κάτι τέτοιο υποδηλώνει την ύπαρξη δομικής, λειτουργικής ή εξελικτικής συγγένειας μεταξύ των βιομορίων αυτών. Η στοιχίση μπορεί να γίνεται κατά ζεύγη (pairwise alignment) ή να είναι πολλαπλή (multiple alignment) δηλαδή να γίνεται η στοιχίση παραπάνω των δύο αλληλουχιών. Υπάρχει διαθέσιμη μια ποικιλία προγραμμάτων που πραγματοποιούν είτε απλές στοιχίσεις, είτε πιο εξειδικευμένες. Τα αποτελέσματα των στοιχίσεων μπορούν να αναλυθούν στη συνέχεια με τη βοήθεια άλλων προγραμμάτων.

Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση των προγραμμάτων *BioEdit* και *LAlign* (ExPASy.org). Το *BioEdit* είναι ένα πρόγραμμα στοιχίσης αλληλουχιών που ταυτόχρονα επιτρέπει την εύκολη επεξεργασία τους. Την ίδια λειτουργία έχει και το *LAlign* αλλά με λιγότερες δυνατότητες.

Ένα άλλο πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το *Dali Lite structural alignment tool* που επιτρέπει τη σύγκριση δύο πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Η σύγκριση αυτή γίνεται σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας αλλά και δευτεροταγούς δομής. Το εργαλείο αυτό επιτρέπει τη λεγόμενη δομική στοιχίση και δίνει σαν αποτέλεσμα την πιθανή δευτεροταγή δομή των πολυπεπτιδίων. (Holm L, Rosenström, 2010)

Το threading είναι η μοντελοποίηση πρωτεϊνών με βάση τη δευτεροταγή δομή τους η οποία συγκρίνεται με γνωστά δομικά μοτίβα. Το πρόγραμμα DOMAINATION, που χρησιμοποιήθηκε κι εδώ είναι ένα χαρακτηριστικό πρόγραμμα που πραγματοποιεί threading. Το πρόγραμμα DOMAINATION εξειδικεύεται στον εντοπισμό επικρατειών χρησιμοποιώντας το PSI-BLAST του NCBI. Το PSI-BLAST αποτελεί μια δυνατότητα του αλγόριθμου BLAST που

επιτρέπει τη στοίχιση επικρατειών πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Η αναζήτηση επαναλαμβάνεται μέχρι να παρουσιαστούν όλες οι πιθανές επικράτειες μιας πρωτεΐνης. (Richard A. George and Jaap Heringa, 2002)

Η μοντελοποίηση ομολογίας αναφέρεται στην κατασκευή τρισδιάστατων μοντέλων μιας πρωτεΐνης για την οποία είναι γνωστή η αμινοξική ακολουθία. Το πρόγραμμα *I-TASSER* παρουσιάζει την προτεινόμενη δομή και λειτουργία της αμινοξικής αλληλουχίας που καταχωρούμε και τη συγκρίνει με άλλες υπάρχουσες. (*J Yang et al.*2015)

2. Αντικείμενο της πτυχιακής εργασίας

Η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) είναι η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που ανακαλύφθηκε και για δεκαετίες αποτελεί αντικείμενο επιστημονικής έρευνας λόγω της σπουδαιότητας του ρόλου της στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Τα τελευταία χρόνια, έχει αναδειχθεί από πλήθος μελετών ως μοριακός φαρμακολογικός στόχος για την αντιμετώπιση διαταραχών του μεταβολισμού των υδατανθράκων αλλά και τον καρκίνο. Εντούτοις, η πολυπλοκότητα της δομής της αποτέλεσε τροχοπέδη σε δομικές κυρίως μελέτες με αποτέλεσμα οι μέχρι σήμερα γνώσεις μας σχετικά με τους μηχανισμούς ρύθμισης του ενζύμου να είναι ελλιπείς. Προς την κατεύθυνση αυτή, επιλύθηκε η δομή, εφαρμόζοντας κρυσταλλογραφία ακτίνων- X, της κολοβομένης ενεργής καταλυτικής υπομονάδας της (PhK_{γtrnc}) από μυϊκό ιστό κουνελιού σε σύμπλοκο με πεπτιδικό υπόστρωμα σε ευκρίνεια 2.6 Å που σε συνδυασμό με μελέτες μεταλλαξιγένεσης και κινητικές μελέτες οδήγησε στη διατύπωση του ενζυμικού μηχανισμού της PhK. Μελέτες κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας είχαν σαν αποτέλεσμα την επίλυση δομής του ολοενζύμου (μυϊκή ισομορφή από κουνέλι) σε ευκρίνεια 9.9 Å, καθώς και της δομής του συμπλόκου PhK-GPb σε ευκρίνεια 18 Å. Εντούτοις, η ανθρώπινη μυϊκή ισομορφή της δεν έχει μέχρι σήμερα μελετηθεί. Για το σκοπό αυτό η παρούσα πτυχιακή εργασία στοχεύει στην έκφραση της γ καταλυτικής υπομονάδας της ανθρώπινης μυϊκής ισομορφής PhK (hPhK_γ). Αναλυτικότερα, αντικείμενο της πτυχιακής εργασίας είναι:

- *In silico* μελέτες για την αναγνώριση της επικράτειας κινάσης (kinase domain) της hPhK_γ
- Σχεδιασμός εκκινητών για την ενίσχυση των γονιδίων της hPhK_γ και της κολοβομένης μορφής της hPhK_{γtrnc} όπως θα αναγνωρισθεί από τις *in silico* μελέτες, ώστε να πραγματοποιηθεί εισαγωγή τους σε φορείς pGEX και pET κατάλληλους για έκφραση γονιδίων σε *E.coli*.

Οι φορείς έκφρασης θα αξιοποιηθούν ως εργαλεία για την παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων πρωτεΐνης κατάλληλης για βιοχημικές και δομικές μελέτες συμβάλλοντας έτσι στην διερεύνηση της ανθρώπινης μυϊκής PhK ως μοριακού στόχου, πιθανού φαρμακολογικού ενδιαφέροντος, για την αντιμετώπιση ασθενειών σχετιζόμενων με διαταραχές του μεταβολισμού των υδατανθράκων.

3. Οργανολογία

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Πρωτεΐνες: Το kit που χρησιμοποιήθηκε στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ήταν προϊόν της Kara Biosystems. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν για τις πέψεις των φορέων και των ενθεμάτων (BamHI^{HF}, HindIII^{HF}, XhoI) ήταν της εταιρείας New England Biolabs (NEB). Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI προήλθε από την εταιρεία Takara. Η λιγάση που χρησιμοποιήθηκε για τη σύζευξη φορέα και ενθέματος (T4 DNA ligase) ήταν της εταιρείας Takara. Το kit για την σύνδεση φορέα και ενθέματος (DNA) ήταν της εταιρείας Clonetech.

Άλλα υλικά και αντιδραστήρια: Τα θρεπτικά υλικά LB Agar και LB Broth ανήκαν στις εταιρείες Serva και Applichem αντίστοιχα. Η αгарόζη που χρησιμοποιήθηκε στις ηλεκτροφορήσεις DNA ήταν της εταιρείας Sigma. Το Midori green για την χρώση του DNA στα πηκτώματα αгарόζης προήλθε από την εταιρεία Nippon Genetics. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (1kb plus DNA Ladder) ήταν της εταιρείας Thermo Scientific. Για την παρασκευή του διαλύματος TAE 50x χρησιμοποιήθηκε Tris ultrapure της Applichem, EDTA της Panreac και οξικό οξύ της SDS. Για την απομόνωση των πλασμιδίων και για την εξαγωγή του DNA από πηκτώματα αгарόζης χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα kit της εταιρείας Macherey-Nagel. Από την εταιρεία Sigma- Aldrich προήλθαν τα αντιδραστήρια: απόλυτη αιθανόλη, χλωραμφαινικόλη, υπερθειικό αμμώνιο (APS). Από την εταιρεία Panreac: Coomassie R250, EDTA, γλυκερόλη, Χλωριούχο Νάτριο (NaCl), Tris Base. Από την εταιρεία Nippon Genetics: Pink Prestained Protein Marker. Από την GE healthcare το πλασμίδιο pGEX-6p-1. Από την Bio rad: acrylamide mix 30%. Από την Applichem: Tris ultra pure, Καναμυκίνη, TEMED. Από την Serva: Sodium dodecyl Sulfate (SDS), Αμπικιλίνη, N,N'-Methylenebisacrylamide, Na-Sulfate, IPTG. Από την εταιρεία Merck: Υδροχλωρικό οξύ (HCl).

Γονίδια. Ως εκμαγείο για την ενίσχυση των γονιδίων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες hPhKγ και hPhKγtrc χρησιμοποιήθηκε το cDNA PhKG1 που προήλθε από συλλογή

κλώνων της Invitrogen (IOH82146). Η νουκλεοτιδική αλληλουχία επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα.

3.1.2 Βακτηριακά στελέχη

Χρησιμοποιήθηκε ποικιλία στελεχών του βακτηρίου *E. coli* τόσο για την κλωνοποίηση και υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, όσο και για την υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Στελέχη για την κλωνοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

- X11-Blue (Agilent Technologies)
- DH5alpha (Thermo Scientific)

Και τα δύο αυτά στελέχη είναι γενετικά τροποποιημένα με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπουν τον εύκολο μετασχηματισμό και αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Το στέλεχος DH5alpha έχει τροποποιηθεί με τέτοιο τρόπο (μετάλλαξη endA1) ώστε μια συγκεκριμένη ενδοκυτταρική ενδονουκλεάση που φυσιολογικά αποικοδομεί τα πλασμίδια να παραμένει ανενεργή κι έτσι να λαμβάνονται υψηλής καθαρότητας πλασμίδια κατά την απομόνωση πλασμιδίων σε μικρή κλίμακα (mini prep)

Στελέχη για την υπερέκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

- BL21- Gold (DE3) (Agilent technologies)
- B834 (DE3) (Novagen)
- B834 pLysS (Novagen)
- Origami (Novagen)

Τα συγκεκριμένα στελέχη της *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Ιδανικά για το σκοπό αυτό τα καθιστούν η απουσία των Lon και OmpT πρωτεασών. Επιπλέον, επιτρέπουν την έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών καθώς περιέχουν επιπλέον κωδικόνια τα οποία σπανίως χρησιμοποιούνται από την *E.coli*. Το στέλεχος Origami διαθέτει μεταλλάξεις στα γονίδια της αναγωγής της γλουταθειόνης και της αναγωγής της θειορεδοξίνης, κάτι που ενισχύει σε μεγάλο βαθμό το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών στο

κυτταρόπλασμα. Το στέλεχος B834 pLysS είναι όμοιο με το B834 αλλά διαθέτει ένα επιπλέον πλασμίδιο (το pLysS) που επιτρέπει τον καλύτερο έλεγχο της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Περιέχει ακόμη γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη (Cam). (Novagen)

3.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς

Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλινα μόρια DNA, που συνυπάρχουν με το κύριο χρωμόσωμα σε ένα βακτηριακό κύτταρο, ενώ αντιγράφονται ανεξάρτητα από αυτό. Φέρουν γονίδια, που συνήθως δεν υπάρχουν στο κύριο χρωμόσωμα, αν και συχνά τα γονίδια αυτά δεν είναι απαραίτητα για την επιβίωση του βακτηρίου. Δίνουν όμως επιπλέον ικανότητες στο βακτήριο καθώς κωδικοποιούν ιδιαίτερα στοιχεία του, όπως η αντοχή σε αντιβιοτικά, κάτι το οποίο δεν είναι απαραίτητο σε ένα βακτήριο υπό ευνοϊκές συνθήκες. Πολλά πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρονται από το ένα βακτήριο στο άλλο, ενώ συχνά, τα ίδια πλασμίδια βρίσκονται σε βακτήρια διαφορετικών ειδών. (T.A. Brown, 2007)

Ένα πλασμίδιο μπορεί να χρησιμεύσει ως φορέας κλωνοποίησης παρέχοντας την αντιγραφική ικανότητα που επιτρέπει στο κλωνοποιημένο γονίδιο να πολλαπλασιαστεί μέσα στο κύτταρο ξενιστή. Κάθε πλασμιδιακός φορέας διαθέτει μια περιοχή έναρξης της αντιγραφής (origin of replication), την οποία αναγνωρίζουν οι DNA πολυμεράσες καθώς και άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον αντιγραφικό μηχανισμό του κύριου χρωμοσώματος. Συνεπώς ένα πλασμίδιο αντιγράφεται και πολλαπλασιάζεται μαζί με οποιοδήποτε γονίδιο έχει ενσωματωθεί σε αυτό με τη συνδρομή ενζύμων του κυττάρου ξενιστή. (T.A. Brown, 2007)

Ένα άλλο χαρακτηριστικό ενός πλασμιδιακού φορέα είναι η παρουσία ενός γονιδίου ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Η παρουσία του γονιδίου αυτού καθιστά εφικτό το διαχωρισμό των κυττάρων-ξενιστών που προσέλαβαν το πλασμίδιο από αυτά που δεν το προσέλαβαν. Το γονίδιο που μας ενδιαφέρει μπορεί να ενσωματωθεί σε συγκεκριμένη περιοχή του πλασμιδίου. Η περιοχή αυτή ονομάζεται πολυσυνδέτης (multiple cloning site, MCS) και διαθέτει πολλές θέσεις αναγνώρισης και πέψης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες κάτι που καθιστά εύκολη την εισαγωγή DNA τμήματος που έχει υποστεί πέψη με περιοριστικά ένζυμα. (T.A. Brown, 2007)

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα πειράματα ήταν οι pETM-11 και pGEX-6p-1.

- pETM-11: Στον φορέα αυτό έγινε ένθεση ολόκληρου του γονιδίου της hPhKγ. Ο pETM-11 έχει μήκος 6029bp και διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Καναμυκίνη (Kan). Το σύστημα pET (αναφορά) έχει σχεδιαστεί για την κλωνοποίηση και έκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων σε κύτταρα του στελέχους *E.coli*, με αποτέλεσμα, όταν ενεργοποιηθεί, να είναι δυνατή η γρήγορη παραγωγή μεγάλης ποσότητας οποιασδήποτε επιθυμητής πρωτεΐνης. Ο pETM-11 διαθέτει έναν προαγωγέα, τον T7 promoter του φάγου T7, έναν από τους ισχυρότερους προαγωγείς που καθιστούν το σύστημα pET ένα από τα ισχυρότερα για την παραγωγή και έκφραση πρωτεϊνών. Ανοδικά της περιοχής του πολυσυνδέτη βρίσκεται το τμήμα εκείνο που κωδικοποιεί την ουρά ιστιδινών, δηλαδή μια αλληλουχία που οδηγεί στην παραγωγή έξι διαδοχικών καταλοίπων ιστιδίνης (His-tag). Λόγω της παρουσίας αυτής της διακριτής ουράς στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης προς μελέτη καθίσταται εύκολος ο καθαρισμός μέσω χρωματογραφίας αγκιστείας όπου στη ρητίνη βρίσκονται ακινητοποιημένα ιόντα Ni^{2+} . Ο pETM-11 περιέχει αλληλουχία αναγνώρισης από την πρωτεάση του Tobacco Etch Virus (TEV), με σκοπό την απομάκρυνση της ουράς ιστιδινών από την πρωτεΐνη προς μελέτη. (Dümmeler A. *Et al.*, 2002)
- pGEX-6p-1: : Στον φορέα αυτό έγινε ένθεση ολόκληρου του γονιδίου της hPhKγ καθώς και του hPhKγtrc. Ο pGEX-6p-1 έχει μήκος 4984bp και διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Αμικικιλίνη (Amp). Οι φορείς pGEX είναι εφοδιασμένοι με τον κατάλληλο επίτοπο ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να εκφράζεται συγχωνευμένη με την τρानσφεράση 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 προς μελέτη με τη χρήση της πρωτεάσης PreScission Protease που κόβει μεταξύ της GST και του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου. Ο φορέας περιέχει έναν προαγωγέα tac ώστε να είναι δυνατή η χημική επαγωγή με

μεγάλη απόδοση της έκφρασης και παραγωγή της πρωτεΐνης προς μελέτη.
(GE Healthcare)

3.2 Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν κατά κύριο λόγο διαθέσιμα στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας καθώς επίσης και στους κοινόχρηστους χώρους του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας. Οι αυτόματες πιπέτες ανήκαν στις εταιρείες Gilson και Nichiryo. Οι συσκευές ηλεκτροφόρησης ήταν της εταιρείας Bio Rad. Η φυγόκεντρος ήταν η eppendorf centrifuge 5810R και το φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους UV 1600-PC της VWR. Η συσκευή της PCR ήταν της εταιρείας eppendorf. Η συσκευή απεικόνισης πηκτωμάτων ανήκε στην εταιρεία Protein Simple Cambridge. Το pHμετρο ήταν της εταιρείας Metrohm.

4. Μεθοδολογία

4.1 *In silico* μελέτες

4.1.1 Στοίχιση (Alignment)

Με τη βοήθεια των προγραμμάτων BioEdit και LAlign (ExPASy.org) στοιχίζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης με την πρωτότυπη αλληλουχία της hPHKγ που δίνεται από το pubmed και διαπιστώθηκε ότι όντως ταυτίζονται.

Έγινε στοίχιση του kinase domain του κουνελιού με το γονίδιο της ανθρώπινης PHKγ ώστε να εντοπιστεί το τμήμα με δράση κινάσης στο ανθρώπινο γονίδιο. Τέλος έγινε στοίχιση των αλληλουχιών της ανθρώπινης μυϊκής (phkg1) και της ανθρώπινης ηπατικής κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (phkg2) για να υπολογιστεί η ομοιότητά τους.

4.1.2 Δομική Στοίχιση (Structural Alignment)

Με το πρόγραμμα *Dali Lite structural alignment tool* έγινε στοίχιση των δευτεροταγών δομών των πρωτεϊνών hPHKγ και rPHKγ (rabbit) και διαπιστώθηκε ότι οι δομές είναι σχεδόν πανομοιότυπες. Η σύγκριση αυτή γίνεται σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας αλλά και δευτεροταγούς δομής

4.1.3 Πρόβλεψη Επικρατειών (Domain Prediction)

Για την αναγνώριση της επικράτειας κινάσης της PhKγ έγινε πρόβλεψη επικρατειών με το πρόγραμμα DOMAINATION χρησιμοποιώντας την αλληλουχία της hPhKγ.

4.1.4 Μοντελοποίηση Ομολογίας (Homology Modeling)

Στο πρόγραμμα I-TASSER που εξειδικεύεται σε μοντελοποίηση ομολογίας εισάγαμε τα πρώτα 300 αμινοξέα της hPhKγtrc.

4.2 Τεχνικές Κλωνοποίησης

Για την εισαγωγή ενθεμάτων DNA στους φορείς έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές. Η πρώτη τεχνική βασίζεται στην πέψη φορέα και ενθέματος με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και στη συνέχεια την «συγκόλλησή» τους με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάση. Η δεύτερη τεχνική στηρίζεται στη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού, δηλαδή στη σύνδεση φορέα και ενθέματος χωρίς τη χρήση λιγάσης αλλά με τη βοήθεια του κατοχυρωμένου από την εταιρεία Clontech ενζύμου in-fusion. Και για τις δύο μεθόδους απαιτείτο η δημιουργία των κατάλληλων εκκινητών.

4.2.1 1^η μέθοδος (Με χρήση DNA λιγάσης)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ένθεση ολόκληρου του γονιδίου της hPhKγ αλλά και του κολοβωμένου τμήματός της σε φορείς έκφρασης.

Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός εκκινητών αποσκοπεί στη σωστή ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου ή τμήματός του με τη χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Το προϊόν που προκύπτει είναι εξειδικευμένο και με γνωστά άκρα. Είναι το πρώτο και σημαντικότερο βήμα, που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την επιτυχία ή μη των μετέπειτα βημάτων του πειράματός μας και για αυτό απαιτείται μεγάλη προσοχή στη λεπτομέρεια κατά την κατασκευή τους.

Κατά το σχεδιασμό εκκινητών δίνεται προσοχή στα εξής:

- ✓ Αλληλουχία εκκινητών: Ο εκκινητής πρέπει να έχει εξειδίκευση και ευαισθησία και ειδικά στο 3' άκρο του, κάτι που αυξάνει την ευαισθησία και την 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.

Τα ζεύγη των εκκινητών πρέπει να μην είναι συμπληρωματικά στο 3' άκρο, κάτι που θα είχε σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό διμερών.

- ✓ Το μήκος του εκκινητή: 18-30 βάσεις. Μικρότερο μήκος θα οδηγήσει στην ενίσχυση μη επιθυμητών περιοχών κατά την PCR.
- ✓ Θερμοκρασία τήξης (T_m): Η ιδανική θερμοκρασία τήξης ξεπερνά τους 60°C και πρέπει να είναι παρόμοια και στους δύο εκκινητές (διαφορά περίπου 5°C).
Υπολογισμός T_m : $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (A+T) + 4^{\circ}\text{C} \times (G+C)$. Όμως για τα πειράματα οι θερμοκρασίες τήξης υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του T_m Calculator από το site της NEB (neb.com) καθώς και του oligo-calc (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc) που χρησιμοποιούν διαφορετικούς αλγορίθμους.
- ✓ Η περιεκτικότητα σε G και C πρέπει να είναι μεταξύ 40-60%
- Σχεδιασμός εκκινητή 5' άκρου: (συνδέεται με το 5' άκρο του γονιδίου που μας ενδιαφέρει). Πρέπει να διαθέτει:
 - ✓ Περιοχή αναγνώρισης από περιοριστική ενδονουκλεάση. Η περιοχή αυτή θα ταυτίζεται με την περιοχή αναγνώρισης που διαθέτει ο φορέας στον οποίο θα εισάγουμε το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.
 - ✓ Μια προέκταση προς την 5' περιοχή που αυξάνει την αποτελεσματικότητα της περιοριστικής ενδονουκλεάσης (2-10 βάσεις).
 - ✓ Περιοχή επικάλυψης με το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Η περιοχή αυτή πρέπει να δίνει T_m 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 που μας ενδιαφέρει (2-3 αλληλουχίες)

- ✓ Περιοχή επικάλυψης με την αλληλουχία που είναι συμπληρωματική του 3' άκρου του γονιδίου μας. ($T_m \geq 60^\circ\text{C}$)
- ✓ Μια προέκταση προς την 5' περιοχή (ομοίως με 5' άκρο)

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα έγινε σχεδιασμός εκκινητών για την εισαγωγή του γονιδίου PHKG1 αλλά και του κολοβομένου τμήματος, σε φορείς έκφρασης (pETM-11 και pGEX-6p-1 αντίστοιχα). Ο εκκινητής για το 5' άκρο (Forward Primer) διαθέτει περιοχή αναγνώρισης από την περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI^{HF}, ο εκκινητής για το 3' άκρο (Reverse Primer), για ολόκληρο το γονίδιο, διαθέτει θέση αναγνώρισης από την HindIII^{HF} και ο αντίστοιχος για το κολοβομένο τμήμα διαθέτει θέση αναγνώρισης από την XhoI.

Εκκινητές για ολόκληρο το γονίδιο (προς ένθεση στον pETM-11):

Forward Primer

5'-CACGGATCCACCCGGGACGAGGCACT-3'

(71% GC content / $T_m=63^\circ\text{C}$)

Reverse Primer

5'-CCAAGCTTCTATCAGTAGTCCTCCTCGGCCAGG-3'

(71% GC content / $T_m=63^\circ\text{C}$)

Εκκινητές για κολοβομένο τμήμα (προς ένθεση στον pGEX-6p-1):

Forward Primer

5'-CACGGATCCACCCGGGACGAGGCACT-3'

(71% GC content / $T_m=63^\circ\text{C}$)

Reverse Primer

5'-CCCTCGAGCTATCACCGCACTTCCTCCACCAAGTA-3'

(52% GC content / $T_m=63^\circ\text{C}$)

Οι εκκινητές ελέγχθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος OligoCalc (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc) για δημιουργία τυχόν διμερών ή

διαμορφώσεων φουρκέτας. Οι θερμοκρασίες τήξης υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του Tm Calculator από το site της NEB.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η PCR οδηγεί στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή μιας επιλεγμένης περιοχής ενός μορίου DNA. Η αντίδραση διεξάγεται *in vitro*. Η αντιγραφή γίνεται από την θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση του *T. Aquaticus*. Γίνεται ανάμειξη του DNA στόχου με Taq DNA πολυμεράση, ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών και νουκλεοτίδια. Η αντίδραση PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και γι αυτό μπορεί να λειτουργήσει ακόμα και με πολύ μικρή ποσότητα DNA. Οι εκκινητές προσδένονται στο DNA- στόχο και στις δύο πλευρές του τμήματος προς αντιγραφή. Άρα οι αλληλουχίες αυτών των θέσεων πρόσδεσης πρέπει να είναι γνωστές.

Η αντίδραση ξεκινά με θέρμανση του μείγματος προς αποδιάταξη των αλληλουχιών DNA (94-98°C). Γίνεται διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τη διπλή έλικα και σχηματισμός μονόκλωνων αλυσίδων. Στη συνέχεια έχουμε μείωση της θερμοκρασίας στην θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (Tm) ώστε να προσδεθούν οι εκκινητές στο DNA. Τέλος γίνεται αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C που είναι η θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης η οποία ξεκινά την αντιγραφή του DNA. Η αντίδραση επαναλαμβάνεται για κατάλληλο αριθμό κύκλων (συνήθως 30) και η ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά. (Kary Mullis, 1983).

Το γονίδιο της hPhKγ ενισχύεται με τους παραπάνω εκκινητές. Τα προϊόντα που προκύπτουν διαθέτουν άκρα κοπής από τις αντίστοιχες περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Πρωτόκολλο PCR (Τελικός όγκος 50μL)

Πίνακας 2 Όγκοι και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

	Όγκος (μL)	Συγκέντρωση
Water for Injection	37.8	
10x Kapa Taq Buffer A	5	1x
10mM dNTP Mix	1	0.2mM το καθένα

10μM Forward Primer	2	0,4μM
10μM Reverse Primer	2	0.4μM
DNA Template	2	0,2 ng/μL
Kapa Taq DNA Polymerase	0.2	1U

Πίνακας 3 Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Συνθήκες	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Initial Denaturation	95oC	3min	1
Denaturation	95 oC	10sec	30
Annealing	63 oC	20sec	
Extension	72 oC	70sec	
Final Extension	72 oC	70sec	1
Hold	4 oC	-	-

Τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Παράρτημα) και πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση.

Εξαγωγή και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

Χρησιμοποιήθηκε το kit της εταιρείας Macherey-nagel. Ακολουθείται το πρωτόκολλο που διατίθεται από την εταιρεία. Από το kit παρέχονται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- NTI: διάλυμα για διαλυτοποίηση του πηκτώματος
- NT3: διάλυμα για έκπλυση της στήλης (είχε προστεθεί EtOH 100%)
- NE: διάλυμα για έκλουση DNA (5 mM Tris/HCl, pH 8.5)

1. Εξαγωγή DNA/ Διαλυτοποίηση πηκτώματος

Από το πήκτωμα αφαιρούνται με προσοχή τα τμήματα που περιέχουν το DNA με αποστειρωμένο νυστέρι. Η εξαγωγή γίνεται άμεσα ώστε το δείγμα να μην εκτίθεται στην υπεριώδη ακτινοβολία για πολύ ώρα. Για κάθε 100mg πηκτώματος

προστίθενται 200μL διαλύματος NTI και γίνεται επώαση στους 50°C για 10min με ανάδευση ανά 2-3 min. Το αντιδραστήριο αυτό περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις χαοτροπικών αλάτων (κυρίως GuHCl και GuSCN) που αποδιατάσσουν πρωτεΐνες (όπως νουκλεάσες) και διαταράσσουν τη σύνδεση των νουκλεϊκών οξέων με το νερό ώστε να γίνει πιο εύκολα η πρόσδεσή τους στη στήλη σιλικόνης.

2. Δέσμευση DNA

Μια στήλη Nucleospin Gel and PCR cleanup Column[®] τοποθετείται σε ένα Collection Tube[®] (2ml). Στη στήλη προστίθενται 700μL από το δείγμα που φυγοκεντρώνεται για 1min στα 11000g. Το έκλουσμα απορρίπτεται και η στήλη επανατοποθετείται στο Collection Tube[®].

3. Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης

Προστίθενται 700μL διαλύματος NT3 στη στήλη και γίνεται φυγοκέντρωση στα 11000g για 1min με απόρριψη του εκλούσματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο Collection Tube[®]. Η αιθανόλη που περιέχεται στο αντιδραστήριο κατακρημνίζει το γενετικό υλικό το οποίο προσδένεται ισχυρά στη στήλη σιλικόνης. Μάλιστα όσο πιο μεγάλο είναι το μοριακό βάρος του DNA τόσο ισχυρότερη είναι η σύνδεσή του στη στήλη.

4. Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης

Γίνεται άλλη μια φυγοκέντρωση στις 11000g για 1min για να στεγνώσει η στήλη από πιθανά κατάλοιπα αιθανόλης που περιέχονται στο διάλυμα NT3 και που πιθανόν να αναστείλουν ακόλουθες ενζυμικές αντιδράσεις.

5. Έκλουση DNA

Η στήλη τοποθετείται σε ένα σωλήνα τύπου eppendorf και προστίθενται 30μL διαλύματος NE, γίνεται επώαση στους 70°C για 2min (για να αυξηθεί η απόδοση της έκλουσης) και γίνεται ξανά φυγοκέντρωση στα 11000g για 1min.

Διπλή πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές του DNA και το κόβουν (στις θέσεις αυτές ή πιο μακριά). Μετά την πέψη αυτή δημιουργείται ένα αμβλύ άκρο (απλή δίκλωνη εντομή) ή κολλώδη (συμπληρωματικά) άκρα. Η δημιουργία συμπληρωματικών άκρων είναι χρήσιμη στην κλωνοποίηση, διότι επιτρέπει τη σύνδεση αλληλουχιών που διαθέτουν τέτοια άκρα. Συχνά γίνεται πέψη με διαφορετικά περιοριστικά ένζυμα ώστε να προκύψουν αλληλουχίες με άκρα που δεν είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους. Έτσι αποφεύγεται η συγκόλλησή ή η επανακυκλοποίησή τους. (T.A. Brown, (2007))

Για να πραγματοποιηθεί η διπλή πέψη είναι απαραίτητο να επιλεγθούν τα κατάλληλα ένζυμα που κόβουν μια φορά τόσο τους φορείς όσο και τα ενθέματα. Επιπλέον η πέψη πρέπει να γίνει στο σωστό σημείο του φορέα έτσι ώστε η νουκλεοτιδική αλληλουχία αγκιστείας (His Tag, GST) να έχει το ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το γονίδιο που έχουμε ενθέσει. Επιλέχθηκαν τα ένζυμα BamHI^{HF}, XhoI και HindIII^{HF} με τη βοήθεια του προγράμματος NEB cutter το οποίο μας υπέδειξε τα ένζυμα που δεν κόβουν εντός του γονιδίου. Ο χρόνος επώασης, ο χρόνος απενεργοποίησης με θέρμανση και η θερμοκρασία απενεργοποίησης για κάθε ένζυμο βρέθηκε με τη βοήθεια της κατασκευάστριας εταιρείας (New England Biolabs, NEB). Η BamHI^{HF} είναι μια θερμοανθεκτική περιοριστική ενδονουκλεάση οπότε δεν είχε θερμοκρασία απενεργοποίησης. Η XhoI έχει θερμοκρασία απενεργοποίησης 80°C (20min) και η HindIII^{HF} 65°C (20min). Οι διπλές πέψεις απαιτούν και ένα ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) που να επιτρέπει την ταυτόχρονη δράση των δύο ενζύμων. Το ρυθμιστικό διάλυμα που ενδείκνυται για όλες τις αντιδράσεις ήταν το CutSmart Buffer της ίδιας εταιρείας στο οποίο παρουσιάζουν απόδοση 100% και τα τρία ένζυμα. Πραγματοποιείται διπλή πέψη και των δύο φορέων αλλά και των ενισχυμένων γονιδίων με τα κατάλληλα ένζυμα σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο από το site της NEB.

Πίνακας 4 Διπλή πέψη του φορέα pGEX-6p-1 με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού

pGEX-6p-1 (BamHI+XhoI)	Ογκοί (μL)	Συγκέντρωση
Water for Injection	8.2	
CutSmart Buffer 10x	5	1x

DNA template	34.8	40ng
BamHI	1	10U
XhoI	1	10U

Πίνακας 5 Διπλή πέψη του κολοβωμένου γονιδίου με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού

hPhKγtrc (BamHI+XhoI)	Όγκοι (μL)	Συγκέντρωση
Water for Injection	32	
CutSmart Buffer 10x	5	1x
DNA template	11	60ng
BamHI	1	10U
XhoI	1	10U

Πίνακας 6 Διπλή πέψη του φορέα pETM-11 με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού

pETM-11 (BamHI+HindIII)	Όγκοι (μL)	Συγκέντρωση
Water for Injection	8.2	
CutSmart Buffer 10x	5	1x
DNA template	34.8	40ng
BamHI	1	10U
HindIII	1	10U

Πίνακας 7 Διπλή πέψη ολόκληρου του γονιδίου με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού

hPhKγ (BamHI+XhoI)	Όγκοι (μL)	Συγκέντρωση
Water for Injection	32.5	
CutSmart Buffer 10x	5	1x
DNA template	10.5	60ng

BamHI	1	10U
HindIII	1	10U

Για όλα τα παραπάνω δείγματα γίνεται επώαση για 2h στους 37°C και στη συνέχεια θέρμανση για απενεργοποίηση των ενζύμων στους 80°C για 20min.

Τα παραπάνω δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και ακολουθεί gel extraction.

Σύζευξη φορέα και ενθέματος με χρήση DNA λιγάσης (ligation)

Η σύνδεση φορέα και ενθέματος γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάση. Η πιο διδαδεδομένη DNA λιγάση προέρχεται από κύτταρα E. Coli μολυσμένα με βακτηριοφάγο T4. Ο ρόλος της συνίσταται στη σύνθεση φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ μη συνδεδεμένων νουκλεοτιδίων που βρίσκονται σε ένα πολυνουκλεοτίδιο ενός δίκλωνου μορίου. Προκειμένου να συνδεθούν δύο κλάσματα περιορισμού, η λιγάση πρέπει να συνθέσει δύο φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, έναν σε κάθε κλώνο. Τα συμπληρωματικά κολλώδη άκρα συνδέονται προσωρινά επιτρέποντας στη λιγάση να δράσει και να συγκολλήσει τα άκρα αυτά. Χρησιμοποιείται η T4 DNA λιγάση και ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο. Προτείνεται ο λόγος φορέα- ενθέματος να είναι 3:1.

Πίνακας 8 Σύνδεση φορέα και ενθέματος με τη χρήση του ενζύμου DNA λιγάση

	Όγκοι (μL)	Συγκέντρωση
Water for Injection	13.2	
T4 DNA ligation Buffer 10x	2	1x
Vector	2	100ng
Insert	2	60ng
T4 DNA Ligase	0.8	1U

Η σύνδεση μέσω λιγάσης πραγματοποιείται με επώαση των δειγμάτων στους 16°C για 16 ώρες.

Παρασκευή επιδεκτικών προς χημικό μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων

Κάποια βακτηριακά γένη όπως τα *Micrococcus*, *Haemophilus* και *Bacillus* μετασχηματίζονται φυσικά, διότι στην επιφάνεια της μεμβράνης υπάρχουν πρωτεΐνες που προσδένουν άμεσα εξωγενές DNA το οποίο και μεταφέρουν μέσα στο κυτταρόπλασμα. Τέτοιου είδους πρωτεΐνες μεταφοράς δεν έχουν αναφερθεί για την *E. coli* και ως εκ τούτου δε συμβαίνει γενετικός μετασχηματισμός αυθόρμητα σε κύτταρα *E. coli*. Υπάρχουν πρωτεΐνες που σχηματίζουν πόρους (πορίνες) σε υψηλό αριθμό αντιγράφων (περίπου 10⁵ μόρια πορίνης ανά κύτταρο) στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη, οι οποίες σχηματίζουν ένα μοριακό ηθμό για την παθητική μεταφορά υδρόφιλων μορίων με μέγιστο μοριακό βάρος έως 5000 Da. Συνεπώς, μακρομόρια όπως το DNA δεν μπορούν να περάσουν το κυτταρικό τοίχωμα της *E. coli*.

Η πρόσληψη και ενσωμάτωση εξωγενούς DNA από το περιβάλλον στο βακτηριακό γονιδίωμα ονομάζεται μετασχηματισμός. Τα βακτηριακά κύτταρα που είναι ικανά να προσλάβουν εξωγενές DNA ονομάζονται επιδεκτικά. Η επώαση με Ca²⁺ καθιστά την εξωτερική μεμβράνη της *E. coli* αντιστρεπτά διαπερατή σε μακρομόρια μέσω πλασμόλυσης. Παρουσία του CaCl₂, αυξάνονται τα επίπεδα των πρωτεϊνών OmpC, OmpA κ.α. οι οποίες είναι πορίνες και έχουν ωσμοφυθμιστικό ρόλο στους πρωκαρυώτες. Η πλασμόλυση που συμβαίνει παρουσία του CaCl₂ είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού. (Bukau B BJ, Boos W., 1985)

Από μια καλλιέργεια μητρικών κυττάρων που έχει επωαστεί όλη τη νύχτα (37°C/210rpm) σε LB θρεπτικό μέσο και παρουσία τετρακυκλίνης τελικής συγκέντρωσης 10μg/ml, εμβολιάζονται 200mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB παρουσία του ίδιου αντιβιοτικού. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) και παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά λαμβάνοντας 1mL καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώσπου OD_{600nm}= 0.5-0.7, όπου και θεωρείται πως η καλλιέργεια βρίσκεται στο απόγειο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Σε αυτό το στάδιο, το σύνολο της καλλιέργειας φυγοκεντρείται σε παγωμένους σωλήνες τύπου falcon των 50mL, στις 4000rpm για 6min στους 4 ° C και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 14 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε παγωμένο διάλυμα 0.1M CaCl₂ και αφήνεται για 20min στον πάγο. Γίνεται ξανά

φυγοκέντρωση στις 4000rpm για 6min στους 4 °C και επαναδιαλύεται εκ νέου σε παγωμένο διάλυμα 0.1M CaCl₂ και αφήνονται στον πάγο για 12-16h. Τέλος, τα βακτήρια αραιώνονται σε γλυκερόλη (10% τελική συγκέντρωση), διαμοιράζονται σε σωλήνες τύπου erpendorf σε κλάσματα των 100μL και αποθηκεύονται στους -80°C μετά από ταχεία ψύξη (flash freeze) σε παγωμένη αιθανόλη 100% (-80°C). Σημειώνεται ότι όλοι οι χειρισμοί πλην της επώασης γίνονται σε ψυχρό θάλαμο (4 °C) και πάγο, με αποστειρωμένα υλικά και εργαλεία σε στείρες συνθήκες. (Aich P,et al.,2012)

Μετασχηματισμός Βακτηρίων E. coli XL1 - Blue με ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα

Πραγματοποιείται μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελέχους XL1 Blue με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* XL1-Blue (100μl), προστίθενται 90ng ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Τα κύτταρα, έπειτα από ελαφριά ανάδευση τοποθετούνται στους 0°C για 30min, στη συνέχεια θερμαίνονται στους 42°C για 45 sec και τέλος τοποθετούνται ξανά στους 0°C για 2min. Μετά το πέρας των 2min προστίθενται στο διάλυμα των κυττάρων 900μL SOC θρεπτικού μέσου άνευ αντιβιοτικού (Παράρτημα) και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 h υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm). Μετά το πέρας της επώασης ποσότητα της υγρής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων επιστρέφεται σε τρυβλία petri με θρεπτικό μέσο LB Agar (Παράρτημα), στα οποία έχει προστεθεί το αντιβιοτικό - για το μεν γονίδιο στο φορέα pETM-11 το αντιβιοτικό ήταν Καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml για το δε γονίδιο στο φορέα pGEX-6P-1 το αντιβιοτικό ήταν Αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml, με γυάλινο διανομέα (πιπέττα pasteur).

Τα τρυβλία τοποθετούνται για επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο.

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες.

Απομόνωση πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα (MiniPrep)

Σε σωλήνες τύπου Falcon, που περιέχουν θρεπτικό μέσον LB Broth με καναμυκίνη (20μg/ml) και αμπικιλίνη (100μg/ml) αντίστοιχα, έγινε εμβολιασμός με μία αποικία των μετασχηματισμένων βακτηρίων *E. coli* (XL1Blue) που διαθέτουν το

ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Στη συνέχεια έγινε επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες και υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm).

Για την εξαγωγή του πλασμιδίου από τα κύτταρα ακολουθείται το πρωτόκολλο που διατίθεται από την εταιρεία.

Από το kit παρέχονταν τα παρακάτω διαλύματα:

- A1: διάλυμα για επαναιώρηση των κυττάρων (περιείχε RNAάση)
- A2: διάλυμα για λύση των κυττάρων
- A3: διάλυμα για εξουδετέρωση του διαλύματος λύσης
- A4: διάλυμα για έκπλυση της στήλης (περιείχε EtOH 100%)
- AE: διάλυμα για έκλουση του DNA από τη στήλη (Tris/HCl)

1. Καλλιέργεια και συλλογή βακτηριακών κυττάρων

Τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται από το θρεπτικό μέσον με φυγοκέντριση στα 11,000g για 1min σε σωλήνες τύπου eppendorf.

2. Λύση κυττάρων

Το ίζημα επαναιωρείται σε 250μL διάλυμα A1 με τη βοήθεια πιπέτας. Η λύση των κυττάρων γίνεται με το διάλυμα A2 (250μL) (SDS/alkaline). Γίνεται ήπια ανάδευση του σωλήνα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min. Προστίθεται το διάλυμα A3 (300μL) για εξουδετέρωση του διαλύματος A2 και ακολουθεί φυγοκέντριση (11,000g) για 10min.

3. Δέσμευση του DNA

Το υπερκείμενο, που δεν περιέχει τα βαριά κυτταρικά υπολείμματα (π.χ μεμβράνες) διατηρείται και τοποθετείται σε μια στήλη μικρής κλίμακας NucleoSpin® Plasmid Column. Έγινε φυγοκέντρωση στα 11,000g για 1min. Σκοπός ήταν η σύνδεση του DNA πάνω στη στήλη.

4. Πλύση της μεμβράνης σιλικόνης

Προστίθενται 600μL A4 (που περιέχει EtOH) για έκπλυση της στήλης από άλατα και μεταβολήτες και γίνεται ξανά φυγοκέντρηση (11.000g, 1min). Το έκλουσμα αποχύνεται. Η αιθανόλη που περιέχεται στο διάλυμα κατακρημνίζει το γενετικό υλικό το οποίο προσδένεται ισχυρά στη στήλη σιλικόνης. Μάλιστα όσο πιο μεγάλο είναι το μοριακό βάρος του DNA τόσο ισχυρότερη είναι η σύνδεσή του στη στήλη.

5. Ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης

Γίνεται ακόμα μια φυγοκέντρηση στα 11,000g για 2min ώστε να στεγνώσει η στήλη από πιθανά κατάλοιπα αιθανόλης που περιέχονται στο A4 και που πιθανόν να αναστείλουν ακόλουθες αντιδράσεις.

6. Έκλωση DNA

Τέλος προστίθενται 50μL AE που συμβάλλει στην έκλωση του DNA. Το δείγμα τοποθετείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2min για επώαση και κατόπιν φυγοκεντρείται για 1min στα 11,000g.

Μετασχηματισμός Βακτηρίων *E. coli* (BL21 Gold, B834, B834 pLysS) με ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα

Πραγματοποιείται μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* διαφορετικών στελεχών με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* (100μl), προστίθενται 90ng ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Τα κύτταρα, έπειτα από ελαφριά ανάδευση τοποθετούνται στους 0°C για 30min, στη συνέχεια θερμαίνονται στους 42°C για 45 sec και τέλος τοποθετούνται ξανά στους 0°C για 2min. Μετά το πέρας των 2min προστίθενται στο διάλυμα των κυττάρων 900μL LB θρεπτικού μέσου άνευ αντιβιοτικού (Παράρτημα) και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 h υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm). Μετά το πέρας της επώασης ποσότητα της υγρής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων επιστρέφεται σε τρυβλία petri με θρεπτικό μέσο LB Agar (παράρτημα), στα οποία έχει προστεθεί το αντιβιοτικό - για το μεν γονίδιο στο φορέα pETM-11 το αντιβιοτικό ήταν Καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml για το δε γονίδιο στο φορέα pGEX-6P-1 το αντιβιοτικό ήταν Αμικικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml , με γυάλινο διανομέα (πιπέττα pasteur).

Τα τρυβλία τοποθετούνται για επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες σε ξηρό

θερμαινόμενο θάλαμο.

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες.

Έλεγχος έκφρασης (expression test)

Σε σωλήνες τύπου Falcon, που περιέχουν θρεπτικό μέσον LB Broth με καναμυκίνη (20μg/ml) και αμπικιλλίνη (100μg/ml) αντίστοιχα, έγινε εμβολιασμός με μία αποικία των μετασχηματισμένων βακτηρίων *E. coli* (BL21 Gold, B834, B834 pLysS) που διαθέτουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Στη συνέχεια έγινε επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες και υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm).

Σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες με 50 ml LB μέσο υγρής καλλιέργειας προστίθεται αντιβιοτικό (Καναμυκίνη (20μg/ml) και Αμπικιλλίνη (50μg/ml) αντίστοιχα). Μετά την προσθήκη αντιβιοτικού λαμβάνουμε 1ml από την καλλιέργεια που θα χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για την φασματοφωτομετρική παρακολούθηση της πορείας ανάπτυξης της καλλιέργειας. Γίνεται επώαση στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Η καλλιέργεια παρακολουθείται με φωτομέτρηση σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνοντας 1ml και μετρώντας την απορρόφησή του στα 600nm. Όταν η απορρόφηση κυμαίνεται μεταξύ 0.500-0.700A τότε θεωρούμε ότι τα κύτταρα βρίσκονται στο μέγιστο σημείο της εκθετικής φάσης οπότε η επώαση σταματάει. Στο σημείο αυτό μπορεί να ξεκινήσει η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει. Τα δείγματα χωρίζονται σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon. Γίνεται προσθήκη IPTG (0.5mM) και στη συνέχεια οι μισές καλλιέργειες επωάζονται στους 37°C για 3 ώρες, ενώ οι άλλες μισές επωάζονται στους 18°C για 12-16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (210rpm). Μετά το πέρας της επαγωγής γίνεται φυγοκέντρηση των καλλιεργειών στα 5000rpm, 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο αποχύνεται και διατηρείται το κυτταρικό ίζημα στους -20°C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη μέρα τα δείγματα τοποθετούνται στους 0°C ώστε να ξεπαγώσουν ελαφρώς και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Παράρτημα). Κατόπιν γίνεται πλήρης λύση των κυττάρων σε συσκευή υπερήχων για 1 κύκλο των 10 sec με παραγωγή υπερήχων εύρους 70%. Λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας από τους υπέρηχους, οι σωλήνες τύπου erppendorf που περιέχουν το δείγμα είναι τοποθετημένοι σε πάγο. Μέρος του δείγματος αφαιρείται μετά τη λύση για να γίνει ανάλυσή του σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Το υπόλοιπο δείγμα που

περιέχει τα λυμένα κύτταρα φυγοκεντρείται στα 13000rpm, 4°C για 30 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση συλλέγεται το υπερκείμενο αλλά και το ίζημα ώστε να αναλυθούν και αυτά σε SDS-PAGE.

4.2.2 2η μέθοδος (με χρήση ενζύμου in-fusion)

Με τη μέθοδο αυτή έγινε ένθεση του γονιδίου της hPhKγtrc στον φορέα pGEX-6p-1.

Υποκλωνοποίηση cDNA αλληλουχίας του κολοβωμένου τμήματος της hPhKγ με τη μέθοδο In-fusion HD Cloning

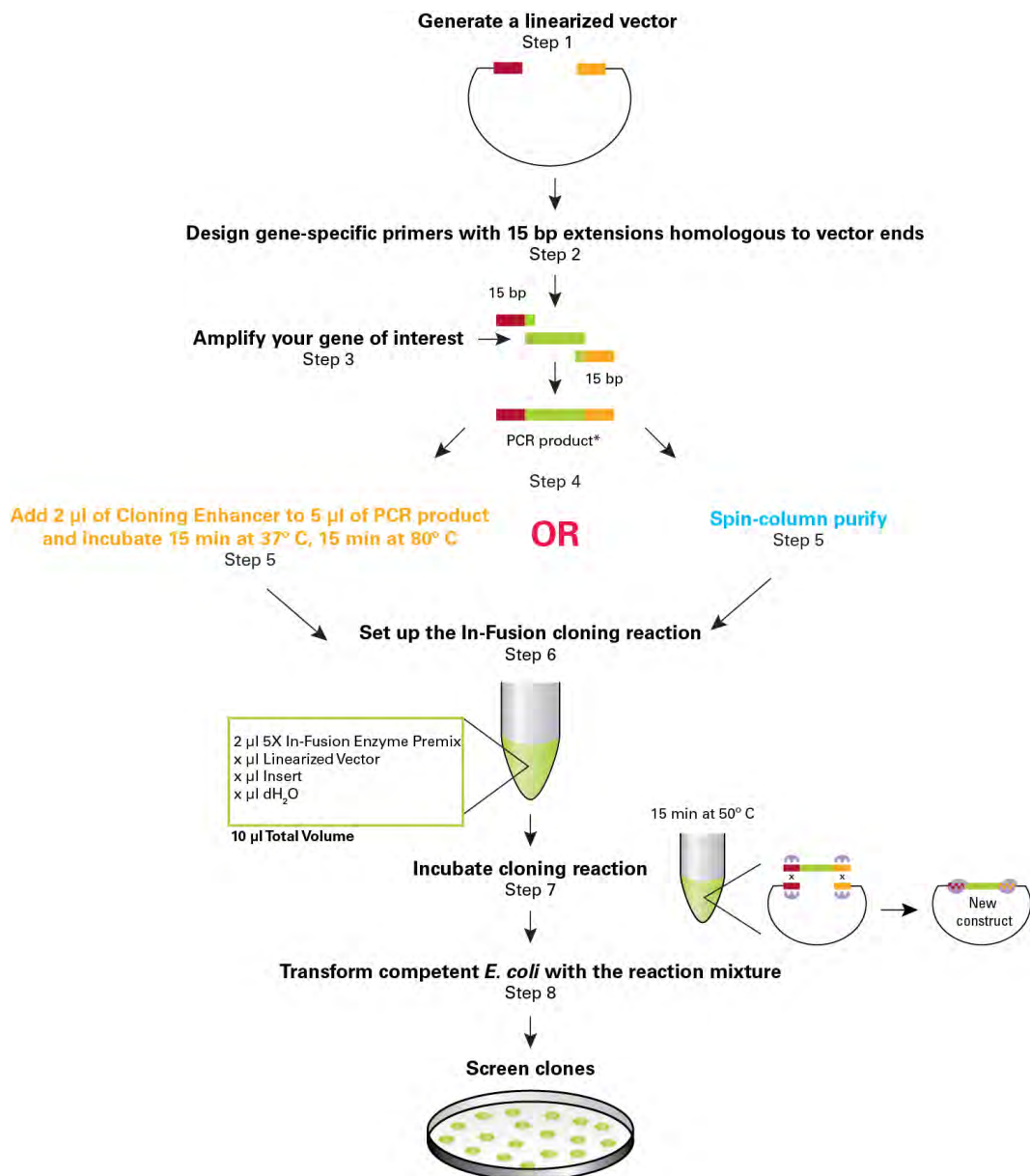
Για την υποκλωνοποίηση του κολοβωμένου τμήματος της γ υπομονάδας της PHK στο φορέα pGEX-6p-1, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του In-fusion HD cloning kit της εταιρείας clontech. Το πρωτόκολλο αυτό είναι σχεδιασμένο για γρήγορη και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση ενός ή περισσότερων τμημάτων DNA σε έναν φορέα. Η τεχνολογία που χρησιμοποιεί το συγκεκριμένο πρωτόκολλο καθιστά δυνατή τη γρήγορη και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς, καθώς κάνει χρήση του κατοχυρωμένου από την Clontech ενζύμου In-Fusion, το οποίο συνδέει τμήματα DNA μεταξύ τους (όπως είναι ένα προϊόν PCR και ένας γραμμικοποιημένος 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 απαιτούνται για την πραγματοποίηση της υποκλωνοποίησης είναι τα εξής:

- PCR για ενίσχυση του τμήματος που θα κλωνοποιηθεί χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA το cDNA της hPhKγ με τους ειδικούς In-Fusion εκκινητές
- Πέψη του φορέα (pGEX-6p-1) όπου θα κλωνοποιηθεί το ένθεμα με ενδονουκλεάση περιορισμού η οποία έχει εξασφαλισθεί πως έχει μόνο μια θέση αναγνώρισης στο φορέα στην περιοχή πολυσυνδέτη, έτσι ώστε ο φορέας να γίνει γραμμικός και όχι να κατακερματιστεί σε περισσότερα τμήματα.
- Ηλεκτροφόρηση των τμημάτων DNA του φορέα και του ενθέματος για την ταυτοποίηση της παρουσίας τους και την ποσοτικοποίησή τους.

- Έκπλυση και ανάκτηση των τμημάτων DNA από την πηκτική αγαρόζη (Gel & PCR clean up kit, Macherey-Nagel)
- Αντίδραση επίδεσης του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα (Ligation) με τη χρήση του In-Fusion ενζύμου
- Μετασχηματισμός σε επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα
- Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων και ταυτοποίηση με αλληλούχηση.

Τα βασικά βήματα της παραπάνω μεθόδου φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



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

Εικόνα 13 Σχηματική παρουσίαση του πρωτοκόλλου της μεθόδου In-Fusion (Clontech)

Σχεδιασμός εκκινητών

Έγινε σχεδιασμός εκκινητών με σκοπό την ενίσχυση του γονιδίου. Ακολούθησαν 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. Η υπόλοιπη αλληλουχία του

εκκινητή κατασκευάζεται όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 4.2.1.

Για την κατασκευή τους πέρα από τα παραπάνω χρησιμοποιήθηκε και το διαδικτυακό εργαλείο της Clontech. Έτσι γίνεται εύκολα ο σχεδιασμός εκκινητών σύμφωνα με τις προτεινόμενες οδηγίες.

Εκκινητές για κολοβομένο τμήμα (προς ένθεση στον pGEX-6p-1):

Forward Primer

5'-GGGATCCCCGGAATTC ACCCGGGACGAGGCACTG-3'

(72% GC content / Tm=64°C)

Reverse Primer

5'-GTCGACCCGGGAATTC CTACTAGAAGTGCCGCACTTCCTCCAC-3'

(64% GC content / Tm=62°C)

Οι εκκινητές ελέγχθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος OligoCalc (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc) για δημιουργία τυχόν διμερών ή διαμορφώσεων φουρκέτας. Οι θερμοκρασίες τήξης υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του Tm Calculator (www.tmcalculator.neb.com).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Το κολοβομένο τμήμα του γονιδίου της hPhKγ ενισχύεται με τους παραπάνω εκκινητές. Τα προϊόντα που προκύπτουν διαθέτουν άκρα κατάλληλα για ομόλογο ανασυνδυασμό με το κατοχυρωμένο από την εταιρεία clontech ένζυμο in-fusion.

Πρωτόκολλο PCR (Τελικός όγκος 50μL)

Πίνακας 9 Όγκοι και συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την πραγματοποίηση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

	Όγκος (μL)	Συγκέντρωση
Water for Injection	37.8	
10x Kapa Taq Buffer A	5	1x
10mM dNTP Mix	1	0.2mM το καθένα
10μM Forward Primer	2	0,4μM
10μM Reverse Primer	2	0.4μM

DNA Template	2	0,2 ng/μL
Kapa Taq DNA Polymerase	0.2	1U

Πίνακας 10 Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Συνθήκες	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλοι
Initial Denaturation	95oC	3min	1
Denaturation	95 oC	30sec	30
Annealing	58 oC	30sec	
Extension	72 oC	70sec	
Final Extension	72 oC	70sec	1
Hold	4 oC	-	-

Τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Παράρτημα) και πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση.

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. Πιο συγκεκριμένα, οι όγκοι ορίστηκαν ώστε το υπόστρωμα DNA να έχει ποσότητα ≤1μg. Στη συνέχεια, έγινε επώαση της αντίδρασης στους 37oC για 2 ώρες.

Πίνακας 11 Πέψη του φορέα pGEX-6p-1 με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI

	Όγκοι	Τελικές συγκεντρώσεις
ddH ₂ O	7μL	
10x Buffer H	2μL	1x
pGEX-6p-1	10μL	≈1μg
EcoRI	1μL	1U
Vτελ	20μL	

Μετά τις 2 ώρες επώασης η αντίδραση περατώθηκε με προσθήκη κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 6x (6x loading buffer) (παράρτημα), ώστε η τελική συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος να είναι 1x. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για ποσοτικοποίηση του γραμμικοποιημένου πλέον φορέα.

Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού

Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία, η διαδικασία σύνδεσης του τμήματος του ενθέματος με τον γραμμικοποιημένο φορέα βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό και όχι με αντίδραση λιγάσης. Η αντίδραση καταλύεται από μία ανασυνδετάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση τα κοινά άκρα των 15bp που έχουν ο φορέας και το ένθεμα. Η αναλογία της ποσότητας του ενθέματος προς αυτή του φορέα κλωνοποίησης, προκειμένου η απόδοση του ομόλογου ανασυνδυασμού να είναι υψηλή, ορίστηκε ως 3 προς 1 αντίστοιχα σύμφωνα με το In-fusion HD cloning kit. Ο λόγος για τον οποίο η ποσότητα του ενθέματος ορίζεται 3 φορές περισσότερη από την ποσότητα του φορέα είναι έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες ο φορέας να επανακυκλοποιηθεί χωρίς να λάβει ένθεμα. Στη συνέχεια, έγινε επώαση της αντίδρασης στους 50 °C για 30min. Μετά τα 30min επώασης, η αντίδραση περατώθηκε με αποθήκευση στον πάγο (0 °C).

Πίνακας 12 Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού

	Όγκοι	Τελικές συγκεντρώσεις
ddH ₂ O	7μL	
10x Buffer H	2μL	1x
pGEX-6p-1	10μL	≈1μg
EcoRI	1μL	1U
Vτελ	20μL	

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

Πέψη του ανασυνδυασμένου φορέα με EcoRI

Για να βεβαιωθούμε ότι ο πλασμιδιακός φορέας είναι πραγματικά ανασυνδυασμένος πρωτού σταλεί για αλληλούχηση, πραγματοποιήσαμε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών είχαμε φροντίσει να διατηρηθούν οι αλληλουχίες που αναγνωρίζει το ένζυμο αυτό δεξιά και αριστερά του ενθέματός μας. Οπότε κατά την πέψη με τη συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση αναμένουμε να δούμε δύο ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης. Η μία θα βρίσκεται στο ύψος του μοριακού βάρους που θα είχε ο γραμμικοποιημένος πλασμιδιακός φορέας pGEX-6p-1 (άνευ ενθέματος), δηλαδή στα 4984bp και η άλλη περίπου στα 1000bp στο ύψος δηλαδή του ενισχυμένου με τους εκκινητές γονιδίου. Η πέψη έγινε όπως φαίνεται στον πίνακα.

Πίνακας 13 Πέψη με EcoRI για επαλήθευση ύπαρξης ενθέματος

	Όγκοι	Τελικές συγκεντρώσεις
ddH ₂ O	7μL	
10x Buffer H	2μL	1x
Recombinant vector	10μL	≈1μg
EcoRI	1μL	1U
Vτελ	20μL	

Έγινε επώαση του παραπάνω μίγματος για 2 ώρες στους 37oC και στη συνέχεια ολόκληρη η ποσότητα του δείγματος έτρεξε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%.

4.3 Αναλυτικές Μέθοδοι

4.3.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο της κίνησης χημικών ενώσεων (κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων) μέσα σε πήκτωμα υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Η κίνηση των ουσιών μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό βάρος των ουσιών. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου

φορτίου. Εξαιτίας των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες. (T.A. Brown, 2007)

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτώματα αгарόζης ή πολυακρυλαμιδίου και η επιλογή εξαρτάται κυρίως από τη φύση του δείγματος που πρόκειται να διαχωριστεί. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, έγινε χρήση πηκτής αгарόζης που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων (DNA). (T.A. Brown, 2007)

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης είναι η πρότυπη μέθοδος για το διαχωρισμό μορίων DNA διαφορετικού μήκους. Έχει πολλές εφαρμογές στην ανάλυση του μεγέθους των κλασμάτων DNA και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό μορίων RNA. Καθοριστικός παράγοντας για την ταχύτητα μετανάστευσης είναι το μήκος των μορίων. Αυτό συμβαίνει γιατί το πήκτωμα είναι ένα δίκτυο από πόρους διαμέσου των οποίων πρέπει να διέλθουν τα μόρια του DNA προκειμένου να προσεγγίσουν το θετικό ηλεκτρόδιο. Τα βραχύτερα μόρια εμποδίζονται λιγότερο κατά τη δίοδο τους συγκριτικά με τα μακρύτερα μόρια: έτσι μετακινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα μέσα στην πηκτή.

Η αгарόζη είναι πολυσακχαρίτης που σχηματίζει πήκτωμα με πόρους διαμέτρου από 100nm μέχρι 300nm ανάλογα με τη συγκέντρωση της αгарόζης. (T.A. Brown, 2007)

Για την παρασκευή της πηκτής γίνεται ανάμειξη της κατάλληλης ποσότητας σκόνης αгарόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα (TAE στην προκειμένη περίπτωση) και θέρμανση μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αгарόζη. Ακόμη γίνεται προσθήκη ειδικής χρωστικής (Midori Green), η οποία δεσμεύεται στο DNA. Το Midori Green παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και αποτελεί μια μη καρκινογόνο εναλλακτική του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτές αгарόζης. Εκπέμπει πράσινο φθορισμό όταν είναι προσδεδεμένο σε DNA ή RNA (~530nm) όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία χαμηλού μήκους κύματος (~270nm). (παράρτημα) (T.A. Brown, (2007)).

4.3.2 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, έγινε χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου, η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μορίων όταν είναι αναγκαία μεγάλη διακριτική ικανότητα.

Η τεχνική SDS-PAGE που εφαρμόζεται (Laemmli, 1970) λειτουργεί ως εξής: Η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) η οποία έχει σταθερή πυκνότητα 5% και την πηκτή διαχωρισμού (running gel) της οποίας η πυκνότητα προσαρμόζεται ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Οι δύο πηκτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβαξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύσει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Στην πηκτή διαχωρισμού η κίνηση των πρωτεϊνών περιορίζεται από την πηκτή, που δρα ως ηθμός, καθώς το μέγεθος των πόρων του πλέγματος που δημιουργούνται αυξάνει τις διαφορές στην κινητικότητα μεταξύ πρωτεϊνών που διαφέρουν σε μέγεθος. (Weber K., *et al.*, 1969)

Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με την αντίδραση πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δις-ακρυλαμιδίου, σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία των παραγόντων υπερθειικό αμμώνιο (APS) και τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (TEMED). Το TEMED είναι επιταχυντής, το οποίο καταλύει την αντίδραση πολυμερισμού των ελεύθερων ριζών του θείου που δημιουργούνται από το APS. (Weber K., *et al.*, 1969)

Η παρασκευή του πηκτώματος γίνεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που αποτελείται από δύο παράλληλες γυάλινες πλάκες (10 x 8cm) με απόσταση μεταξύ τους 1mm. Αρχικά παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού (Παράρτημα) και αφού πήξει προστίθεται από πάνω η πηκτή επιστοίβαξης (Παράρτημα), στην οποία σχηματίζονται 10 ή 15 υποδοχές με τη βοήθεια ειδικής “χτένας”. Μόλις η πηκτή είναι έτοιμη τοποθετείται, μαζί με το ικρίωμά της, στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1× (Running Buffer 1×)(παράρτημα). (Bio-rad)

Τα πρωτεϊνικά δείγματα αναμειγνύονται με 4x SDS protein Sample Buffer (παράρτημα) έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραιώση των δειγμάτων να είναι 1×. Η κοινή πορεία, από την κάθοδο προς την άνοδο, όλων των μορίων που περιέχονται σε κάθε δείγμα, εξασφαλίζεται με την προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ο οποίος θα καταργήσει τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων φορτίζοντάς τις αρνητικά και προσδίδοντάς τους ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, ώστε να μεταναστεύσουν όλα προς την άνοδο, και να διαχωριστούν όχι βάσει του φορτίου τους, αλλά βάσει του μοριακού τους βάρους. Ακόμη το διάλυμα αυτό περιέχει β - μερκαπτοαιθανόλη η οποία συντελεί στην πλήρη αποδιάταξη της πρωτεΐνης καθώς ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, εμποδίζοντας την εκ νέου αναδίπλωση της πρωτεΐνης μετά το βρασμό. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην αποδιάταξη της τεταρτοταγούς δομής της πρωτεΐνης σε υπομονάδες. Τέλος το κυανό της βρομοφαινόλης καθιστά δυνατή την παρατήρηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης, καθώς έχει ταχύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα από τις ηλεκτροφορούμενες πρωτεΐνες. (Bio-rad)

Στη συνέχεια το μίγμα θερμαίνεται στους 95°C για 5 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται σε κάθε δείγμα και τοποθετείται στις υποδοχές του πηκτώματος με τη χρήση πιπέτας. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης τέλος συνδέεται σε τροφοδοσία ρεύματος (120V). (Bio-rad)

Μετά την ηλεκτροφόρηση οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με χρώση Coomassie Blue 0.05% (παράρτημα). Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον (σε οξικό οξύ 10% v/v), που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ γίνονται και αλληλεπιδράσεις χρωστικής - πρωτεϊνών μέσω δυνάμεων van der Waals. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται μέχρι 0,1 mg πρωτεΐνης. Αρχικά η πηκτή πολυακρυλαμίδιου εμβαπτίζεται σε διάλυμα Coomassie Blue και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Αφήνεται κατόπιν για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αποχύνεται το διάλυμα χρώσης και η πηκτή εμβαπτίζεται διαδοχικά σε διάλυμα 10% v/v οξικού οξέος μέχρι να αποχρωματιστεί ολόκληρη εκτός από τις ζώνες των πρωτεϊνών. (Bio-rad)

5. Αποτελέσματα / Συζήτηση

5.1 *In silico* μελέτες πρωτεϊνικής ανάλυσης.

5.1.2 Στοίχιση (Alignment)

Η στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας της hPhKγ και της αντίστοιχης του κουνελιού έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος LAlign (ExPASy.org). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει πολύ μεγάλη ομολογία μεταξύ τους. Ακόμη έγινε στοίχιση των αλληλουχιών της ανθρώπινης μυϊκής (phkg1) και της ανθρώπινης ηπατικής κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (phkg2) για να υπολογιστεί η ομοιότητά τους. Από τα δεδομένα της στοίχισης με το LAlign προκύπτει ότι η ομοιότητα της hPhKγ με την αντίστοιχη του κουνελιού είναι πολύ μεγάλη (94.3%). Η ομοιότητα με την ηπατική είναι σαφώς μικρότερη. Κάτι άλλο αξιοσημείωτο είναι ότι τα αμινοξέα Asp149, Arg148 και Glu182, καθώς και η περιοχή ενεργοποίησης που συναντάμε σε όλες τις γνωστές δομές κινάσων είναι συντηρημένα (στην εικόνα φαίνονται με κίτρινο χρώμα). Τα αποτελέσματα της στοίχισης φαίνονται στο Σχήμα 1 και τα ποσοστά ομοιότητας στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14 Ποσοστά ομοιότητας των αλληλουχιών με το LAlign

	Identity	Similarity
hmPhKγ human –hl PhKγ human	64.5%	89%
mPhKγ human –mPhKγ rabbit	94.3%	98.5%
hmPhKγ human (300aa)–hlPhKγ human (300aa)	68.3%	92%
mPhKγ human (300aa)–mPhKγ rabbit (300aa)	93.7%	98.3%

Σχήμα 1 Αποτελέσματα στοίχισης με το LAlign

hmPhKγ – hlPhKγ
Waterman-Eggert score: 1715; 479.6 bits; E(1) < 7e-140 64.5% identity (89.0% similar) in 372 aa overlap (4-375:8-378)

	10	20	30	40	50	60
phkg1	DEALPDSHSAQDFYENYEPKEILGRGVSSVVRRCIHKPTSQEYAVKVIDVTGGGSFSPEE					
phkg2	EDELPDWAAAKEFYQKYPKDVIGRGVSSVVRRCVHRATGHEFAVKIMEVTAE-RLSPEQ					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
phkg1	VRELREATLKEVDILRKVSGHPNIIQLKDTYETNTFFFLVFDLMKRGELFDYLTEKVTLS					
phkg2	LEEVREATRRETHILRQVAGHPHIITLIDSYESSSFMFLVFDLMKRGELFDYLTEKVALS					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
phkg1	EKETRKIMRALLEVICTLHKLNIIVHRDLKPENILLDDNMNIKLTDGFGSCQLEPGERLRE					
phkg2	EKETRSIMRSLLEAVSFLHANNIVHRDLKPENILLDDNMQIRLSDFGFSCHLEPGEKLE					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
phkg1	VCGTPSYLAPEIIIECSMNEDHPGYGKEVDMWSTGVIMYTLLAGSPPFWHRKQMLMLRMIM					
phkg2	LCGTPGYLAPEILKCSMDETHPGYGKEVDLWACGVILFTLLAGSPPFWHRRQILMLRMIM					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
phkg1	SGNYQFGSPEWDDYSDTVKDLVSRFLVVQPQNRYTAEALAHPPFQOYLVEEVRHFSRPG					
phkg2	EGQYQFSSPEWDDRSSTVKDLISRLQLVDPEARLTAEQALQHPFFERCEGSQPWNLTFRQ					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
phkg1	KFKVIALTVLASVRIYYQYRRVKPVTREIVIRDPYALRPLRRLIDAYAFRIYGHVWKKGQ					
phkg2	RFRVAVWTVLAAGRVALSTHRVRPLTKNALLRDPYALRSVRHLIDNCAFRLYGHVWKKGGE					
	310	320	330	340	350	360

PhK γ human – PhK γ rabbit

Waterman-Eggert score: 2471; 686.1 bits; E(1) < 4.6e-202
94.3% identity (98.5% similar) in 389 aa overlap (1-389:1-389)

	10	20	30	40	50	60
phkg1	MTRDEALPDSHSAQDFYENYEPKEILGRGVSSVVRRCIHKPTSQEYAVKVIDVTGGGSFS					
phkg1	MTRDAALPGSHSTHGFYENYEPKEILGRGVSSVVRRCIHKPTCKEYAVKIIDVTGGGSFS					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
phkg1	PEEVRELREATLKEVDILRKVSGHPNIIQLKDTYETNTFFFLVFDLMKRGELFDYLTEKV					
phkg1	AEEVQELREATLKEVDILRKVSGHPNIIQLKDTYETNTFFFLVFDLMKKGELFDYLTEKV					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
phkg1	TLSEKETRKIMRALLEVICTLHKLNIIVHRDLKPENILLDDNMNIKLTDGFGSCQLEPGER					
phkg1	TLSEKETRKIMRALLEVICALHKLNIIVHRDLKPENILLDDNMNIKLTDGFGSCQLDPGEK					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
phkg1	LREVCCTPSYLAPEIIIECSMNEDHPGYGKEVDMWSTGVIMYTLLAGSPPFWHRKQMLMLR					
	190	200	210	220	230	240

	10	20	30	40	50	60
phkg1	MTRDEALPDSHSAQDFYENYEPKEILGRGVSSVVRRCIHKPTSQEYAVKVIDVTGGGSFS					
	:::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
phkg1	MTRDAALPGSHSTHGFIENYEPKEILGRGVSSVVRRCIHKPTCKEYAVKIIDVTGGGSFS					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
phkg1	PEEVRELREATLKEVDILRKVSGHPNIIQLKDTYETNTFFFLVFDLMKRGELFDYLTEKV					
	:::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
phkg1	AEEVQELREATLKEVDILRKVSGHPNIIQLKDTYETNTFFFLVFDLMKKGELFDYLTEKV					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
phkg1	TLSEKETRKIMRALLEVICTLHKLNIVH RD LKPENILLDDNMNIKLT DFGFSCQLEPGER					
	:::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
phkg1	TLSEKETRKIMRALLEVICALHKLNIVH RD LKPENILLDDNMNIKLT DFGFSCQLDPGEK					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
phkg1	LREVC GTPSYLAPEIIECSMNEDHPGYGKEVDMWSTGVIMYTLLAGSPPFWHRKQMLMLR					
	:::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
phkg1	LREVC GTPSYLAPEIIECSMNDNHPGYGKEVDMWSTGVIMYTLLAGSPPFWHRKQMLMLR					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
phkg1	MIMSGNYQFGSPEWDDYSDTVKDLVSRFLVVQPQNRYTAEALAHPPFQQYLVVEVRHFS					
	:::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
phkg1	MIMSGNYQFGSPEWDDYSDTVKDLVSRFLVVQPQKRYTAEALAHPPFQQYVVEVRHFS					
	250	260	270	280	290	300

5.1.3 Δομική Στοίχιση (Structural Alignment)

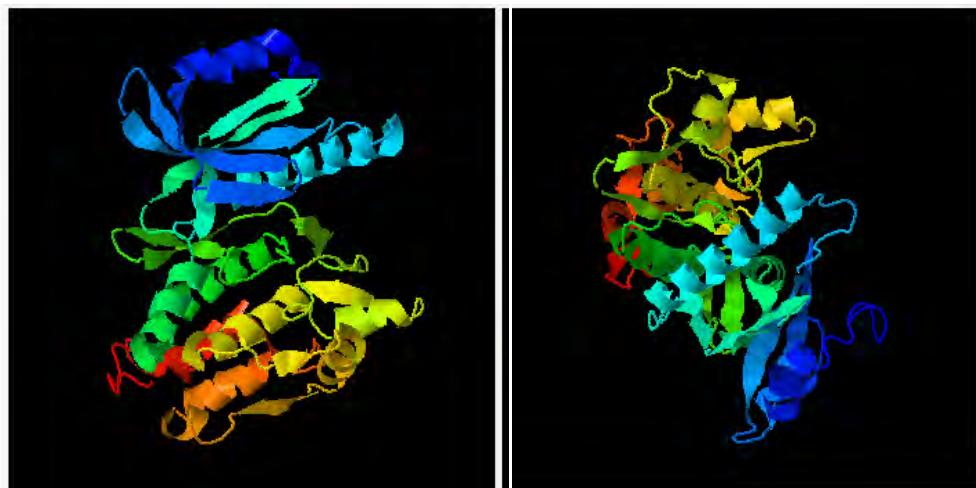
Με το πρόγραμμα *dali lite structural alignment tool* και με βάση τα παραπάνω, έγινε στοίχιση των δευτεροταγών δομών των πρωτεϊνών h1PHKγ και rPHKγ (rabbit) και διαπιστώθηκε ότι οι δομές είναι σχεδόν πανομοιότυπες, όπως φαίνεται και στην εικόνα 13. Το πρόγραμμα παίρνει δεδομένα από την βάση δεδομένων PDB όπου υπάρχουν οι δομές των δύο αλληλουχιών που στοιχίζονται. Σύμφωνα με τον αλγόριθμο του προγράμματος εάν $Z \text{ score} > 0.2$ τότε είναι βέβαιη η ομολογία των αλληλουχιών. Στην προκειμένη περίπτωση το $Z \text{ score} = 39.9$. (Εικόνα 14)

[back to top](#)

Εικόνα 14 Δομική στοίχιση με το πρόγραμμα dali lite. Με Η συμβολίζονται οι έλικες, με Ε τα πτυχωτά φύλλα και με L οι στροφές

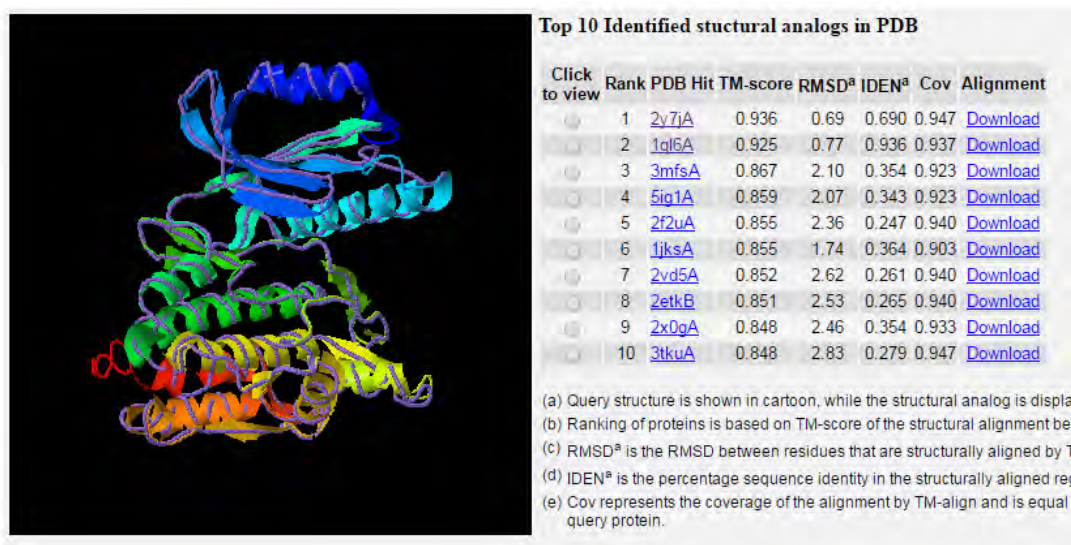
Το πρόγραμμα DOMAINATION εξειδικεύεται στον εντοπισμό επικρατειών σε μια πρωτεϊνική αλληλουχία αναζητώντας παρόμοιες αλληλουχίες χρησιμοποιώντας το PSI-BLAST. Στην εικόνα διακρίνουμε με μπλε γραμμή ολόκληρη την αλληλουχία της PhKγ, ενώ με κάθε επανάληψη της αναζήτησης μέσω PSI-BLAST το πρόγραμμα επιβεβαίωσε την ύπαρξη δύο βασικών επικρατειών. Ακόμη μας υπέδειξε ότι η περιοχή με δράση κινάσης εκτείνεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 1-320 (γαλάζια γραμμή). Με πράσινο χρώμα διακρίνεται το C-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης το οποίο δεν φαίνεται να αντιστοιχεί σε κάποιο συγκεκριμένο δομικό μοτίβο. (Εικόνα 15)

Τα αρχικά μοντέλα που προέκυψαν με το I-TASSER φαίνονται παρακάτω. Το πρώτο από αυτά εμφανίζει τα χαρακτηριστικά της κοινής δομής της επικράτειας κινάσης (kinase fold) των πρωτεϊνικών κινασών. Στην αμινοτελική περιοχή όμως, φαίνεται να υπάρχει μια δεύτερη α -έλικα. (Εικόνα 17)



Εικόνα 17 Πρωτεινόμενα μοντέλα για τη δομή της hPhKγtrc

Στη συνέχεια το πρόγραμμα συνέκρινε τα παραπάνω μοντέλα με άλλες υπάρχουσες δομές της PDB. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τις περισσότερες ομοιότητες, η αλληλουχία που καταχωρίσαμε της είχε με την ηπατική ανθρώπινη ισομορφή της PhK (2y7j) αλλά και ένα μετάλλαγμα της PhKγtrc από σκελετικό μυ κουνελιού (1ql6). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν εμφανίζεται η δομή της rmPhKγtrc που θεωρητικά έχει λιγότερες διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία σε σχέση με τις υπόλοιπες δομές που παρουσιάζονται. Η σύγκριση γίνεται με βάση το Tm score που παίρνει τιμές από 0-1. Η παράμετρος RMSD μετράει τη διαφορά στη δομή μεταξύ των μοντέλων. Όσο μεγαλύτερη η τιμή τόσο μεγαλύτερη η διαφορά. Για άλλη μια φορά μοντέλα με πολύ μεγαλύτερη δομική διαφορά με την αλληλουχία μας κατατάσσονται υψηλότερα. Αυτό πιθανώς να αποδεικνύει ότι η αναδίπλωση των πρωτεϊνών δεν σχετίζεται άμεσα με την αμινοξική αλληλουχία και ότι πρωτεΐνες με μεγάλη διαφορά στην αμινοξική αλληλουχία αναδιπλώνονται με τον ίδιο τρόπο. (Εικόνα 18)



Εικόνα 18 Δομικά μοντέλα με τη μεγαλύτερη δομική ομοιότητα με την hmPhKγtrc

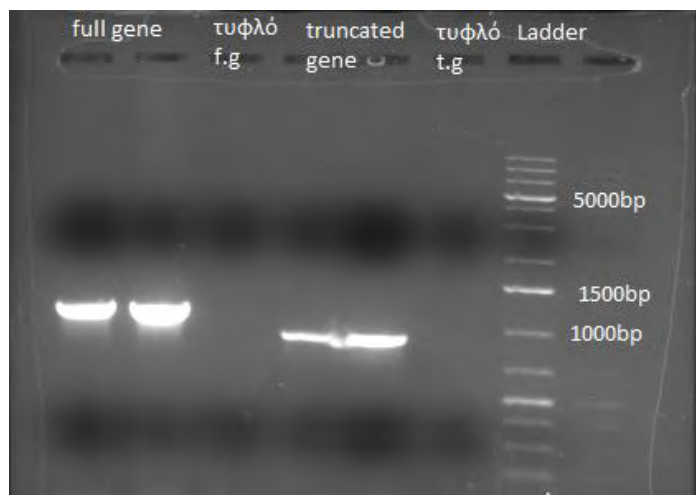
Η επεξεργασία των μελετών αμινοξικής και δομικής στοίχισης, πρόβλεψης επικρατειών με threading και μοντεολοποίησης ομολογίας ανέδειξαν το τμήμα 1-300 α.α να αντιστοιχεί στην επικράτεια κινάσης (kinase domain).

5.2 Τεχνικές Κλωνοποίησης

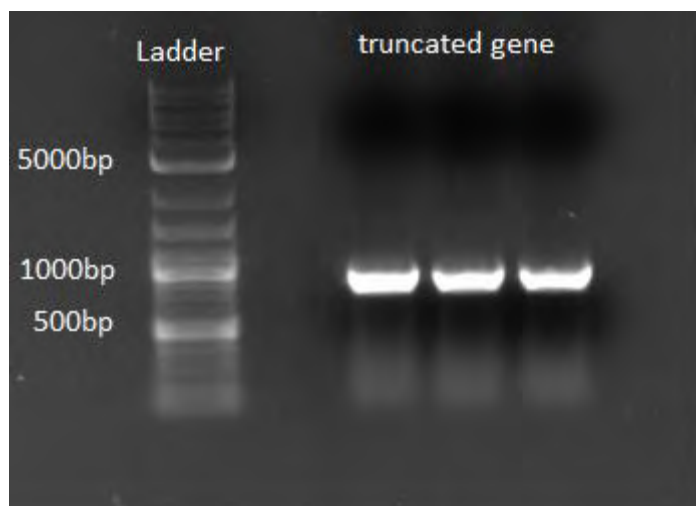
5.2.1 Ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου και του κολοβωμένου τμήματος με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

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 – στη μεν 1^η μέθοδο (ένωσης με DNA λιγάση) προσδίδουν άκρα που μπορούν να κοπούν με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, στη δε 2^η μέθοδο (ένωση με ομόλογο ανασυνδυασμό) προσδίδουν άκρα που θα επιτρέπουν τη σύνδεση στο φορέα με τη χρήση του κατοχυρωμένου από την εταιρεία Clontech ενζύμου in-fusion. Το μήκος ολόκληρου του γονιδίου αναμένεται να έχει μοριακό βάρος 1164bp συν τις βάσεις που προσθέτουν οι εκκινητές. Το μήκος του κολοβωμένου τμήματος αναμένεται να έχει βάρος περίπου 894bp ενώ προστίθενται σε αυτό και οι βάσεις των εκκινητών. Από την PCR (η οποία πραγματοποιήθηκε με το kit της εταιρείας

KapaBiosystems) προέκριναν 50μL δείγματος που μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας Loading dye δx φορτώθηκαν σε πηκτή αгарόζης 1% προς εξαγωγή και καθαρισμό με το kit της εταιρείας macherey-nagel. Σύμφωνα με τις παρακάτω εικόνες οι ενισχυμένες αλληλουχίες έχουν και τα αναμενόμενα μοριακά βάρη.



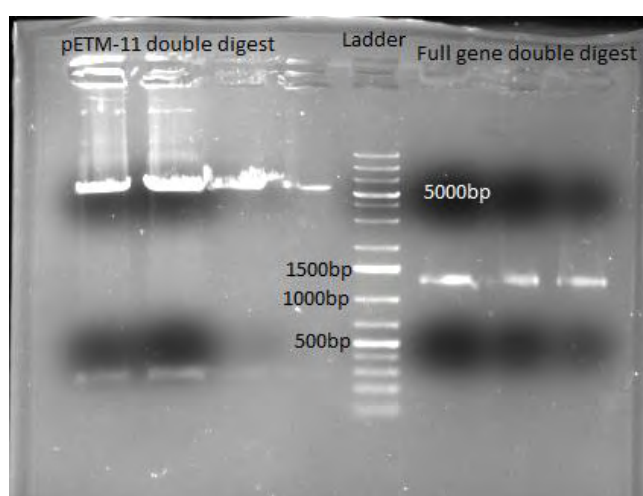
Εικόνα 19 Πήκτωμα αгарόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Παρατηρείται ότι τόσο ολόκληρο το γονίδιο (full gene) όσο και το κολοβωμένο τμήμα (truncated gene) έχουν τα αναμενόμενα μοριακά βάρη. Τα συγκεκριμένα δείγματα έχουν ενισχυθεί με τους εκκινητές της 1ης μεθόδου. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (Ladder) είναι ο GeneRuler™ 1kb plusDNA ladder της εταιρείας Thermo Scientific



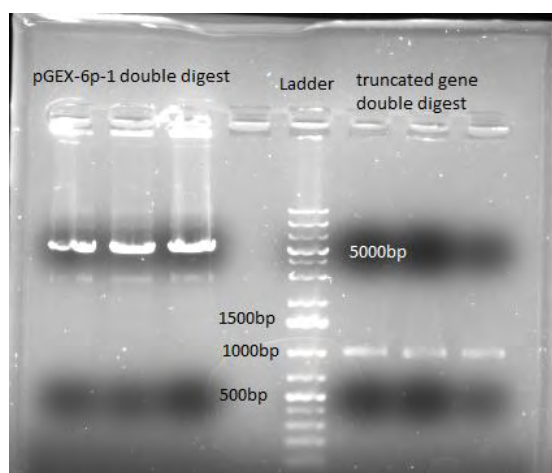
Εικόνα 20 Πήκτωμα αгарόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Παρατηρείται ότι η αλληλουχία για το hPhKγtrc έχει το αναμενόμενο μοριακό βάρος. Το συγκεκριμένο δείγμα έχει ενισχυθεί με τους εκκινητές της 2ης μεθόδου. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (Ladder) είναι ο 2-log DNA ladder της εταιρείας NEB

5.2.2 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

1^η μέθοδος: Τόσο οι πλασμιδιακοί φορείς (pGEX-6p-1 και pETM-11) όσο και τα αντίστοιχα ενθέματά τους κόπηκαν με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Ο pETM-11 και ολόκληρο το γονίδιο κόπηκαν με BamHI^{HF} και HindIII^{HF} ενώ ο pGEX-6p-1 και το κολοβωμένο τμήμα της hPhKγ κόπηκαν με BamHI^{HF} και XhoI. Τα δείγματα έτρεξαν σε πηκτή αгарόζης 1% προς εξαγωγή και καθαρισμό όπως φαίνεται στην εικόνα 16. Τα μοριακά βάρη των ενθεμάτων και των φορέων ήταν τα αναμενόμενα.

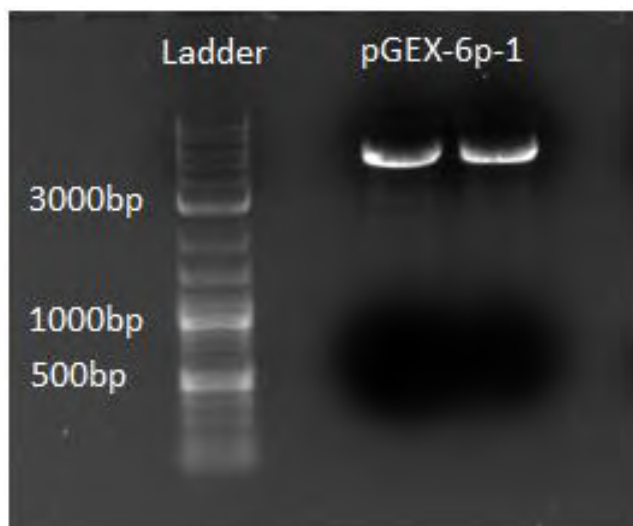


Εικόνα 21 Πήκτωμα αгарόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μετά από πέψη του φορέα pETM-11 και ολόκληρου του γονιδίου με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI^{hf} και HindIII^{HF}. Τόσο ο φορέας όσο και το ένθεμα διακρίνονται στα αναμενόμενα μοριακά βάρη. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (Ladder) είναι ο GeneRuler™ 1kb plusDNA ladder της εταιρείας Thermo Scientific



Εικόνα 22 Πήκτωμα αгарόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μετά από πέψη του φορέα pGEX-6p-1 και του κολοβωμένου τμήματος του γονιδίου (truncated gene) με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI^{hf} και XhoI. Τόσο ο φορέας όσο και το ένθεμα διακρίνονται στα αναμενόμενα μοριακά βάρη. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (Ladder) είναι ο GeneRuler™ 1kb plusDNA ladder της εταιρείας Thermo Scientific

2^η μέθοδος: Ο πλασμιδιακός φορέας pGEX-6p-1 κόπηκε από το ένζυμο EcoRI που αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία GAATTC η οποία υπάρχει μόνο μία φορά εντός της περιοχής του πολυσυνδέτη. Στη συνέχεια φορτώθηκε σε πηκτή αгарόζης 1% προς εξαγωγή και καθαρισμό. Ο πλασμιδιακός φορέας είχε το αναμενόμενο μοριακό βάρος.



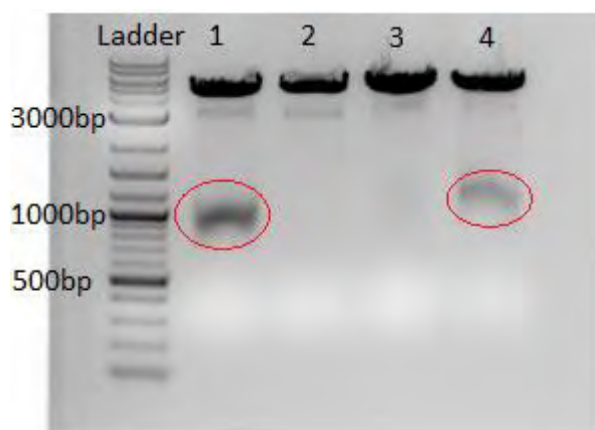
Εικόνα 23 Πήκτωμα αγαρόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση του φορέα pGEX-6p-1 μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Παρατηρείται ότι ο πλασμιδιακός φορέας έχει το αναμενόμενο μοριακό βάρος. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (Ladder) είναι ο 2-log DNA ladder της εταιρείας NEB

5.2.4 Αντίδραση σύνδεσης με DNA λιγάση

Για την 1^η μέθοδο η σύνδεση φορέα και ενθέματος έγινε με τη χρήση DNA λιγάσης. Ο λόγος φορέα - ενθέματος ήταν 1:3. Δεν είχαμε όμως τα επιθυμητά αποτελέσματα καθώς φαίνεται ότι δεν έγινε εισδοχή του ενθέματος. Σε βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με πλασμίδιο μετά την αντίδραση λιγάσης φαίνεται πως υπήρχε μόνο ο επανακυκλοποιημένος φορέας. Είναι πιθανόν να χρειάζεται επανάληψη του πειράματος με διαφορετικούς λόγους φορέα - ενθέματος (1:2, 1:4, 1:6) που πιθανόν να βελτιώσουν την απόδοσή του.

5.2.5 Πέψη ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με EcoRI για επιβεβαίωση της παρουσίας ενθέματος (2^η μέθοδος)

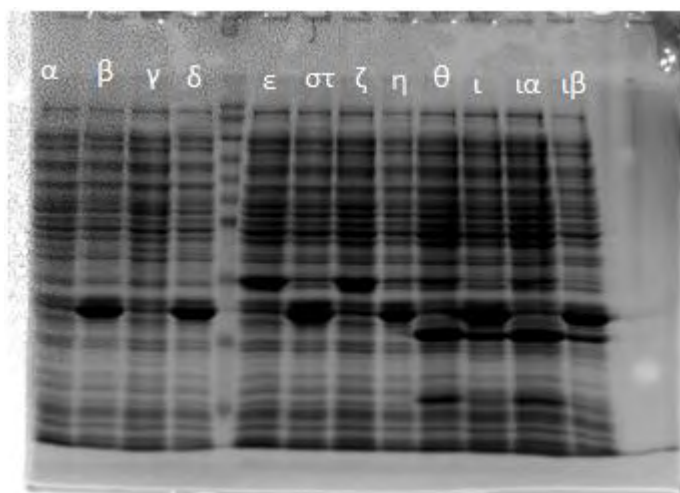
Μετά το μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli* στελέχους XL1 Blue με τον ανασυνδυασμένο φορέα επιλέχθηκαν 4 αποικίες προς απομόνωση πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα (mini prep). Τα πλασμίδια που συλλέχθηκαν από αυτές κόπηκαν με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Το ένζυμο αυτό κόβει δεξιά και αριστερά του ενθέματος δεδομένου ότι η αλληλουχία που αναγνωρίζει έχει διατηρηθεί στον ανασυνδυασμένο φορέα (κάτι που έγινε κατά την κατασκευή εκκινητών). Στα δείγματα προστέθηκε 6x loading dye σε ποσότητα τέτοια ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 1x. Κατόπιν έτρεξαν σε πηκτή αγαρόζης 1%. Σε δύο από τα δείγματα (1 και 4) εμφανίστηκαν δύο ζώνες – μία με μοριακό βάρος περίπου 5000bp και μία με μοριακό βάρος περίπου 900bp. Τα μοριακά βάρη αυτά αντιστοιχούν κατά προσέγγιση στα μοριακά βάρη του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος αντίστοιχα.



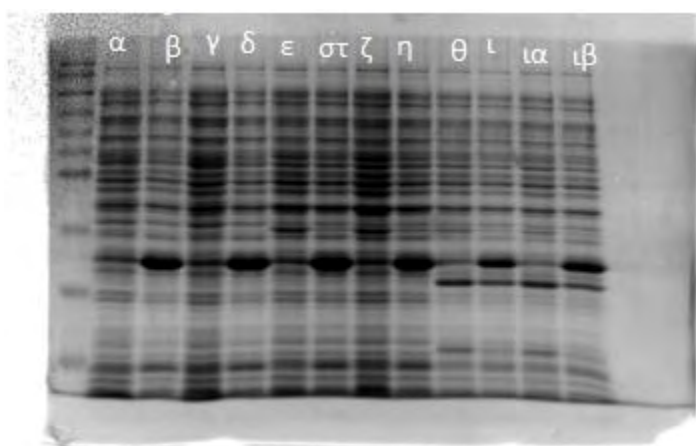
Εικόνα 24 Πήκτωμα αγαρόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Παρατηρείται ότι τα δείγματα 1 και 4 παρουσιάζουν δύο ζώνες μία με μοριακό βάρος περίπου 5000bp και μία με μοριακό βάρος περίπου 900bp. Τα μοριακά βάρη αυτά αντιστοιχούν κατά προσέγγιση στα μοριακά βάρη του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος αντίστοιχα.. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (Ladder) είναι ο 2-log DNA ladder της εταιρείας NEB

5.2.6 Έλεγχος έκφρασης σε κύτταρα *E.coli* (BL21 Gold, B834 και B834 pLysS)

Με τα δείγματα (2^η μέθοδος) στα οποία εμφανίστηκαν δύο ζώνες (1 και 4) πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε κύτταρα *E. coli* διαφόρων στελεχών (BL21 Gold, B834 και B834 pLysS). Κατόπιν έγινε έλεγχος έκφρασης (expression test). Τα δείγματα έτρεξαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%. Αν και η πηκτή αγαρόζης έδειξε να υπάρχει ένθεμα, εντούτοις κατά τον έλεγχο έκφρασης παρατηρήθηκε υπερέκφραση μόνο της αλληλουχίας αναγνώρισης GST.



Εικόνα 25 Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% για τον έλεγχο έκφρασης του κολοβωμένου τμήματος της πρωτεΐνης rhkg1 σε διάφορα στελέχη EcoRI (Soluble) για τα δείγματα 1 και 4. α) BL21 gold (-)(1), β) BL21 gold (+)(1), γ) BL21 gold (-)(4), δ) BL21 gold (+)(4), ε) B834 (-)(1), στ) B834 (+)(1), ζ) B834 (-)(4), η) B834 (+)(4), θ) B834 pLysS (-)(1), ι) B834 pLysS (+)(1), ια) B834 pLysS (-)(4), ιβ) B834 pLysS (+)(4). Παρατηρήθηκε υπερέκφραση μόνο της GST.



Εικόνα 26 Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% για τον έλεγχο έκφρασης του κολοβωμένου τμήματος της πρωτεΐνης rhkg1 σε διάφορα στελέχη EcoRI (Total) για τα δείγματα 1 και 4. α) BL21 gold (-)(1), β) BL21 gold (+)(1), γ) BL21 gold (-)(4), δ) BL21 gold (+)(4), ε) B834 (-)(1), στ) B834 (+)(1), ζ) B834 (-)(4), η) B834 (+)(4), θ) B834 pLysS (-)(1), ι) B834 pLysS (+)(1), ια) B834 pLysS (-)(4), ιβ) B834 pLysS (+)(4). Παρατηρήθηκε υπερέκφραση μόνο της GST.

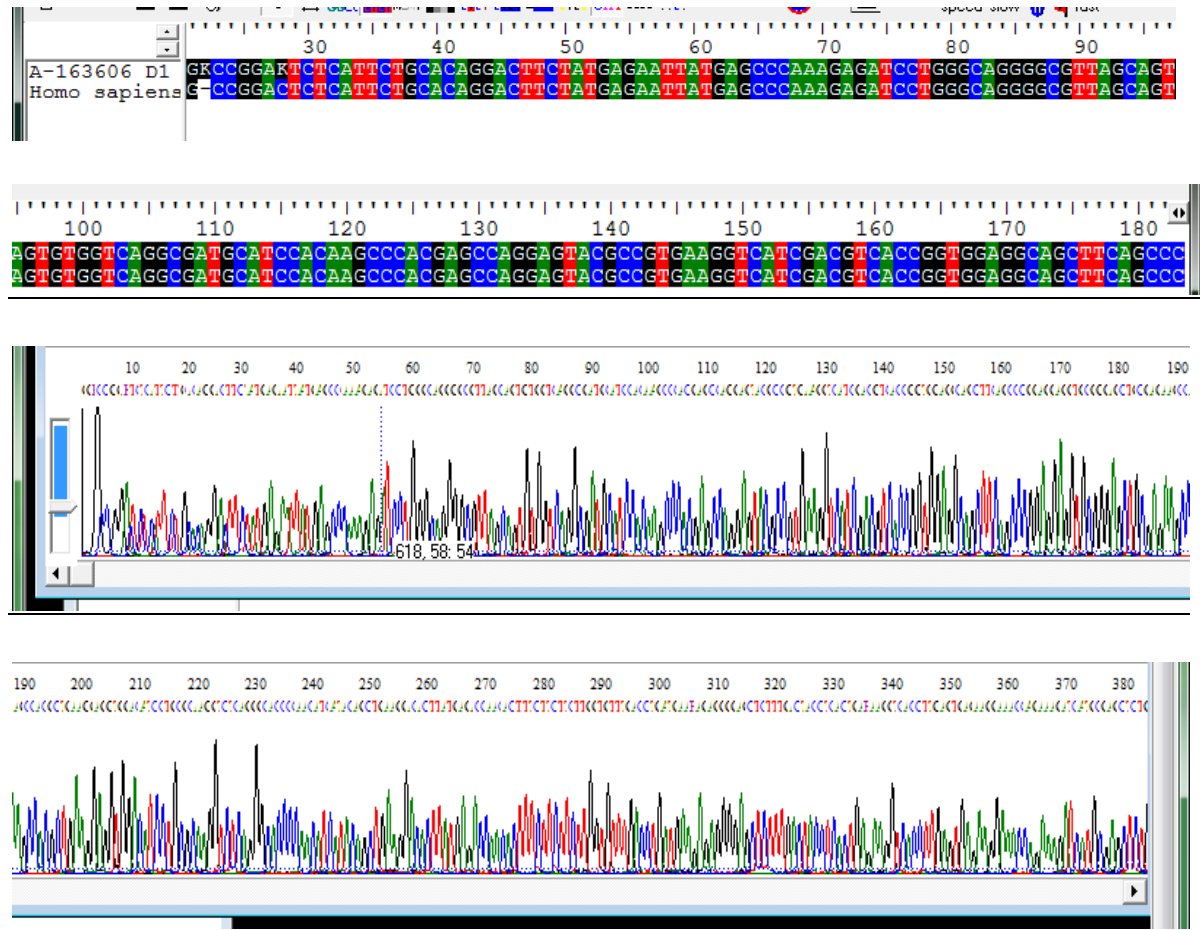
5.2.7 Αλληλούχιση τμήματος που προέκυψε μετά την PCR για τη 2η μέθοδο

Το τμήμα DNA που προέκυψε από το βήμα 4.2.2 μέσω PCR στάλθηκε για αλληλούχιση. Η αλληλουχία φαίνεται να ταυτίζεται με την αλληλουχία-εκμαγείο με

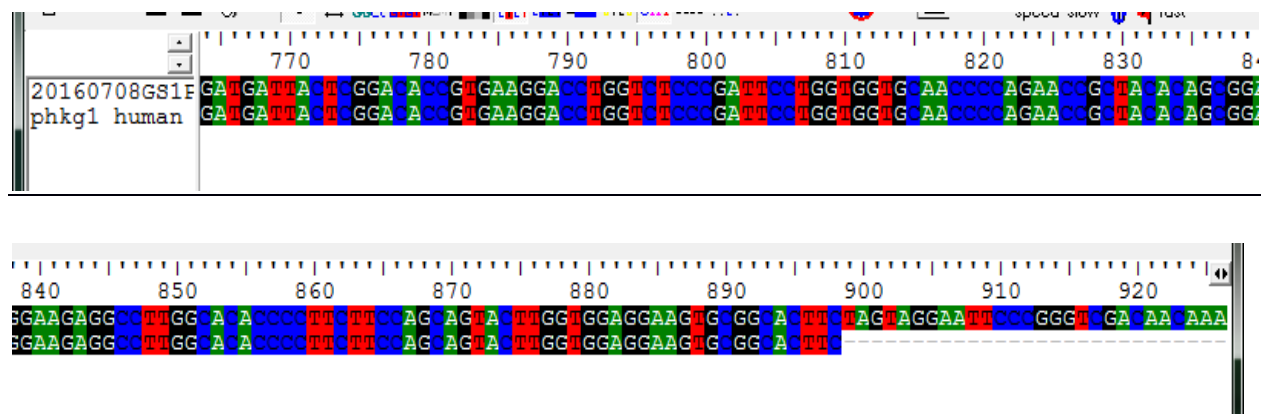
εξαίρεση τα άκρα. Φαίνεται ότι υπάρχουν κάποιες επιπλέον βάσεις στα άκρα οι οποίες πιθανόν να οφείλονται σε λάθος της τεχνικής αλληλούχισης, είτε σε λάθος της πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε. Κάτι τέτοιο υποδηλώνει ότι πιθανόν μια επανάληψη του πειράματος με μια πολυμεράση υψηλής πιστότητας να διόρθωνε το πρόβλημα. (Η εικόνα βρίσκεται στο παράρτημα.)

6. Παράρτημα

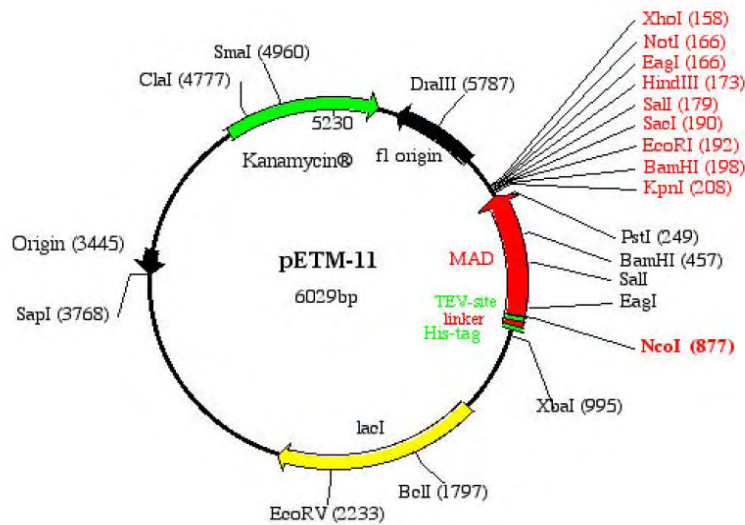
Αποτελέσματα Sequencing αλληλουχίας – εκμαγείου (τμήμα)



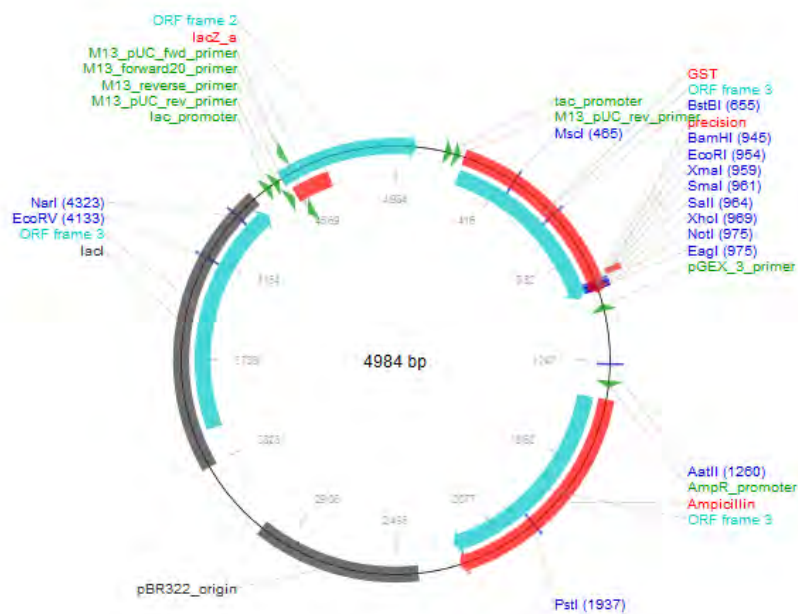
Αποτελέσματα Sequencing αλληλουχίας PhKytrc μετά από ενίσχυση με PCR



Χάρτες Φορέων pETM-11 και pGEX-6p1



Εικόνα 27 pETM-11



Εικόνα 28 pGEX-6p-1

Παρασκευή LB Broth (Μέσο Υγρής καλλιέργειας)

- 25gr/L LB Broth
- dH₂O

ή

- Σε 1000ml dH₂O προσθέτω
- 10g Bacto-tryptone
- 10g NaCl
- 5g Yeast Extract
- Ρυθμίζω pH στο 7

Παρασκευή LB Agar (Μέσο στερεής καλλιέργειας)

- 35gr/L LB Agar
- dH₂O
- Αντιβιοτικό σε κατάλληλη συγκέντρωσης

Παρασκευή διαλύματος SOB Medium (200ml) (μέσο υγρής καλλιέργειας για γρήγορη ανάπτυξη)

- 4gr Bacto-tryptone
- 1gr yeast extract
- 0.1gr NaCl
- 2ml KCl (250mM)

Ρύθμιση pH στο 7

Παρασκευή διαλύματος SOC Medium (μέσο υγρής καλλιέργειας για γρήγορη ανάπτυξη)

Σε 50ml SOB medium προστίθενται 4ml διαλύματος glucose 1M το οποίο είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με filter 0.22μM.

Παρασκευή διαλύματος 2YT (Μέσο Υγρής καλλιέργειας)

- Σε 1000ml dH₂O προσθέτω

- 16g Bacto-tryptone
- 5g NaCl
- 10g Yeast Extract
- Ρυθμίζω pH στο 7

Πήκτωμα Αγαρόζης 1%

Σε 40ml διαλύματος TAE 1X (Tris-Acetate-EDTA pH 8.8) προστίθενται 0,4g αγαρόζης. Το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη και να γίνει διαυγές. Αφού κρυώσει προστίθενται 4μL Midori Green (χρωστική που συνδέεται με το DNA), γίνεται ανάδευση και το διάλυμα τοποθετείται σε θήκη ηλεκτροφόρησης μέχρι να στερεοποιηθεί. Κατόπιν η θήκη τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα προετοιμάζονται με προσθήκη Loading dye 6x και φορτώνονται στο πήκτωμα στις ειδικές θέσεις (wells). Μαζί φορτώνεται και ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών (Ladder).

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος λύσης

- 50mM Hepes
- 0.2M NaCl
- 5% Glycerol
- 0.1% MTG
- 1mM PMSF

Γίνεται ρύθμιση του pH στο 7.4 και φιλτράρισμα με filter 0.22μM

Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) 10%

Η διαδικασία έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο (Laemmli, 1970)

Πηκτή διαχωρισμού (15ml)

- ✓ 5.9ml H₂O

- ✓ 5ml 30% Acryl/Bisacrylamide Mix
- ✓ 3.8ml 1.5M Tris HCl pH 8.8
- ✓ 0.15ml 10% SDS
- ✓ 0.15ml APS
- ✓ 6μL TEMED

Πηκτή επιστοίβαξης (5ml)

- ✓ 3.4ml H₂O
- ✓ 0.83ml 30% Acryl/Bisacrylamide Mix
- ✓ 0.63ml 1M Tris HCl pH 6.8
- ✓ 0.05ml 10% SDS
- ✓ 0.05ml APS
- ✓ 5μL TEMED

Τα αντιδραστήρια APS και TEMED προστίθενται τελευταία και ταυτόχρονα.

Χρωστική Coomassie 0.05% (200ml) προς χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης

- 80ml Methanol 40%
- 20ml Acetic Acid 10%
- 100ml ddH₂O
- 0.1g 0.1% Coomassie Blue R-250

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Running Buffer (10x) (500ml)

- 72g Glycine (MW: 75.04)
- 15g Tris (MW: 121.14)
- 5g SDS
- Μέχρι τα 500 ml dH₂O (απαιτείται θέρμανση)

Υπερθεικό αμμώνιο APS 10%

- 10g Ammonium persulfate
- ddH₂O μέχρι τα 100ml
- φύλαξη στους -20°C

4x SDS protein Sample Buffer (10ml)

- 4ml 100% glycerol
- 2.4ml 1M Tris/HCl pH 6.8
- 0.8g SDS
- 4mg bromophenol blue
- 0.5ml beta-mercaptoethanol
- 3.1ml H₂O

30% Acrylamide mix (100ml)

- 29g Acrylamide
- 0.8g N,N' – methylene- bis- acrylamide
- dH₂O

7.Βιβλιογραφία

- Agius Lorraine, (2015) Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism, *Molecular aspects of medicine* **46**, 34-35
- Aich P, Patra M, Chatterjee AK, Roy SS, Basu T. Calcium chloride made E. coli competent for uptake of extraneous DNA through overproduction of OmpC protein. *The protein journal* (2012);**31**:366-73.
- Begum J, Skamnaki VT, Moffatt C, Bischler N, Sarrou J, Skaltsounis AL, Leonidas DD, Oikonomakos NG, Hayes JM. J Mol. 2015;**61**:231-42.
- Bio-Rad. A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection
- Brown T. A., *Genomes 3*, εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης
- Brushia Robert J. and Walsh Donal A., (1999) Phosphorylase Kinase: The complexity of its Regulation is Reflected in the Complexity of its Structure, *Frontiers in Bioscience* **4**, d618-641
- Bukau B BJ, Boos W. Ca²⁺-induced permeabilization of the Escherichia coli outer membrane: comparison of transformation and reconstitution of binding-protein-dependent transport. *Journal of bacteriology* 1985;163.
- Celie Patrick HN, Parret Annabel HA and Perrakis Anastassis, (2016), Recombinant cloning strategies for protein expression, *Current Opinion in Structural Biology*, **38**, 145-154
- Clontech-. In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual. 2014
- Fabbro Dorian, Cowan-Jacob Sandra W and Moebitz Henrik, (2015), Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14, *British Journal of Pharmacology*, **172**, 2675–2700
- Hanks, S.K. & Hunter, T., (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification, *FASEB J.* **9**, 576-596.
- Harper S, Speicher DW. Expression and purification of GST fusion proteins. *Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan [et al]* 2008;**Chapter 6**:Unit 6
- Hatami N, Naderkhani, G., Shah, N. and Young, B. . The Effects of Pretreatment of Competent Cells with Nalidixic Acid on Efficiency of

- Chemically-induced Transformation in Escherichia coli B23. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* 2004.
- Healthcare GE. GST Gene fusion system Handbook. 2009.
 - Holm L, Rosenström P (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucl. Acids Res.* **38**, 545-549.
 - Johnson Louise N., Noble Martin E. M., and Owen David J., (1996) Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation, *Cell*, **Vol. 85**, 149-158
 - KapaBiosystems, Kapa Taq DNA polymerase Manual 2013
 - Khan Kishwar Hayat, (2013), Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, **3(2)**, 257-263
 - Kyriakis John M., (2014), In the Beginning, There Was Protein Phosphorylation, *The Journal Of Biological Chemistry* **VOL. 289**, NO. 14, pp. 9460–9462
 - Lewin B. Genes VIII: Pearson; 2004
 - Lowe E.D., Noble M.E.M., Skamnaki V.T., Oikonomakos N.G., Owen D.J. and Johnson L.N., (1997) The crystal structure of a phosphorylase kinase peptide substrate complex: kinase substrate recognition, *The EMBO Journal* **Vol.16**, pp.6646–6658
 - Macherey-Nagel, PCR Clean-up Gel Extraction User Manual 2014
 - Macherey-Nagel, Plasmid DNA Purification User Manual 2012
 - Novagen, pET System Manual 10th edition 2003
 - Novagen. Competent cells.
 - Psarra Anna Maria G. and Sotiroudis Theodore G, Subcellular distribution of Phosphorylase Kinase in Rat Brain. Association of the Enzyme with Mitochondria and Membranes, (1996), *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**, 29-42
 - Rosano Germán L. and Ceccarelli Eduardo A., (2014), Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges, *Frontiers in Microbiology*, **Vol 5**, 1-17
 - Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, **5**: 725-738 (2010)

- Shigeyuki Yokoyama, (2003), Protein expression systems for structural genomics and Proteomics, *Current Opinion in Chemical Biology*, **7**:39-43
- Stryer L. *et al.*, (2001) *Biochemistry*, 5th Edition , Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτη
- Venien-Bryan Catherine, Jonic Slavica, Skamnaki Vasiliki, Brown Nick, Bischler Nicolas, Oikonomakos Nikos G., Boisset Nicolas, and Johnson Louise 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**, 117-127
- Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry* 1969;**244**:4406-12.
- Winchester Joni S., Rouchka^Eric C., Rowland Naomi S., and Rice Nancy A., (2007), *In silico* Characterization of Phosphorylase Kinase: Evidence for an Alternate Intronic Polyadenylation Site in PHKG1, *Mol. Genet. Metab.* **92(3)**: 234–242.
- Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, **12**: 7-8 (2015)
- Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, **vol 9**, 40 (2008)